



**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD**

**Razvoj prediktivnog modela obogaćivanja  
prehrambenih proizvoda vitaminom D u Srbiji**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Kandidat: Jelena Milešević, Master Ishrane i Ruralnog razvoja

Mentor: dr Snežana Kravić, vanr. prof.

Novi Sad, 2019.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**

**TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD**

## **KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

**Redni broj:**

**RBR**

**Identifikacioni broj:**

**IBR**

**Tip dokumentacije:**

Monografska dokumentacija

**TD**

**Tip zapisa:**

Tekstualni štampani materijal

**TZ**

**Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):**

Doktorska disertacija

**VR**

**Ime i prezime autora:**

Jelena Milešević

**AU**

**Mentor (titula, ime, prezime, zvanje):**

dr Snežana Kravić, vanr. prof.

**MN**

**Naslov rada:**

Razvoj prediktivnog modela

**NR**

obogaćivanja prehrambenih proizvoda

vitaminom D u Srbiji

**Jezik publikacije:**

Srpski, latinica

**JP**

**Jezik izvoda:**

srp. / eng.

**JI**

**Zemlja publikovanja:**

Republika Srbija

**ZP**

<b>Uže geografsko područje:</b>	AP Vojvodina
<b>UGP</b>	
<b>Godina:</b>	2019.
<b>GO</b>	
<b>Izdavač:</b>	autorski reprint
<b>IZ</b>	
<b>Mesto i adresa:</b>	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
<b>MA</b>	
<b>Fizički opis rada:</b>	7 poglavlja, 146 strana, 26 tabela, 17 slika, 155 referenci, 1 prilog
<b>FO</b>	
<b>Naučna oblast:</b>	Tehnološko inženjerstvo
<b>NO</b>	
<b>Naučna disciplina:</b>	Prehrambeno inženjerstvo, Nauka o ishrani
<b>ND</b>	
<b>Predmetna odrednica, ključne reči:</b>	Vitamin D, obogaćivanje prehrambenih proizvoda, prediktivni modeli nutritivnog unosa
<b>PO</b>	
<b>UDK</b>	577.161.2:641]:613.292 (497.11)
<b>Čuva se:</b>	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
<b>ČU</b>	
<b>Važna napomena:</b>	Nema
<b>VN</b>	
<b>Izvod:</b>	
<b>IZ</b>	

Kreirana je specijalizovana baza podataka o sadržaju vitamina D koja sadrži 981 analitički podatak prikupljen iz evropskih baza podataka, od čega je 658 (67%) izraženo u formi ukupnog vitamina D. Podaci o svim vitamerima pronađeni su za meso, obogaćene namirnice/formulacije i za ribu, dok su podaci o D<sub>3</sub> pronađeni za ribu, meso i mlečne proizvode. Podaci o sadržaju vitamina D, iz srpske baze podataka o sastavu namirnica (BPSN), ažurirani su za ukupno 541 namirnicu, jelo i dijetetski suplement.

Da bi se upotpunio kvalitet podataka o vitaminu D u srpskoj BPSN, određen je sadržaj vitamina D u svežim konzumnim kokošijim jajima proizvedenim na teritoriji Srbije. Analizirana su jaja iz intenzivne proizvodnje i iz malih domaćinstava. Analize su izvedene u laboratoriji Danskog Tehničkog Univerziteta (DTU) standardizovanom HPLC metodom. Sadržaj vitamina D u jajima iz intenzivne proizvodnje iznosio je 5,78 µg/100

g, a u jajima iz slobodnog uzgoja 2,99 µg/100 g. Izračunati prosečni sadržaj vitamina D u svežim jajima iznosio je 4,39 µg/100 g te je ovaj podatak unet u srpsku BPSN.

Uobičajeni unos vitamina D analiziran je programom SPADE u populaciji koju su činili ispitanici iz četiri regiona Srbije, ukupno 605 odraslih, od toga 54% žena. Ustanovljeno je da uobičajeni prosečni unos vitamina D iznosi 4±1,4 µg/dan, kod muškaraca 4,3±1,5 µg/dan, a kod žena 3,7±1,2 µg/dan, što je znatno niže od preporučenih vrednosti od 10 µg/dan za procenjene prosečne potrebe (Estimated Average Requirement-EAR) i 15 µg/dan za adekvatni unos (Adequate Intake –AI). Čak 95% srpske populacije ne dostiže EAR vrednosti.

Analiza ishrane srpske populacije pokazala je da su glavni nutritivni izvori vitamina D jaja, riba, meso i mlečni proizvodi. Konzumacija obogaćenih namirnica vitaminom D (obogaćenih i biljnih mleka, kakao praha, obogaćenih sokova, margarina i instant žitarica) identifikovana je kod trideset petoro ispitanika. Prateći kriterijume za odabir adekvatnih namirnica za obogaćivanje, a za potrebe dizajniranja prediktivnog modela, odabrano je 70 namirnica koje su sortirane u sedam karakterističnih grupa: beli hleb, mleko, jogurt, sir, pavlaka, jaja i paradajz pire.

Prediktivni model obogaćivanja namirnica baziran je na matematičkoj formuli kojom se izračunava količina vitamina D (fc) koju treba dodati određenoj namirnici, odnosno grupi namirnica. Izračunata količina zavisi od tri faktora:

- prosečne konzumacije date namirnice, ili grupe, u gramima na n-tom percentilu populacije,
- njenog (njegovog) procentualnog udela u dnevnom energetsom unosu,
- unosa vitamina D (u µg/dan) na n-tom percentilu.

Odabrano je sedam scenarija koji su simulirani da bi se validirala efektivnost „dodavanja“ vitamina D radi dostizanja preporučenih nutritivnih vrednosti. U optimalnom scenariju, AI je dostignut na 65. percentilu populacije, a unos vitamina D na 95. percentilu populacije bio je ispod 25 µg/dan. U maksimalnom scenariju, 50% populacije bilo je između AI i gornjeg tolerisanog nivoa nutritivnog unosa (Upper Tolerable Intake Level-UL), pri čemu niko nije dostigao UL vrednosti. Na ovaj način definisane su optimalne i maksimalne količine vitamina D koje se mogu dodati odabranim namirnicama da bi se zadovoljile potrebe, odnosno korigovao unos vitamina D kod srpske populacije.

## **Datum prihvatanja teme od strane**

**Senata:**

**DP**

**Datum odbrane:**

**DO**

**Članovi komisije:**

**KO**

**predsednik:**

Dr Zorica Stojanović, docent

**član:**

Dr Snežana Kravić, vanredni profesor

**član:**

Dr Dragana Šoronja-Simović, vanredni profesor

**član:**

Dr Marija Glibetić, naučni savetnik

**član:**

Dr Anamarija Mandić, naučni savetnik

KEY WORD DOCUMENTATION

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Document type:**

DT

Monograph documentation

**Type of record:**

TR

Textual printed material

**Contents code:**

CC

PhD Thesis

**Author:**

AU

Jelena Milešević

**Mentor:**

MN

Snežana Kravić, PhD, Associate Professor

**Title:**

TI

Development of Predictive Model for  
Fortification of Foods with Vitamin D in  
Serbia

**Language of text:**

LT

Serbian

**Language of abstract:**

LA

Serbian/English

**Country of publication:**

CP

Republic of Serbia

<b>Locality of publication:</b>	Vojvodina
<b>LP</b>	
<b>Publication year:</b>	2019
<b>PY</b>	
<b>Publisher:</b>	Author's reprint
<b>PU</b>	
<b>Publication place:</b>	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
<b>PP</b>	
<b>Physical description:</b>	7 chapters, 146 pages, 26 tables, 17 illustrations, 155 references, 1 attachment
<b>PD</b>	
<b>Scientific field</b>	Technological engineering
<b>SF</b>	
<b>Scientific discipline</b>	Food engineering, Nutrition science
<b>SD</b>	
<b>Subject, Key words</b>	Vitamin D, food fortification, predictive models of dietary intake
<b>SKW</b>	
<b>UC</b>	577.161.2:641]:613.292 (497.11)
<b>Holding data:</b>	Library of the Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
<b>HD</b>	
<b>Note:</b>	None
<b>N</b>	

**Abstract:**

**AB**

A specialized database on the content of vitamin D was created with 981 analytical data on vitamin D content obtained from European databases, of which 658 (67%) were expressed as total vitamin D. The data (for all vitamins) were mainly found for meat, enriched foods/formulations and fish, while D<sub>3</sub> data was identified for fish, meat and dairy products. Updating data on vitamin D content in Serbian food composition database (FCDB) was done in 541 foods, dishes and dietary supplements. To enhance the quality of data in Serbian FCDB, content of vitamin D in fresh eggs from the farm and domestic production on the territory of Serbia has been determined. Analysis was performed in Danish Technical University-DTU, Denmark, using standardized HPLC method. Eggs from the farm contained 5.78 µg vitamin D/100 g, while domestic eggs were 2.99 µg vitamin D/100 g, and the average vitamin D content in fresh eggs - 4.39 µg/100 g which value was inserted into Serbian FCDB. The usual dietary intake of vitamin D was analyzed using the SPADE program in the survey covering 605 adult respondents from four regions of Serbia, of which 54% were women. The average intake of vitamin D was found to be 4±1.4

$\mu\text{g/day}$ , which is  $4.3 \pm 1.5 \mu\text{g/day}$  for men and  $3.7 \pm 1.2 \mu\text{g/day}$  for women, and is significantly lower than the recommended Estimated Average Requirement (EAR) values ( $10 \mu\text{g/day}$ ) and Adequate Intake (AI) values ( $15 \mu\text{g/day}$ ). As many as 95% of Serbian population are not reaching the EAR values. Nutritional analysis of Serbian diet has shown that the main sources of vitamin D are eggs, fish, meat and dairy products. Consumption of vitamin D-fortified foods (fortified and plant milk, cocoa powder, fortified juices, margarine, and instant cereals) was identified in 35 subjects. Following the criteria for selecting adequate foods for fortification, for the needs of designing the model, 70 foods were selected that were sorted into 7 characteristic food groups: white bread, milk, yoghurt, cheese, sour cream, eggs and tomato puree.

The prediction model of food fortification is based on a mathematical formula that calculates the amount of vitamin D (fc) to be added to a particular food group in accordance with:

- the amount of consumption of that food vector and
- the percentage factor in the total energy intake of the considered foods (food vectors) in the observed population,
- the intake of vitamin D on n-th percentile.

Seven scenarios were simulated to validate the effect of addition of vitamin D toward reaching the given reference values. In the optimal scenario, AI was reached at the 65<sup>th</sup> percentile of the population, and vitamin D intake at 95<sup>th</sup> percentile was below  $25 \mu\text{g/day}$ . In the maximum scenario, 50% of the population was between AI and Upper Tolerable Intake Level (UL), while none has reached UL values. This defines the ranges of optimal and maximum values of vitamin D that, by being added to the chosen food-vectors, can help in reaching vitamin D requirements of Serbian population.

#### **Accepted on Senate on:**

**AS**

#### **Defended:**

**DE**

#### **Thesis Defend Board:**

**DB**

**President:** Zorica Stojanović, PhD, Assistant Professor

**member:** Kravić Snežana, PhD, Associate Professor

**member:** Dragana Šoronja-Simović, PhD, Associate Professor

**member:** Marija Glibetić, PhD, Scientific adviser

**member:** Anamarija Mandić, PhD, Scientific adviser

## Zahvalnica

Dugujem ogromnu zahvalnost svima koji su doprineli da ova disertacija, rezultat višegodišnjeg timskog rada, dobije konačnu formu. Rad na njoj bio mi je i dragoceno profesionalno iskustvo i veoma značajan period u životu.

Pre svega zahvaljujem mojoj mentorki dr Snežani Kravić, vanrednom profesoru na Katedri za primenjene i inženjerske hemije, Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, za strpljenje i pomoć u procesima prijave, izrade i odbrane ovoga rada. Posebno zahvaljujem mojoj supervizorki dr Mariji Glibetić, naučnom savetniku i rukovodiocu Centra izuzetne vrednosti za istraživanja u oblasti ishrane i metabolizma, Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu. Njena je vizija udahnula život ovoj doktorskoj disertaciji a nesebična vera u mene pomogla da istrajem do samog kraja. Od srca hvala i Marini Nikolić, dragoj kolegici i nadasve prijatelju, na bezrezervnom gostoprimstvu i kreativnom pristupu u obradi podataka i osmišljavanju modela.

Ova doktorska disertacija je i plod saradnje sa naučnicima iz inostranstva. Zahvaljujem Polu Finglasu iz EuroFIR asocijacije na mogućnosti da radim za istu u Briselu, na ODIN projektu, i steknem nova radna i životna iskustva i kreiram specijalizovanu bazu podataka o sadržaju vitamina D u Evropi. Zahvaljujem dr Jeti Jakobsen sa Danskog Tehničkog Univerziteta u Soborgu, na gostoprimstvu i fantastičnom laboratorijskom iskustvu u analizi vitamina D u jajima HPLC-UV metodom. Zahvaljujem dr Mejrid Keli sa UCC iz Korka, za konstruktivne savete u izradi publikacije o specijalizovanoj bazi o sadržaju vitamina D u namirnicama u Evropi i za značajan doprinos naučnoj osnovanosti ove disertacije. Zahvaljujem dr Mariji Lurdes Samaniego-Velaskez sa Farmaceutskog fakulteta na CEU San Pablo Univerziteta u Madridu, za pomoć u prikupljanju i analizi podataka o sadržaju vitamina D u namirnicama u Evropi.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim dragim kolegicama iz Centra izuzetne vrednosti za istraživanja u oblasti ishrane i metabolizma, Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu.



Prvenstveno dr Mirjani Gurinović, naučnom savetniku, za poverenje i prilike koje mi je pružala svih ovih godina zajedničkog rada. Veliko hvala dr Milici Zeković, dr Mariji Ranić, dr Mariji Takić, dr Jasmini Debeljak-Martačić, dr Mariji Đekić-Ivanković, dr Danijeli Ristić-Medić i ostalim dragim damama koje su svojim znanjem i iskustvom pomogle u stručnom, ali i u moralnom i emotivnom smislu. Hvala od sveg srca!

Zahvalnost upućujem i dr Anamariji Mandić, naučnom savetniku sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije (FINS), u Novom Sadu, koja me je bodrila i pružila priliku da radim u divnoj laboratoriji ovog instituta. Hvala i kolegincima dr Nedi Spasevski na putu ka „zelenoj grani“.

Takođe, hvala Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije, koje je finansiralo projekat III41030, u okviru kojeg je i rađena ova teza.

Veliko hvala prijateljima iz plesnog studija Allegro koji su svojom razigranom energijom pomogli da ostanem vedra i jaka. Hvala svim mojim prijateljima, rođacima i kumovima koji su bili uz mene, sve ove godine.

Na kraju, za uvek i neizmerno hvala mojim dragim roditeljima, mojoj sestri i dražesnoj sestričini na безусловnoj ljubavi i podršci u životu, za sve što su učinili da danas budem ta koja jesam. Volim vas beskrajno!

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>4</b>
Uloga vitamina D u ljudskom organizmu.....	4
Status vitamina D u svetu, Evropi i Srbiji .....	6
Nutritivni unos vitamina D u svetu, Evropi i Srbiji.....	10
Obogaćivanje namirnica u svetu, Evropi i Srbiji .....	16
Modeli za određivanje uobičajenog nutritivnog unosa i simulaciju obogaćivanja prehrambenih proizvoda ..	24
Razvoj istraživačke infrastrukture u nutricionizmu .....	44
Baze podataka o sastavu namirnica.....	46
Analiza vitamina D u hrani.....	59
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>71</b>
Izrada protokola za pretraživanje podataka o sadržaju vitamina D u evropskim bazama podataka, pretraživanje FoodEXplorer™ .....	71
Ekstrakcija podataka korišćenjem FoodEXplorer™ pretraživača.....	79
Ažuriranje srpske baze podataka o sadržaju vitamina D .....	80
Određivanje sadržaja vitamina D u uzorcima jaja sa tržišta Srbije .....	80
Izračunavanje prosečnog nutritivnog unosa vitamina D korišćenjem softverske aplikacije DIET ASSESS&PLAN i statističkog programa SPADE za određivanje uobičajenog nutritivnog unosa vitamina D .....	85
Simulacija modela obogaćivanja prehrambenih proizvoda vitaminom D i efekta porasta unosa vitamina D na populacionom nivou .....	86
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>87</b>
Razvoj specijalizovane baze podataka o sadržaju vitamina D u prehrambenim proizvodima u Evropi.....	87
Ažuriranje srpske BPSN vrednostima vitamina D i analiza podataka .....	96
Nutritivni unos vitamina D u Srbiji .....	101
Glavni izvori vitamina D u ishrani srpske populacije.....	106
Identifikacija namirnica za obogaćivanje.....	109
Razvoj prediktivnog modela obogaćivanja različitih prehrambenih proizvoda vitaminom D. Validacija razvijenog modela simulacijom nutritivnog unosa .....	113
Definisanje adekvatnih količina vitamina D za dodavanje namirnicama .....	120
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>123</b>
Budući pravci istraživanja .....	126
<b>6. REZIME.....</b>	<b>127</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>129</b>

## **Listo oznaka, skraćenica i simbola**

<b>AFL</b>	<i>Dozvoljeni nivo obogaćivanja (Allowed Fortification Level)</i>
<b>AI</b>	<i>Adekvatni unos (Adequate Intake)</i>
<b>AOAC</b>	<i>Asocijacija zvaničnih analitičkih hemičara (Association of Official Analytical Chemists)</i>
<b>AR</b>	<i>Prosečne potrebe (Average Requirement)</i>
<b>BHT</b>	<i>Butil hidroksitoluen</i>
<b>BMI</b>	<i>Indeks telesne mase (Body Mass Index)</i>
<b>BPSN</b>	<i>Baza podataka o sastavu namirnica</i>
<b>CAPNUTRA</b>	<i>Mreža za razvoj kapaciteta u ishrani u Centralnoj i Istočnoj Evropi (Capacity Development Network in Nutrition in Central and Eastern Europe)</i>
<b>CD</b>	<i>Razvoj kapaciteta (Capacity Development)</i>
<b>CEN</b>	<i>Evropski komitet za standardizaciju (European Committee for Standardization)</i>
<b>CODEX</b>	<i>Codex Alimentarius</i>
<b>DAD</b>	<i>Detektor sa nizom dioda (Diode Array Detector)</i>
<b>DAP</b>	<i>Diet Assess and Plan</i>
<b>DBP</b>	<i>Vitamin D vezujući protein (Vitamin D-binding protein)</i>
<b>DCM</b>	<i>Dihlormetan</i>
<b>DGE</b>	<i>Nemačko udruženje za ishranu (Deutsche Gesellschaft für Ernährung)</i>
<b>DNK</b>	<i>Dezoksiribonukleinska kiselina</i>
<b>DRV</b>	<i>Nutritivne Preporučene Vrednosti (Dietary Reference Values)</i>
<b>DTU</b>	<i>Danski tehnički univerzitet (Danish Technical University)</i>
<b>EAR</b>	<i>Procenjeni prosečni zahtevi (Estimated Average Requirements)</i>
<b>EFSA</b>	<i>Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority)</i>
<b>EK</b>	<i>Evropska Komisija</i>
<b>ELSD</b>	<i>Evaporative light scattering detector</i>
<b>EPIC</b>	<i>Evropska prospektivna istraživanja o raku i ishrani (European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition)</i>
<b>EuroFIR</b>	<i>Evropski informacioni resursi o hrani (European Food Information Resource)</i>
<b>EURRECA</b>	<i>Evropska mreža izvrsnosti o preporukama za unos mikronutrienata (EUROpean micronutrient RECommendations Aligned Network of Excellence)</i>
<b>FAO</b>	<i>Organizacija za hranu i poljoprivedu Ujedinjenih Nacija (Food and Agriculture Organization of the United Nations)</i>
<b>FGF-23</b>	<i>Fibroblast faktora rasta</i>
<b>GRAS</b>	<i>Generalno smatrano bezbednim (Generally Regarded As Safe)</i>
<b>HNANES</b>	<i>Anketa o nacionalnom pregledu zdravlja i ishrane (National Health and Nutrition Examination Survey)</i>
<b>HPLC</b>	<i>Tečna hromatografija visokih performansi (High-performance liquid chromatography)</i>
<b>INFOODS</b>	<i>Internacionalna mreža sistema podataka o hrani (International Network of Food Data Systems)</i>
<b>IOM</b>	<i>Medicinski institut (Institute of Medicine)</i>
<b>IPD</b>	<i>Individualni podaci o ispitanicima (Individual participant data)</i>

<b>IS</b>	<i>Interni standard</i>
<b>ISO</b>	<i>Internacionalna organizacija za standardizaciju (International Organization for Standardization)</i>
<b>JUSAD</b>	<i>Jugoslovenska studija prekursora ateroskleroze kod školske dece</i>
<b>LC-MS/MS</b>	<i>Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectroscopy)</i>
<b>MSFL</b>	<i>Maksimalni bezbedni nivo obogaćivanja (Maximal safe fortification level)</i>
<b>NMKL</b>	<i>Nordijski komitet za analizu hrane (Nordic Committee on Food Analysis)</i>
<b>NORDEN</b>	<i>Nordijske nutritivne preporuke (Nordic Nutrition Recommendations)</i>
<b>PTH</b>	<i>Paratiroidni hormon</i>
<b>RAS</b>	<i>Renin-angiotenzin sistem</i>
<b>RCT</b>	<i>Randomizovane kliničke studije (Randomised clinical trials)</i>
<b>RDA</b>	<i>Preporučena dnevna doza (Recommended Daily Allowance)</i>
<b>RF</b>	<i>Faktor odgovora (Responce Factor)</i>
<b>RI</b>	<i>Preporučeni unos (Recommended Intake)</i>
<b>RIA</b>	<i>Radio-imunološke analize (Radio-Immuno Assay)</i>
<b>RNI</b>	<i>Referentni nutritivni unos (Reference Nutrient Intake)</i>
<b>SACN, UK</b>	<i>Naučni savetodavni odbor za ishranu (Scientific Advisory Committee on Nutrition)</i>
<b>SAD</b>	<i>Sjedinjene Američke Države</i>
<b>SPADE</b>	<i>Statistički program za procenjivanje izlaganja kroz ishranu (Statistical Program to Assess Dietary Exposure)</i>
<b>SPE</b>	<i>Ekstrakcija na čvrstoj fazi (Solid-phase Extraction)</i>
<b>SUBP</b>	<i>Softveri za upravljanje bazama podataka</i>
<b>UK</b>	<i>Ujedinjeno Kraljevstvo</i>
<b>UL</b>	<i>Gornji tolerisani nivo nutritivnog unosa (Upper Tolerable Intake Level)</i>
<b>UNU</b>	<i>Univerzitet Ujedinjenih Nacija (United Nations University)</i>
<b>UNU/SCN</b>	<i>Stalni odbor za ishranu Univerziteta u Ujedinjenim nacijama (United Nations University System Standing Committee for Nutrition)</i>
<b>USDA</b>	<i>Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (The United States Department of Agriculture)</i>
<b>VDR</b>	<i>vitamin D receptor</i>
<b>VDSP</b>	<i>Program standardizacije za vitamin D (Vitamin D Standardization Program)</i>

## Spisak tabela

Tabela 1. Poređenje aktuelnih međunarodnih preporuka o DRV za vitamin D sa novom dvostepenom ODIN IPD analizom najkvalitetnije kolekcije RCT podatka (ukupno n=882 učesnika) (Cashman, Ritz, & Kiely, 2017)

Tabela 2. Regulatorna o dodavanju vitamina D u prehrambene proizvode u SAD (Calvo et al., 2004)

Tabela 3. Maksimalni sadržaj vitamina D koji se može dodavati u različite tipove prehrambenih proizvoda u Danskoj (Danish Veterinary and Food Administration, 2017)

Tabela 4. Maksimalni nivo dodavanja vitamina D namirnicama (pretpostavljajući da je 50% svih namirnica moguće obogatiti)

Tabela 5. Tolerisani gornji nivo (UL) unosa vitamina D za različite starosne grupe (podaci iz 2002. god.) (Rasmussen et al., 2006)

Tabela 6. Unos energije i vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{dan}$ ) na 95. percentilu iz hrane i suplemenata u Danskoj (Rasmussen et al., 2006)

Tabela 7. Bezbedni maksimalni nivo vitamina D ( $\mu\text{g}$ ) koji se može dodavati namirnicama, bazirano na najosetljivijoj grupi (Rasmussen et al., 2006)

Tabela 8. Maksimalni nivo obogaćivanja i dozvoljeni nivo obogaćivanja namirnica vitaminom D na osnovu holandskih studija o ishrani i evropskog tolerisanog gornjeg nivoa unosa za specifične starosne grupe (Kloosterman et al., 2007)

Tabela 9. Algoritam pretraživanja za različite individualne forme vitamina D, kombinacije dva ili tri od njih, sa dva tipa metoda i dva indikatora metoda u FoodExplorer™-u

Tabela 10. Kriterijumi pretrage za vitamin D u FoodExplorer™-u

Tabela 11. Nacionalne baze podataka o sastavu namirnica korišćene za ekstrakciju podataka o sadržaju vitamina D kroz FoodExplorer™

Tabela 12. Operativni parametri preparativne i analitičke HPLC

Tabela 13. Distribucija podataka o sadržaju vitamina D u namirnicama, po formama vitamina i kvalitetu podataka

Tabela 14. Distribucija podataka o vitaminima po zemljama

Tabela 15. Distribucija podataka o vitaminima po grupama namirnica

Tabela 16. Distribucija podataka o sadržaju vitamina D kroz grupe namirnica i vitaminske forme u USDA SR26

Tabela 17. Rasponi sadržaja vitamina D ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) u istim ili sličnim namirnicama iz evropskog seta podataka

Tabela 18. Broj namirnica u grupama namirnica i raspon vrednosti sadržaja vitamina D u srpskoj bazi podataka o sastavu namirnica

Tabela 19. Količina vitamina D u konzumnim jajima u Srbiji – iz intenzivne proizvodnje i iz malih domaćinstava

Tabela 20. Nutritivni status i nutritivni unos vitamina D i kalcijuma u srpskoj odrasloj populaciji

Tabela 21. Prikaz procentualnog udela populacije ispod i iznad EAR ( $10\ \mu\text{g}/\text{dan}$ ) vrednosti

Tabela 22. Dnevni unos ( $\text{g}/\text{dan}$ ) glavnih izvora vitamina D u istraživanom uzorku populacije

Tabela 23. Odabrane namirnice za obogaćivanje, distribucija unosa ( $\text{g}$ ) i prosečnog energetskog unosa ( $\text{kcal}$ ) iz svake od njih

**Tabela 24.** Izračunate vrednosti količine vitamina D ( $\text{fc}$ ) koja bi se trebala dodati odabranim vektorima (namirnicama) za obogaćivanje na osnovu konzumacije vektora ( $\text{Fi}$ ) na 5., 50. i 95. percentilu, i na 5., 50. i 95. percentilu unosa vitamina D ( $\text{Ia}$ ), u cilju dostizanja preporučene nutritivne vrednosti (AI, EAR i UL)

Tabela 25. Distribucija uobičajenog unosa vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{dan}$ ), dobijena simulacijom kroz sedam scenarija obogaćivanja vektora -namirnica

**Tabela 26.** Pregled optimalnih i maksimalnih količina vitamina D koje se mogu dodati odabranim namirnicama da bi se zadovoljile potrebe srpske populacije za ovim vitaminom

## Spisak slika

Slika 1. Šematski prikaz osnovnih entiteta i njihovih veza u sastavljenom setu podataka o sastavu namirnica (Becker et al., 2007).

Slika 2. Oblici vitamina D u hrani

Slika 3. Šema semi-preparativne HPLC sa UV detektorom (Mrabet, 2018)

Slika 4. Selekcija grupe namirnica u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a

Slika 5. Selekcija kriterijuma za pretraživanje komponente pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za vitamin D<sub>3</sub>, koji su dobijeni kao analitički rezultat

Slika 6. Selekcija kriterijuma za pretraživanje komponente pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za vitamin D<sub>3</sub>, koji su dobijeni kao analitički rezultat -opšti

Slika 7. Selekcija kriterijuma za pretraživanje pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za ukupni vitamin D, koji su dobijeni kao analitički metod-ndefinisan

Slika 8. Selekcija kriterijuma za pretraživanje komponente pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za ukupni vitamin D, koji su dobijeni upotrebom HPLC-a

Slika 9. Saponifikovani uzorci

Slika 10. Sistem za ekstrakciju

Slika 11. Propuštanje i ispiranje uzorka na SPE kolonici

Slika 12. Šematski prikaz procesa kreiranje specijalizovane baze podataka o sadržaju vitamina D

Slika 13. HPLC hromatogrami dobijeni pri određivanju vitamina D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> u žumancima jaja iz intenzivne proizvodnje i malih domaćinstava: A-25(OH)<sub>3</sub> u jajima iz malih domaćinstava; B-25(OH)D<sub>3</sub> u jajima iz intenzivne proizvodnje, C-vitamin D<sub>3</sub> u jajima iz malih domaćinstava, D-vitamin D<sub>3</sub> u jajima iz intenzivne proizvodnje

Slika 14. Razlika u raspodeli nutritivnog unosa vitamina D između prosečnog unosa (crvena linija) ispitivane populacije i uobičajenog unosa (plava linija) određenog u programu SPADE

Slika 15. Glavni izvori vitamina D u posmatranoj srpskoj populaciji

Slika 16. Grafički prikaz distribucije uobičajenog unosa vitamina D

Slika 17. Šema razvoja prediktivnog modela za obogaćivanje namirnica vitaminom D

# 1. UVOD

Vitamin D je važan činilac razvoja skeleta kod dece i zdravlja kostiju kod odraslih. Njegov nedostatak vezuje se i za povećan rizik od kancera, infekcija, autoimunih i kardio-vaskularnih bolesti. U poslednjoj deceniji naučna istraživanja pokazala su da većina stanovništva koja živi iznad 40<sup>o</sup> geografske širine u većem delu godine zavisi od zaliha vitamina D u jetri i koži i od onoga što se unese hranom i suplementima (Holick & Chen, 2008). Studije statusa vitamina D u serumu pokazale su da 30-75% odraslih Evropljana ima neadekvatan status ovog vitamina (30-50 nmol/l) (Spiro & Buttriss, 2014). Pregled evropskih nacionalnih studija o ishrani, od 2000. godine na ovamo, ukazuje na to da je unos vitamina D u rasponu od 3-7,5 µg/dan u različitim evropskim zemljama, što je znatno ispod adekvatnog unosa (AI- Adequate Intake) od 15 µg/dan vitamina D, preporučenog od strane Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2016). U Evropi je rasprostranjenost neadekvatnog unosa 77-100% kod odraslih (19-64 god.) i 55-100% kod starijih osoba (<64 god.) (Roman Viñas et al., 2011).

Studije rađene u Srbiji pre više od 10 godina identifikovale su da je unos vitamina D kod odraslih osoba bio oko 5±3 µg/dan (Novakovic et al., 2012), što je ispod preporučenih 15 µg/dan (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2016), dok novija istraživanja ukazuju na neadekvatan status vitamina D u serumu, posebno kod gojaznih (Ilincic et al., 2017) i kod porodilja (Djekic-Ivankovic et al., 2016). Unos suplemenata sa vitaminom D kod odraslih osoba je sporadičan. Oblast obogaćivanja prehrambenih proizvoda u Srbiji nije regulisana pravilnicima, te je dodavanje vitamina D slabo zastupljeno (uglavnom obogaćena mleka, meki margarin i neki drugi prehrambeni proizvodi), i to na dobrovoljnoj bazi.

Da bi se mogao odrediti aktuelni nutritivni unos vitamina D u srpskoj odrasloj populaciji, koji bi bio uporediv s podacima iz drugih zemalja, kao i sa nutritivnim preporukama, važno je primeniti standardizovane metode za nutritivna merenja. Ona podrazumevaju upotrebu standardizovanih baza podataka o sastavu prehrambenih proizvoda, konkretno sadržaja

vitamina D u njima, i softverskih programa za izračunavanje prosečnog nutritivnog unosa u populaciji. Kako su ovo specifična merenja, razvoj navedenih instrumenata je preduslov za istraživanje.

Određivanje sadržaja vitamina D u prehrambenim proizvodima predstavlja jedan od velikih izazova u oblasti analize sastava hrane, jer je metodologija određivanja ovog vitamina veoma složena, skupa i dugotrajna i zahteva upotrebu vrhunske analitičke opreme. Sadržaj vitamina D u pojedinim prehrambenim proizvodima je često ispod nivoa detekcije, pa je samim tim i količina ovih podataka na svetskom nivou ograničena i raznolikog kvaliteta (u pogledu primenjenih metoda, starosti podataka, itd.) (Kiely & Black, 2012). Specijalizovana baza podataka o sadržaju vitamina D koja sadrži visoko kvalitetne analitičke podatke o sadržaju ovog nutrijenta u prehrambenim proizvodima omogućila bi upotrebu proverenih podataka u određivanju nutritivnog unosa. Pomenuta baza bi se takođe koristila kao osnova za razvoj prediktivnog modela obogaćivanja prehrambenih proizvoda ovim nutrijentom, u svrhu procene stepena povećanja unosa vitamina D na populacionom nivou, odnosno zadovoljavanja nutritivnih preporuka.

Imajući u vidu prethodno navedeno, kao i to da u Srbiji nema baze podataka o sadržaju vitamina D u prehrambenim proizvodima, niti se primenjuju standardizovane metode za nutritivna merenja, predmet ove doktorske disertacije biće formiranje baze podataka o sastavu prehrambenih proizvoda koji se konzumiraju u Srbiji, kao i razvoj prediktivnog modela koji bi omogućio određivanje količine vitamina D koja se unosi hranom.

Baza podataka bi se sastojala od analitički dobijenih podataka za vitamin D, prikupljenih iz evropskih baza podataka o sastavu namirnica, i dopunskim relevantnim podacima iz Srbije. Pored toga, analizom sadržaja vitamina D u jajima (iz intenzivne proizvodnje i iz malih domaćinstava) na tržištu Srbije, doprinelo bi se kvalitetu podataka o sadržaju vitamina D u glavnim prehrambenim izvorima u ishrani stanovnika Srbije.

Istraživanje u okviru ove disertacije identifikovalo bi koje su namirnice najčešći izvori vitamina D u aktuelnoj ishrani stanovništva Srbije i u kojoj meri se one uobičajeno konzumiraju. Pored toga, dobio bi se uvid i u druge namirnice koje su prioritetni činoci ishrane. One bi se potom razmatrale kao potencijalni vektori za obogaćivanje vitaminom D. Razvoj prediktivnog modela omogućio bi optimizaciju količine vitamina D koju bi trebalo dodavati pojedinim proizvodima, uzimajući u obzir uobičajenu ishranu stanovništva, preporučene nutritivne vrednosti, i gornje



granice dnevnog unosa, kako bi se ispoštovale smernice i preporuke vezane za bezbednost hrane.

Osnovni cilj doktorske disertacije je razvoj prediktivnog modela obogaćivanja prehrambenih proizvoda vitaminom D, prilagođenog nutritivnim potrebama stanovnika u Srbiji, primenom razvijenih instrumenata za nutritivna istraživanja.

## 2. PREGLED LITERATURE

### Uloga vitamina D u ljudskom organizmu

#### Metabolizam vitamina D

Vitamin D je liposolubilni vitamin i prohormon koji nastaje u koži od 7-dehidroholesterolu endogenom sintezom pod dejstvom UV- $\beta$  sunčeve svetlosti raspona 290-310 nm. U tom procesu formira se vitamin D<sub>3</sub> (holekalciferol) koji se vezuje za vitamin D vezujući protein (DBP) u plazmi i tako transportuje u jetru. Enzim *25-hidroksilaza* konvertuje vitamin D u 25(OH)D u jetri, da bi ga potom *1 $\alpha$ -hidroksilaza (1 $\alpha$ -OHaza)* hidrolizovala u aktivnu formu vitamina D, 1,25-dihidroksivitamin D, (1,25(OH)<sub>2</sub>D) u renalnom tkivu. DBP koji se takođe sintetise u jetri ima veći afinitet za vezivanje 25(OH)D od 1,25(OH)<sub>2</sub>D, pa je tako koncentracija 25(OH)D u cirkulaciji veća oko 1000 puta od 1,25(OH)<sub>2</sub>D i 99% je vezano za DBP (Brannon, Yetley, Bailey, & Picciano, 2008). Porast koncentracije 1,25(OH)<sub>2</sub>D smanjuje aktivnost *1 $\alpha$ -OHaze*, dok paratiroidni hormon (PTH) povećava njenu aktivnost u situaciji nedovoljne koncentracije 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Pored toga, renalna sinteza 1,25(OH)<sub>2</sub>D regulisana je prisustvom fosfora, kalcijuma i fibroblasta faktora rasta (FGF-23) u serumu. Mnoga ekstrarenalna tkiva takođe luče *1 $\alpha$ -OHazu* - osteoblasti, keratinociti (u koži), makrofage, dendriti, ćelije hipofize, T-limfociti, endotelium i ćelije paratiroidne žlezde i jajnika, sintetisajući 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Stoga vitamin D, pored regulatorne uloge u mineralizaciji kostiju i metabolizmu kalcijuma, ima auto- i parakrinu funkciju, koje se vezuju za imuni, kardiovaskularni i neuroendokrini sistem. Bez obzira da li je sintetisan u bubrezima ili ekstrarenalno, 1,25(OH)<sub>2</sub>D se vezuje za vitamin D receptore (VDR) čija široka rasprostranjenost u mnogim tkivima objašnjava mnoštvo fizioloških aktivnosti vitamina D. Vezivanjem za VDR, koji je faktor transkripcije DNK, 1,25(OH)<sub>2</sub>D reguliše direktno i indirektno ekspresiju oko 2000 gena i uz prisustvo drugih

receptora obezbeđuje gensku specifičnost i dalju diferencijaciju i proliferaciju ćelija (Wacker & Holick, 2013). Pored endogene sinteze, vitamin D se može usvajati iz hrane ili suplemenata, u formi D<sub>3</sub> -holekalciferola, koji potiče iz namirnica životinjskog porekla, ili D<sub>2</sub>-ergokalciferola, koji se sintetiše u gljivama i kvascima. Obe forme vitamina D se apsorbuju putem limfnog sistema, vezujući se za hilomikrone, koji se metabolišu u manje partikule, i prenose vitamin D u jetru (Brannon et al., 2008).

Vitamin D je u fokusu medicinskih i nutritivnih istraživanja u poslednjoj deceniji. Rezultati više medicinskih istraživanja u različitim zemljama ukazuju na vezu između nedostatka vitamina D i lošeg zdravlja kostiju - rahitis, osteoporoza, osteomalacija, padovi i prelomi, zubne bolesti, pada imuniteta/odgovora na infekcije (virusne i bakterijske), povišenog krvnog pritiska i drugih kardio-vaskularnih bolesti, različitih tipova kancera, dijabetesa, autoimunih bolesti kao što je multipla skleroza, te šizofrenije i depresije (Heaney, 2006; Holick & Chen, 2008).

### *Uloga vitamina D u skeletnom sistemu*

Intestinalna apsorpcija kalcijuma regulisana je 1,25(OH)<sub>2</sub>D-VDR sistemom, koji upravlja funkcijama epitelijalnih kanala za kalcijum i kalcijum-vezujući protein i brzinom apsorpcije kalcijuma. Slični efekti se primećuju u regulaciji apsorpcije fosfora. Indirektno, 1,25(OH)<sub>2</sub>D stimuliše genezu osteoklasta, kao i njihovu degradaciju, i oslobađanje kalcijuma i fosfora u cirkulaciju, te neo-mineralizaciju (Battault et al., 2013).

### *Uloga vitamina D u neskeletnim sistemima*

*Prevenција kancera:* 1,25(OH)<sub>2</sub>D potiskuje proliferaciju i stimuliše diferencijaciju ćelija kancera, utiče na angiogenezu različitim inhibitornim ili katalizujućim mehanizmima, utiče na ćelijsku fenotipizaciju i apoptozu ćelija kancera (Battault et al., 2013).

*Imuni sistem:* Vitamin D ima stimulatorno dejstvo na unutrašnji imuni sistem, podržavajući antimikrobne karakteristike monocita i makrofaga, aktivaciju ekspresije gena zaduženih za uništavanje ćelijskih membrana mikroba, i regulaciju sistema adaptivnog i autoimuniteta (Battault et al., 2013).

*Funkcija mišića:* VDR se nalazi u nukleusu i plazma membrani mišićnih ćelija sisara i vezuje se za sistem kanala za regulaciju usvajanja kalcijuma. Homeostaza kalcijuma je ključna za kontrakciju i relaksaciju mišića. Takođe,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  modulira proliferaciju, diferencijaciju i miogenezu mišićnih ćelija (Battault et al., 2013).

*Kardiovaskularni sistem:* PTH imaju uticaj na povišen krvni pritisak, dok  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  indirektno podešava krvni pritisak smanjujući nivo PTH. Vitamin D reguliše krvni pritisak smanjujući sintezu renina i na taj način usporava procese u renin-angiotenzin sistemu (RAS). Vitamin D - VDR je sastavni deo signalnih puteva sistema za kontrakciju kardiomiocita (Battault et al., 2013).

*Dijabetes:*  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  aktivira transkripciju humanih gena za insulinske receptore, u beta ćelijama pankreasa, što utiče na bolju insulinsku senzitivnost (Battault et al., 2013).

## Status vitamina D u svetu, Evropi i Srbiji

Metabolit vitamina D, koji predstavlja biomarker za određivanje koncentracije vitamina D u serumu, je  $25(\text{OH})\text{D}$  vitamin. U svetskoj naučnoj javnosti dugo se diskutuje na temu referentnih vrednosti vitamina D u serumu koje ukazuju na deficijenciju i insuficijenciju; budući da još uvek nema jasno određenih granica, ali se smatra da sve vrednosti koje su ispod  $50 \text{ nmol/l}$  ( $20 \text{ ng/ml}$ ) ukazuju na određeni stepen neadekvatnog nivoa vitamin D u serumu (Mithal et al., 2009). Problematični određivanja dodatno doprinosi i primena različitih metoda za određivanje vitamina D iz seruma za koje se pokazalo da ne daju uporedive rezultate. Metode koje se koriste su radio-imuno analize (RIA), testovi konkurentnog vezivanja proteina, hemoiluminiscentni imuno-testovi i HPLC (Hilger et al., 2014).

Široko prihvaćene referentne vrednosti objavljene od strane američkog Instituta za medicinu (Institute of Medicine-IOM) su sledeće: vitamin D deficijencijom smatraju se vrednosti ispod  $50 \text{ nmol/l}$  ( $20 \text{ ng/ml}$ ), insuficijencijom vrednosti između  $50\text{-}75 \text{ nmol/l}$  ( $21\text{-}29 \text{ ng/ml}$ ), adekvatan status vitamina D predstavljaju vrednosti iznad  $75 \text{ nmol/l}$  ( $30 \text{ ng/ml}$ ) koje maksimizuju efekat  $25(\text{OH})\text{D}$  na usvajanje kalcijuma i metabolizam mišića i kostiju, dok vrednosti iznad  $125 \text{ nmol/l}$  ( $50 \text{ ng/ml}$ ) ukazuju na hipervitaminozu D, odnosno intoksikaciju

(Ross, Taylor, Yaktine, & Del, 2011). Pored toga, Nordijske nutritivne preporuke, NNR iz 2012. god., definišu  $25(\text{OH})\text{D} < 25 \text{ nmol/l}$  kao deficijenciju, a  $25(\text{OH})\text{D} < 50 \text{ nmol/l}$  kao insuficijenciju. Radna grupa Endokrinog društva u svom vodiču za kliničku praksu osporava IOM preporuke, definišući vitamin D deficijenciju kao  $25(\text{OH})\text{D} < 50 \text{ nmol/l}$  i zalaže se da koncentracija  $25(\text{OH})\text{D}$  treba da bude viša od  $75 \text{ nmol/l}$  da bi se postigao maksimalan efekat vitamin D na metabolizam kalcijuma, kostiju i mišića. Spiro i saradnici (2014) navode četiri kategorije statusa vitamina D:  $25(\text{OH})\text{D} > 75 \text{ nmol/l}$  je dovoljan,  $50-74 \text{ nmol/l}$  - neadekvatan,  $25-49 \text{ nmol/l}$  - insuficijentan i  $< 25 \text{ nmol/l}$  - deficijentan.

Revijalne studije statusa vitamina D u svetu ukazuju na to da 88,1% svetske populacije ima  $25(\text{OH})\text{D}$  vrednosti ispod  $75 \text{ nmol/l}$ , 37,3% ispod  $50 \text{ nmol/l}$ , a 6,7% ispod  $25 \text{ nmol/l}$  (Hilger et al., 2014). Druga studija, pored ovih rezultata, ukazuje i na veliki nedostatak informacija o mnogim zemljama i regionima u svetu (Wahl et al., 2012). Studije pokazuju da deca i adolescenti u regionu Pacifika/Azije imaju niže vrednosti  $25(\text{OH})\text{D}$  od starijih grupa usled dužeg boravka u zatvorenim prostorijama, za razliku od regiona Bliskog istoka/Afrike gde su imali značajno veće vrednosti od odraslih jer provode više vremena izložena suncu. Žene ovog regiona imaju nižu vrednost  $25(\text{OH})\text{D}$  od ostalih grupa, što se dovodi u vezu s kulturom oblačenja. Više vrednosti primećene su u zemljama kao što su Tajland, koji je u ekvatorijalnom pojasu, gde je veća izloženost UV- $\beta$  zracima, kao i u Japanu, gde je ishrana bazirana na namirnicama bogatim vitaminom D, kao što su masne ribe. Iako su Severna Amerika, Kanada i Skandinavija regioni sa manjom izloženošću UV- $\beta$  zracima, kod njih su zabeležene najveće vrednosti  $25(\text{OH})\text{D}$  u serumu u odnosu na druge zemlje sveta, što se objašnjava dugogodišnjom praksom obogaćivanja namirnica (npr. mleka, sokova, cerealija, margarina, i dr.).

Generalno, u Evropi je ustanovljeno da je oko 50% stanovništva sa nedovoljnim sadržajem vitamina D u serumu (Hilger et al., 2014; Spiro & Buttriss, 2014). Kao uticajni faktori navođeni su: podneblje u kojem žive (geografska širina), život i rad pretežno u zatvorenim prostorijama, i druge kulturološke karakteristike, kao i nutritivni unos niži od preporučenih nutritivnih vrednosti (Hayes & Cashman, 2016; Spiro & Buttriss, 2014). Pored toga, studije ukazuju na očiglednu razliku između severa i istoka Evrope u nivoima  $25(\text{OH})\text{D}$ : skandinavske zemlje imaju generalno veće vrednosti nego južne evropske zemlje. Ove razlike objašnjavaju se različitom pigmentacijom kože, konzumacijom većih količina masnih riba, praksom

suplementacije i obogaćivanja namirnica vitaminom D u severnim zemljama (Hilger et al., 2014). U okviru pojedinih zemalja takođe se uviđaju razlike. Studija sprovedena u Francuskoj identifikovala je u odrasloj populaciji 43 nmol/l 25(OH)D na severu Francuske, a 94 nmol/l na jugu, gde je uticaj izlaganja sunčevom zračenju evidentan. Sezonske razlike u koncentraciji 25(OH)D zabeležene su širom Evrope: u Centralnoj Evropi u zimskom periodu prosečna vrednost je bila 28 nmol/l u Poljskoj i 45 nmol/l u Estoniji, dok su se vrednosti u letnjem periodu kretale od 45 nmol/l u Ukrajini, do 88 nmol/l u Mađarskoj. Prosečne godišnje vrednosti kretale su se od 35 nmol/l u Ukrajini, do 72 nmol/l u Belorusiji. Ove vrednosti približne su onim zabeleženim u Zapadnoj Evropi, gde je u zimskom periodu zabeleženo 33 nmol/l u Danskoj do 50 nmol/l u Austriji, dok su se letnje vrednosti kretale od 58-87 nmol/l 25(OH)D (Spiro & Buttriss, 2014).

Kešman i saradnici su 2016. objavili studiju u kojoj su prikazali primenu VDSP protokola (Vitamin D Standardization Program) na standardizaciju procene koncentracije 25(OH)D u serumu. VDSP je program koji ima za cilj da razvije protokole za standardizaciju merenja 25(OH)D u nacionalnim studijama zdravlja/ishrane u svetu, gde se različite metode za određivanje 25(OH)D u serumu ponovo proveravaju, odnosno, rade se analize seruma primenom sertifikovane LC-MS/MS metode koja omogućava dobijanje najpreciznijih rezultata o sadržaju ovog biomarkera do sada. Ova studija je prikupila 18 reprezentativnih evropskih populacionih studija - dece, adolescenata, odraslih i starijih osoba, obuhvativši 55844 ispitanika iz Evrope, i kreirala bio-banku uzoraka seruma. Serumi su analizirani primenom sertifikovane i standardizovane LC-MS/MS metode, da bi se ceo set podataka rekalisirao. Rezultati ove studije pokazali su da je serum 25(OH)D < 30 nmol/l kod 13% evropske populacije (od 55844 mladih i odraslih ispitanika), odnosno 17,7% u zimskom, a 8,2% u letnjem periodu. Učestalost insuficijencije vitamina D (25(OH)D < 50 nmol/l) procenjena je na 40,4% evropske populacije. Drugim rečima, desetina miliona ljudi u Evropi pate od nedostatka vitamina D (Cashman et al., 2016).

Deficijencija vitamina D kod odraslih osoba zabeležena je u mnogim zemljama Centralne i Istočne Evrope u zimskom periodu: u Srbiji (od 30 nmol/l) (Djekic-Ivankovic et al., 2016; Ilincic et al., 2017; Milenković, Dimić, Stanković, Aleksić, & Petrović, 2010) i Ukrajini (od 30 nmol/l) (Povoroznyuk, Balatska, Muts, Klymovytsky, & Synenky, 2012); u Bugarskoj (36 nmol/l kod

žena i 42 nmol/l kod muškaraca) (Borissova et al., 2013); u Estoniji (42 nmol/l) (Reinert-Hartwall et al., 2014); u Poljskoj (42 nmol/l) (Pludowski et al., 2014). Studija o statusu vitamina D u Bosni i Hercegovini utvrdila je da je prosečna vrednost 25(OH)D u serumu bila 48 nmol/l, sa rasponom od 7,5 nmol/l do 175 nmol/l. Rasprostranjenost deficijencije 25(OH)D < 25 nmol/l bila je 26%, a 25(OH)D < 50 nmol/l 35% (Sokolovic et al., 2017). U Srbiji, studija statusa vitamina D na kraju zimskog perioda (mart) kod mladih žena (prosečne starosti 25,5 god., BMI 20,7) utvrdila je da 90% ispitanica ima 25(OH)D < 50 nmol/l, a 70% ispitanica 25(OH)D < 30 nmol/l (Djekic-Ivankovic et al., 2015). Druga studija u Srbiji, sprovedena u periodu od maja do oktobra, pokazala je da je nivo 25(OH)D znatno niži kod gojaznih (33,5±15,2 nmol/l) nego kod ispitanika normalne težine (60,1±23,1 nmol/l) (Ilincic et al., 2017). Ovi rezultati su u skladu sa nalazima prethodnih studija, koje sugerišu da se porastom BMI smanjuje nivo vitamina D. Predloženi su različiti mehanizmi koji objašnjavaju vezu između gojaznosti i niskog statusa vitamina D (Drincic, Armas, Van Diest, & Heaney, 2012; Foss, 2009; Ilincic et al., 2017; Stokić et al., 2015; Vimalleswaran et al., 2013). Studije na ženama u menopauzi (60±6 god., dužina menopauze 15±9 god.) pokazale su da je prosečna koncentracija 25(OH)D u serumu bila 46,45 ± 14,68 nmol/l, dok skoro 90% žena sa osteoporozom pati od deficijencije vitamina D (Milenković et al., 2010).

Posledice ovih činjenica ogledaju se, između ostalog, u velikom ekonomskom opterećenju zdravstvenih fondova na nacionalnom i globalnom nivou. Naime, procenjeno je da se oko 64% ukupnog zdravstvenog osiguranja u evropskim zemljama troši, direktno i indirektno, na lečenje i negu obolelih od bolesti koje nastaju usled nedostatka vitamina D (Grant et al., 2009).

## Nutritivni unos vitamina D u svetu, Evropi i Srbiji

### Preporučene nutritivne vrednosti za vitamin D

Preporučene nutritivne vrednosti (DRV) za vitamin D imaju ključnu ulogu u prevenciji deficijencije vitamina D. Međunarodne organizacije javnog zdravlja (IOM; EFSA; NORDEN; SACN) izdale su prethodnih godina preporuke za DRV koje se međusobno razlikuju (tabela 1.).

**Tabela 1.** Poređenje aktuelnih međunarodnih preporuka o DRV za vitamin D sa novom dvostepenom ODIN IPD analizom najkvalitetnije kolekcije RCT podataka (ukupno n=882 učesnika) (Cashman, Ritz, & Kiely, 2017)

Ime organizacije: definisane DRV	Kriterijum primenjen od strane organizacije	Preporuke organizacije (µg/dan)	ODIN IPD-izvedene vrednosti (µg/dan)
IOM: RDA	Unos bi zadovoljio potrebe 97,5% individua sa serum 25(OH)D > 50 nmol/l	15	26
NORDEN: RI	Unos bi zadovoljio potrebe 97,5% individua sa serum 25(OH)D > 50 nmol/l	10	26
EFSA: AI	Unos bi zadovoljio potrebe 97,5% individua sa serum 25(OH)D > 50 nmol/l	15	26
SACN: RNI	Unos bi zadovoljio potrebe 97,5% individua sa serum 25(OH)D > 25 nmol/l	10	10
IOM: EAR	Unos bi zadovoljio potrebe 50% individua sa serum 25(OH)D > 40 nmol/l	10	4,5
NORDEN: AR	Unos bi zadovoljio potrebe 50% individua sa serum 25(OH)D > 50 nmol/l	7,5	11

IOM, Institute of Medicine; EAR, Estimated Average Requirement (procenjene prosečne potrebe); NORDEN, Nordic Nutrition Recommendations; AV, Average Requirement (prosečne potrebe); RDA, Recommended Daily Allowance (preporučene dnevne potrebe); RI, Recommended Intake (preporučeni unos); EFSA, European Food Safety Authority; AI, Adequate Intake (adekvatni unos); SACN, UK Scientific Advisory Committee on Nutrition; RNI, Reference Nutrient Intake (referentni unos nutrijenta).



Da bi se uradila preciznija procena potreba evropskog stanovništva, u okviru projekta ODIN (Food-based solutions for optimal vitamin D nutrition and health through the life cycle), prvi put je urađena meta-regresivna analiza podataka na individualnom nivou učesnika (IPD-individual participant data), uzetih iz sedam randomizovanih kliničkih studija (RCT-randomised clinical trials) sa 882 učesnika od 4-90 godina starosti. Modeli su pratili korelacije unosa vitamina D i promene koncentracija 25(OH)D u serumu. Procene potreba za vitaminom D rađene su za 97,5% populacije, radi postizanja nivoa serum 25(OH)D > 25 nmol/l, > 30 nmol/l, > 50 nmol/l. Za razliku od ovog pristupa, međunarodne organizacije koristile su standardne modele za meta-regresivnu analizu združenih podataka koji ne uzimaju u obzir interpersonalnu varijabilnost u odgovoru serum 25(OH)D na unos vitamina D. Tabela 1. takođe prikazuje procene DRV na osnovu ovog IPD modela (Cashman, Ritz, & Kiely, 2017).

## Unos vitamina D u svetu i Evropi

Prirodni nutritivni izvori vitamina D su veoma ograničeni, što je i uzrok nedovoljnog unosa vitamina D putem hrane. Pojedini prehrambeni proizvodi životinjskog porekla sadrže značajnije količine vitamina D – ribe hladnih mora (posebno njihova jetra), jaja, meso, mlečni proizvodi, a i kvasci i pečurke koje sadrže manje dostupnu formu D vitamina, D<sub>2</sub>-ergokalciferol. Ovi prehrambeni proizvodi se neredovno i nedovoljno, a u određenim populacijama (npr. kod vegetarijanaca, ljudi koji su netolerantni na laktozu, alergični na jaja, itd.) uopšte ne konzumiraju, da bi mogle da se zadovolje dnevne potrebe za ovim vitaminom. Dijetetski suplementi, kao alternativni nutritivni izvori vitamina D, mogu značajno povećati unos.

Kalvo i saradnici su 2005. godine dali zbirni pregled studija o unosu vitamina D u svetu. Ovaj pregled obuhvatio je velike nacionalne studije o ishrani, kao i manje ciljane kliničke studije lokalnog karaktera, koje su izveštavale o unosu vitamin D, kako iz hrane tako i iz suplemenata, u prethodnih 25 godina. Broj studija nije bio velik, i podaci za mnoge zemlje sveta nisu postojali u tom momentu. Na osnovu prikupljenih podataka, zemlje su podeljene u tri kategorije: I - zemlje u kojima je obavezno obogaćivanje prehrambenih proizvoda vitaminom

D (kao što su mleko, margarin, i dr.) - SAD i Kanada; **II** - zemlje u kojima je obogaćivanje prehrambenih proizvoda (npr. margarin i cerealije) na dobrovoljnoj bazi - Velika Britanija, Irska i Australija; **III** - zemlje u kojima se prehrambeni proizvodi ne obogaćuju vitaminom D - neke zemlje Evrope i sveta. Poređenje ove tri kategorije u pogledu AI i RNI (preporučenog unosa nutrijenta), koji je 5 µg/dan, kao i međusobno, pokazalo je da je u zemljama u kojima je obogaćivanje obavezno unos vitamina D veći za 2-4 µg/dan nego u zemljama iz druge kategorije, gde su sve starosne grupe bile ispod AI. Treća kategorija je imala nešto veći unos, što je bilo vezano za činjenicu da su to zemlje, kao Norveška i Japan, u kojima visoka konzumacija ribe ima značajan udeo u ukupnom unosu vitamina D.

Ova studija izložila je komparativnu analizu udela grupa namirnica i suplemenata u ukupnom unosu vitamina D. Pokazalo se da Amerikanci (unos vitamina D: M – 8,12 µg/dan, Ž – 7,33 µg/dan) najveći deo vitamina D uzimaju iz suplemenata (M - 30%, Ž - 40%) i obogaćenog mleka (M - 58%, Ž - 39%). Britancima je unos vitamina D (M – 4,2 µg/dan, Ž – 3,7 µg/dan) manje-više „raspoređen“ na suplemente (M - 12%, Ž - 24%), meso (M - 21%, Ž - 16%), ribu (M - 18%, Ž - 19%), margarin (M - 17%, Ž - 13%) i cerealije (M - 17%, Ž - 16%). Podaci o japanskim ženama (unos – 7,1 µg/dan) ukazuju na ribu kao osnovni izvor vitamina D (91%), dok ga Norvežani (M – 6,8 µg/dan, Ž – 5,9 µg/dan) dobijaju iz suplemenata (M - 42%, Ž-49%), ribe (M - 27%, Ž - 26%) i obogaćenog margarina (M - 27%, Ž - 23%) (Calvo, Whiting, & Barton, 2005).

Kalvo i saradnici (2005), kao i Krou i saradnici (2010) ukazuju na potencijalni rizik od razvoja deficijencije vitamina D kod vegetarijanaca i vegana, jer je unos vitamina D kod vegetarijanaca 1,2 µg/dan, a kod vegana 0,7 µg/dan, dok su koncentracije 25(OH)D < 50 nmol/l u serumu, u obe grupe, u zimskom periodu (Crowe et al., 2010).

Utvrđena je tendencija da udeo suplemenata u ukupnom unosu vitamina D raste sa starošću, a generalno je konzumacija veća kod žena (Calvo et al., 2005). Takođe, utvrđeno je da odojčad i starije osobe konzumiraju suplemente (Whiting et al., 2011), češće nego deca, adolescenti i mladi, koji takođe mogu biti izloženi riziku od deficijencije usled ubrzanog rasta (Black et al., 2013). Generalno, procenat populacije koja ih konzumira relativno je mali (Cashman & Kiely, 2014; Flynn et al., 2009). Pored toga, sadržaj vitamina D u suplementima znatno varira i odstupa od deklariranih količina (Verkaik-Kloosterman, Seves, & Ocké, 2017).

Novija studija Spiro-a i Buttriss-a iz 2014. daje pregled unosa vitamina D u Evropi. Nastojanja da se uradi ovakva analiza otežana su činjenicom da su u različitim studijama korišćene

različite metode, postoje varijacije u tehnikama nutritivnih merenja, starosnoj klasifikaciji, kao i ograničenja u dostupnosti baza podataka o sastavu namirnica. U Evropi se radi na harmonizaciji nutritivnih istraživanja, ali je ova studija rađena na osnovu dostupnih studija u datom momentu. Stoga ona daje širu perspektivu o ovoj situaciju u brojnim zemljama u Evropi kao i uvide u različite strategije za povećanje unosa vitamina D (Spiro & Buttriss, 2014).

Najveći doprinos utvrđivanju uobičajenog unosa vitamina D iz hrane dala je EPIC (*European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition*) studija koja je koristila jedan, standardizovan, dvadesetčetvoro-časovni upitnik o ishrani (24HDR) i standardizovane baze podataka o sastavu namirnica. U studiji su učestvovala odrasle osobe iz 10 evropskih zemalja (Grčka, Španija, Italija, Francuska, Nemačka, Holandija, Velika Britanija, Danska, Švedska i Norveška). Kada su podaci svih ovih zemalja analizirani zbirno, utvrđeno je da je prosečan unos vitamina D kod žena 3,3 µg/dan i 4,8 µg/dan kod muškaraca, iako su varijacije među zemljama bile značajne. Na primer, ispitanici iz Švedske imali su čak za 80% veće vrednosti od ovih prosečnih. EFSA je 2012. godine takođe ukazala na značajne razlike u prosečnom unosu u 14 evropskih zemalja - unos iz hrane bio je u rasponu od 1,1 µg/dan (u Španiji, kod žena od 18-24 god.) do 8,2 µg/dan (u Finskoj, kod muškaraca od 25-74 god.). Za unos iz hrane i suplemenata ovaj raspon iznosio je od 3,1 µg/dan (kod Irkinja od 18-35 god.) do 23,5 µg/dan (kod odrasle norvežanske populacije koja je imala značajan unos n-3 polinezasićenih masnih kiselina iz ribe i suplemenata).

Slične rezultate imala je i studija EURRECA (EUROpean micronutrient RECommendations Aligned Network of Excellence) prema kojoj je najniži prosečan unos u Španiji (<2 µg/dan), između 3 - 4 µg/dan u većini drugih evropskih zemalja, a najviši u Švedskoj (M – 6,1 µg/dan, Ž – 4,8 µg/dan), Finskoj (M – 7,1 µg/dan, Ž – 5,2 µg/dan) i Norveškoj (M – 10,9 µg/dan, Ž- 10,1 µg/dan). Ovi komparativni pregledi daju širu sliku unosa vitamina D u Evropi, ali ne omogućavaju detaljne uvide u obrasce unosa i uticaja konzumacije suplemenata na individualnom nivou Evropljana.

Skorašnja studija sprovedena u sedam evropskih zemalja, u sklopu projekta Food4Me (Manios, Moschonis, Lambrinou, et al., 2017) razmatrala je odnose između statusa vitamina D, fizičke aktivnosti i unosa vitamina D kod odrasle populacije, koristeći harmonizovanu metodologiju za prikupljanje i analizu podataka. Rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u unosu vitamina D ( $p=0,006$ ) između onih sa vitamin D deficijencijom (25(OH)D <30

nmol/l) –  $3,26 \pm 2,08$  µg/dan, vitamin D insuficijencijom (25(OH)D = 30-49 nmol/l) –  $3,79 \pm 2,32$  µg/dan i onih sa adekvatnim serum vitaminom D (25(OH)D > 50 nmol/l) –  $4,2 \pm 2,61$  µg/dan. Ova korelacija je još značajnija ( $p < 0,001$ ) kada se unosu priključi i uticaj unosa suplemenata, pri čemu je ukupni unos vitamina D  $3,68 \pm 2,94$  µg/dan;  $4,42 \pm 3,42$  µg/dan;  $7,44 \pm 11,2$  µg/dan, respektivno. Pored suplemenata, najznačajniji izvori vitamina D u ishrani onih sa adekvatnim statusom vitamina D su, opadajućim redom: meso i riba, jaja, masnoće i namazi (margarin), obogaćena pića, cerealijske, dok je unos ovih namirnica niži kod onih sa insuficijencijom i deficijencijom vitamina D.

## Unos vitamina D u Srbiji

U Srbiji do sada nije urađena ni jedna studija dizajnirana tako da omogući kvalitetnu procenu unosa vitamina D među populacijom. Ipak, ima nekoliko studija koje ukazuju na neadekvatan unos vitamina D iz hrane kod odrasle populacije. Revijalna studija iz 2012. godine (Novakovic et al., 2012) analizirala je podatke iz JUSAD studije (Jugoslovenska studija o prekursorima ateroskleroze kod predškolske dece u Srbiji od 1998-2003) koja je sprovedena na deci i njihovim porodicama, metodom istraživanja potrošnje hrane u domaćinstvu. Ustanovljeno je da je prosečan unos vitamina D iz hrane kod odrasle populacije (30-60 god.) bio  $5 \pm 3$  µg/dan, i kod muškaraca i kod žena, dok je unos kod dece bio  $4 \pm 3$  µg/dan i  $3 \pm 2$  µg/dan, kod dečaka i devojčica, respektivno. Slični rezultati dobijeni su i u novijoj studiji na odraslim, mladim, zdravim ženama: procenjen je unos od 4 µg/dan (primenom prilagođenog upitnika o učestalosti konzumacije - FFQ). Glavni izvor vitamina D bila je riba, koja se inače malo koristi (samo 3,1% od ukupne potrošnje na hranu), konzumacija obogaćenih namirnica nije zabeležena, dok je samo 4,7% ispitanica koristilo vitamin D u okviru multivitaminskih suplemenata (Djekic-Ivankovic et al., 2015).

## Nutritivni izvori vitamina D

Vitamin D predstavlja grupu sekosteroida čiji su predstavnici ergokalciferol (vitamin D<sub>2</sub>) i holekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>). Ergokalciferol nastaje UV-β zračenjem ergosterola koji se nalazi u nekim biljkama, gljivama i beskičmenjacima. Holekalciferol nastaje od 7-dehidroholesterolu UV-β zračenjem, u koži kičmenjaka. Dalji metaboliti ove dve forme vitamina D su 25(OH)D<sub>2</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> koji predstavljaju glavne oblike vitamina D u cirkulaciji. Glavni izvori vitamina D (holekalciferola i 25(OH)D<sub>3</sub>) nalaze se u namirnicama životinjskog porekla - ribi, mesu, iznutricama, jajima i mlečnim proizvodima. U razmatranje se uzima 25(OH)D<sub>3</sub> jer je biološki aktivan metabolit i ima 4-5 puta bolju bioaktivnost nego holekalciferol. Vitamin D<sub>2</sub> i njegov metabolit 25(OH)D<sub>2</sub> imaju manju biološku aktivnost ka povećanju serum 25(OH)D. Šmid i Valter su 2013. godine objavili revijalni rad u kojem su uporedno naveli mnogobrojne rezultate drugih istraživača koji su se bavili određivanjem sadržaja vitamina D. Ukazali su na veliku varijabilnost u sadržaju vitamina D, kako među istim namirnicama, tako i među grupama namirnica. Ove razlike vezuju se za različite metode analize, različite načine ishrane i gajenja životinja, različit sadržaj masnih frakcija u uzorcima, sezone u kojoj je hrana proizvedena, i drugo. Analiza je pokazala da su različite ribe hladnih mora (losos, pastrmka, bakalar, haringa, i druge) najznačajniji izvor ovog nutrijenta, <2 µg/kg do 477 µg/kg, a posebno riblja jetra 1200 µg/kg. Iznutrice životinja, pre svega jetra, predstavljaju značajan izvor sa do 140 µg/kg, dok je on mnogo niži u mišićnom tkivu životinja (do 10 µg/kg), s razlikama između vrsta životinja i delova mesa. U jajima se vitamin D nalazi isključivo u žumancetu, a zabeležene količine ovog vitamina su do 57 µg/kg. Mleko i mlečni proizvodi, bez obogaćivanja, imaju nizak sadržaj vitamina D, pa su u ovoj grupi značajni samo puter i neki masni sirevi, sa do 10 µg/kg vitamina D (Schmid & Walther, 2013).

## Obogaćivanje namirnica u svetu, Evropi i Srbiji

Komisija Codex Alimentarius je 1987. godine definisala osnovne principe dodavanja nutrijenata prehrambenim proizvodima. Ona ovaj proces naziva „Fortifikacijom“ ili „Obogaćivanjem“ i definiše ga: „Fortifikacija ili obogaćivanje znači dodavanje jednog ili više osnovnih nutrijenata prehrambenom proizvodu, nezavisno od toga da li se on prirodno nalazi u tom proizvodu, radi sprečavanja ili ispravljanja potvrđenog nedostatka jednog ili više nutrijenata u populaciji ili specifičnoj populacionoj grupi“ (Codex Alimentarius Commission, 1987). Obogaćivanje prehrambenih proizvoda vitaminom D u svetu se primenjuje skoro čitav vek, i postoje različite prakse - u pogledu nivoa regulacije (obavezna ili dobrovoljna), odnosno vrste i broja prehrambenih proizvoda koji se obogaćuju. Takođe, stepen efikasnosti ovih strategija razlikuje se od zemlje do zemlje usled primenjivanja različitih strategija (da li je obavezna i/ili dobrovoljna), broja prehrambenih proizvoda koji se obogaćuju, sadržaja vitamina D u njima, i dr.

Dobrovoljno obogaćivanje podrazumeva samostalnu odluku proizvođača da dodaje vitamine ili minerale hrani, radi nadoknađivanja nutrijenata izgubljenih tokom prerade/proizvodnje, odnosno usled obezbeđivanja nutritivnog balansa u supstitutima prehrambenih proizvoda i poboljšavanja nutritivnih vrednosti u prehrambenim proizvodima (The European Parliament & Council of The European Union, 2006).

SAD i Kanada imaju strogo definisanu regulativu vezanu za obogaćivanje namirnica. U SAD vitamin D se smatra GRAS supstancom (Generally Regarded As Safe - generalno smatrano bezbednim) i kao takav može se primenjivati uz stroga ograničenja vezana za vrste prehrambenih proizvoda, njihovu funkcionalnu primenu i količinu konzumacije. Iako dodavanje vitamina D u SAD nije obavezno u većini slučajeva, mleko i proizvodi od mleka (mleko u prahu, kondenzovano mleka, itd.) rutinski se obogaćuju, i moraju imati oznaku da su obogaćena. Regulativa u SAD definiše količine vitamina D koje se mogu (opciono) ili moraju (obavezno) dodati određenim proizvodima (tabela 2.).

**Tabela 2.** Regulatorna o dodavanju vitamina D u prehrambene proizvode u SAD (Calvo et al., 2004)

Prehrambeni proizvodi	Status obogaćivanja	Maksimalna dozvoljena doza dodavanja vitamina D	Procena realnog obogaćivanja proizvoda	Uobičajena doza dodavanja vitamina D
Obogaćena farina	Opciono	8,75 µg/100 g	Nekoliko	
Instant cerealije	Opciono	8,75 µg/100 g	Većina	1-3,5 µg/100 g
Obogaćeni pirinač, palenta, rezanci i makaroni	Opciono	2,25 µg/100 g	Nijedan ili veoma malo	Do 1 µg/252 g
Mleko (tečno, kiselo, sa kulturama, koncertovano, obezmašćeno, kondenzovano, u prahu)	Opciono/obavezno*	1,05 µg/100 g	Sva	10 µg/ 946 ml (kvart)
Jogurti (obični, sa smanjenim masnoćama, obezmašćeni)	Opciono	2,2 µg/100 g	Nekoliko	1-2 µg/prosečna porcija
Margarin	Opciono	8,25 µg/100 g	Nekoliko	1-3,5 µg/prosečna porcija
Kalcijumom obogaćeni voćni sokovi i pića	Opciono	2,5 µg/prosečna porcija	Nepoznato	2,5 µg/prosečna porcija

\*Obavezno se obogaćuju obezmašćena i kondenzovana mleka

U stvarnosti, rutinski se obogaćuju samo tečno mleko i instant cerealije, a to su i dominantni izvori vitamina D u SAD.

U Kanadi, vitaminom D obavezno se obogaćuju mleko i alternativni napici od soje, badema i žitarica i margarin. Obogaćivanje mleka i napitaka mora biti prilagođeno tako da uobičajena porcija od 250 ml zadovolji 44% dnevne preporuke od 10 µg/dan. Margarin mora biti obogaćen sa 13,25 µg/100 g. Mlečni proizvodi (na primer jogurt) mogu biti proizvedeni od obogaćenog mleka, dok nije dozvoljeno obogaćivanje proizvoda od žitarica (farina, instant cerealija itd.), sira, kalcijumom-obogaćenih voćnih napitaka. Formule za odojčad se obavezno obogaćuju u obe zemlje. Pored toga, dozvoljeno je obogaćivanje različitih zamena za obrok (Calvo et al., 2004; Calvo & Whiting, 2013). Iako je u obe zemlje regulatorna jasna i strogo definisana, broj obogaćenih namirnica koje se opciono mogu obogaćivati je mali. Ovakva situacija odražava se i na meru nutritivnog unosa vitamina D u populaciji. Naime, analizom

podataka američke studije o ishrani - HNANES, od 2003-2008., utvrđeno je da je 70-94% populacije bilo ispod preporučenog nivoa EAR (10 µg/dan) za vitamin D, iako su konzumirali i obogaćene prehrambene proizvode (Dwyer et al., 2014; Fulgoni, Keast, Bailey, & Dwyer, 2011).

Pre 2006. godine, u državama članicama Evropske Unije, nacionalne regulative koje su uređivale dobrovoljno obogaćivanje namirnica međusobno su se značajno razlikovale. Zemlje kao Irska i Ujedinjeno Kraljevstvo dozvoljavale su slobodno obogaćivanje raznih namirnica različitim nutrijentima, u različitim dozama, dokle god nisu ugrožavali bezbednost tih namirnica, tj. dok nisu narušavali zdravlje i deklarisanje nije dovodilo potrošače u zabludu. Nordijske zemlje (Norveška, Danska, Finska i Švedska) su tradicionalno bile isključive u svojim politikama vezanim za dobrovoljno obogaćivanje, smatrajući ih nepotrebnim i potencijalno škodljivim, zahtevajući utvrđivanje stvarnih zdravstvenih potreba stanovništva da bi se opravdalo obogaćivanje. Danska i Italija su zahtevale traženje dozvole za dobrovoljno obogaćivanje, dok su u Nemačkoj, Holandiji i Finskoj postojale stroge kontrole za korišćenje različitih nutrijenata (kao što su liposolubilni vitamini i neki minerali) radi obogaćivanja namirnica. Regulatorna tela Evropske Unije videla su ove varijacije u politikama kao prepreku za slobodnu trgovinu u okvirima Evropske Unije te su 2006. godine Evropski parlament i Evropski Savet usvojili Regulativu 1925/2006 o dodavanju vitamina i minerala i određenih drugih supstanci namirnicama (The European Parliament & Council of The European Union, 2006). Ova regulativa izazvala je široku debatu o koristi, ali i o potencijalnim rizicima u vezi sa dobrovoljnim obogaćivanjem. Regulativa je usvojena da bi se ujednačila legislativa o dodavanju mikronutrijenata hrani i obezbedilo slobodno kretanje roba u okvirima EU. Ova regulativa predviđa listu svih supstanci koje se mogu koristiti za obogaćivanje. Iako joj je cilj bio ujednačavanje prakse obogaćivanja namirnica, neke zemlje u EU i dalje primenjuju svoje nacionalne politike vezane za ovu praksu (Hennessy, Walton, & Flynn, 2013). Primer za to je Finska - zemlja koja pitanje obogaćivanja namirnica vitaminom D razvija i unapređuje dugi niz godina. Naime, od 2003. godine Finska primenjuje regulativu u kojoj se sistematski (ali ne i obavezno) obogaćuju masni namazi (koji ne uključuju puter) do koncentracije od 10 µg/100 g i sva tečna mleka (osim organski proizvedenih), uključujući i mleka bez laktoze, od soje i od žitarica, do koncentracije od 0,5 µg/100 g (FINLEX<sup>®</sup>, 2002). Ove mere dovele su do poboljšanja



u statusu vitamina D. Ipak, pokazalo se da ono nije bilo zadovoljavajućeg intenziteta, davalo je kontradiktorne rezultate kod mladih odraslih muškaraca (Laaksi et al., 2006; Välimäki, Löyttyniemi, & Välimäki, 2007), što je ukazivalo na to da neke grupe (mlade žene) nisu obuhvaćene ovim merama (Lehtonen-Veromaa et al., 2008) ili su mere bile nedovoljno efikasne (kod dece) (Piirainen, Laitinen, & Isolauri, 2007). Kao rezultat, 2010. godine u Finskoj su objavljene nove preporuke, kojima se podržava duplo povećanje količina dodatog vitamina D, tako da masni namazi/margarini treba da budu obogaćeni sa do 20 µg/100 g, a tečna mleka i alternativni napici sa 1 µg/100 g vitamina D (National Nutrition Council, 2010). Mlečna industrija je brzo odgovorila na ove preporuke, obogaćujući skoro sva mleka na tržištu (osim organski proizvedenih), tako da poneka mleka i jogurti sadrže i do 2 µg/100 g (Itkonen & Lamberg-Allardt, 2016). Ove mere odrazile su se pozitivno na poboljšanje unosa vitamina D u finskoj populaciji, pa je najnovija studija iz 2017. pokazala da je značajno poboljšan status 25(OH)D tokom 11 godina, tj. između dve nacionalne studije zdravlja - H2000 i H2011. U H2000 status je bio 46,9 nmol/l, a u H2011 61,7 nmol/l; prevalenca deficijencije (25(OH)D < 50 nmol/l) smanjena je, sa 58,5% na 13,7% odrasle populacije. Autori tvrde da je ovo poboljšanje delom sigurno posledica većeg obogaćivanja prehrambenih proizvoda, ali i opšteg obrazovanja populacije o važnosti unosa vitamina D kroz hranu i kroz suplemente. Unos vitamina D samo iz hrane porastao je sa 7 µg/dan (kod muškaraca i žena) u H2000, na 14 µg/dan i 12 µg/dan (kod muškaraca i žena, respektivno) u H2011. Studija je takođe pokazala da je 91% onih koji su uzimali glavne izvore vitamina D (ribu ≥ 2 puta nedeljno, i mlečne obogaćene proizvode i masne namaze, redovno) dostiglo dovoljan nivo serum 25(OH)D u H2011 (Jääskeläinen et al., 2017).

U Norveškoj, regulativa i dalje zahteva traženje dozvole za obogaćivanje od Norveške agencije za bezbednost hrane. Studije o ishrani u Norveškoj pokazale su da je upotreba suplemenata vitamina D veoma prisutna (čak 47% muškaraca i 58% žena ih konzumira), te da je stoga potreba za obogaćivanjem namirnica smanjena, odnosno postoji rizik od prelaska UL vrednosti u slučaju nekontrolisanog obogaćivanja namirnica. Zbog toga VKM (Norveški naučni komitet za Bezbednost Hrane) daje mišljenje da maksimalna količina vitamina D koja može biti dodata namirnici može biti do 2 µg/100 kcal, ako se pretpostavi da je 15% energetskog (E) dnevnog unosa iz obogaćene hrane (Norwegian Scientific Committee for Food Safety,

2013). U Danskoj je situacija slična. Iako je od 2005. godine bilo dozvoljeno dobrovoljno obogaćivanje, nevelik je broj proizvoda (masnih namaza, sportskih napitaka i mleka bez laktoze) bio dostupan na tržištu. Krajem 2017. godine Danska Administrativna Agencija za Veterinu i Hranu izdala je Izvršni nalog za dodavanje vitamina i minerala prehrambenim proizvodima (Danish Veterinary and Food Administration, 2017) koji je stupio na snagu 1. januara 2018., a definiše maksimalne količine vitamina koji se mogu dodati određenim proizvodima (tabela 3.).

**Tabela 3.** Maksimalni sadržaj vitamina D koji se može dodavati u različite tipove prehrambenih proizvoda u Danskoj (Danish Veterinary and Food Administration, 2017)

Prehrambeni proizvod	Maksimalni sadržaj vitamina D na nutritivnoj deklaraciji na 100 g ili 100 ml
Bezalkoholna pića na bazi vode, sa ili bez aroma, uključujući na primer voćni sok, sok od povrća i sl.	0,8 µg
Bezalkoholna pića na bazi vode, sa ili bez aroma, sa dodatim kofeinom sa sadržajem iznad 15 mg/100 ml	0,8 µg
Bezalkoholna pića na bazi vode, gde je proteinski sastav 20% energije namirnice, a energetska vrednost najmanje 420 kJ (100 kcal)/100 ml	0,8 µg
Elektrolitska pića koja se prodaju u jedinstvenim pakovanjima (ne uključujući proizvode za mlađe od 18 god.)	1,0 µg
Mleko	1,5 µg
Piće bazirano na mleku (fermentisano i/ili sa ukusom), uključujući mlečne mešavine u prahu	1,5 µg
Napici od pirinča	0,75 µg
Napitak od soje	0,75 µg
Instant cerealije	4,2 µg
Ražani hleb	1,5 µg
Margarin i mešavine (za mazanje i tečni)	20 µg
Biljna ulja	5 µg
Fermentisani mlečni proizvodi (ne uključuje napitke)	4 µg
Fermentisani proizvodi na bazi soje, pirinča, ovsu (ne uključuje napitke)	0,75 µg
Mleko bez laktoze	2 µg
Fermentisani mlečni proizvodi bez laktoze (ne uključuje napitke)	1,0 µg
Biljni čokoladni mus	0,75 µg
Kondenzovano mleko	2,6 µg
Čokolade, štangle i sl.	6,3 µg
Biskviti, keksi i sl.	7,5 µg
Zamene za obroke za kontrolu težine, sa energijom ispod 3360 kJ (800 kcal), poznate i kao Niskokalorična dijeta	19 µg (maksimalni sadržaj po preporučenoj dnevnoj količini-označeno na proizvodu)
Zamene za 1-2 obroka (uključujući i one za kontrolu težine)	2,5 µg (maksimalni sadržaj po obroku)

U Švedskoj se od ove godine uvodi proširenje obaveznog obogaćivanja nekih prehrambenih proizvoda: mleko, napici biljnog porekla i mlečni proizvodi bez laktoze (do 3% m.m.) moraju sadržati 0,95-1,1  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , fermentisana mleka i biljne alternative 0,75-1,1  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Mleka sa aromom, mlečni i alternativni proizvodi sa šećerom i zaslađivačima kao i sir nisu obuhvaćeni ovim merama. Margarin, mešane jestive masnoće i odgovarajući tečni oblici masnoća moraju sadržati 19,5-21  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Čak i organski proizvedeni proizvodi moraju se obogaćivati da bi se mogli prodavati u Švedskoj (Swedish Food Administration, 2018).

U Holandiji, regulativa ograničava dobrovoljno obogaćivanje masnih namaza (margarina i masnoća za kuvanje i pečenje) na 7,5-10  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , dok je za sve druge prehrambene proizvode ovo ograničenje na 4,5  $\mu\text{g}/100\text{ kcal}$ . Ovo znači da svi proizvodi koji su obogaćeni do ovog nivoa mogu slobodno da se puste na tržište bez posebnih dozvola, dok se za proizvode čije obogaćivanje prevazilazi ove granice, mora tražiti posebna dozvola (Minister van Volksgezondheid, 2007).

U Nemačkoj, regulativa strogo ograničava obogaćivanje prehrambenih proizvoda vitaminom D. Izuzeci su masni namazi i mešana ulja (do 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), proizvodi za specifičnu ishranu npr. gubljenje težine - 1,6  $\mu\text{g}/\text{porciji}$  i hrana za bebe -15  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Razlozi za ova ograničenja leže u činjenici da je 1942. godine došlo do incidenta prekomernog dodavanja vitamina D mleku, čime je izazvan prekomerni unos vitamina D kod dece. Posledica ove regulative je da je broj proizvoda obogaćenih vitaminom D na nemačkom tržištu neznatan. Jedna studija analizirala je stavove potrošača o verovatnoći i motivima njihovog izbora ovakvih proizvoda, i zaključak je da bi prihvatanje ovih proizvoda bilo mnogo veće nego što su to naučnici očekivali. Motivi za izbor ovih proizvoda bili su prvenstveno zdravstvena svojstva ovih proizvoda, što je ukazalo na sve razvijeniju svest stanovnika o uticaju namirnica na zdravlje i na njihovu spremnost da menjaju svoje prehrambene navike. Zatim, pokazalo se da potrošači više prihvataju funkcionalne sastojke o kojima se zna duže vremena - kao vitamini i minerali, nego sastojke koji su tek od skora dostupni. Osim toga, potrošači su svoj potencijalni izbor proizvoda obogaćenih vitaminom D poistovetili sa sopstvenim osećajem kontrole svog života, zdravlja i blagostanja. Praktičnost i zdravstveni elemenat ovakve funkcionalne hrane pokazali su se kao privlačna kombinacija iz perspektive potrošača (Sandmann et al., 2015).

U Ujedinjenom Kraljevstvu legislativa propisuje obavezno obogaćivanje margarina sa 7,05-8,82  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (Statutory instrument no. 3116, 1995), hrane za odojčad sa 1-2,5  $\mu\text{g}/100\text{ kcal}$

(Statutory instrument No. 77, 1995) i prehrambenih proizvoda za redukcione dijete do 800 kcal sa 5 µg/obroku (Statutory Instrument No. 2182, 1997). Pored toga, proizvođačima je dozvoljeno dobrovoljno obogaćivanje niza proizvoda: instant cerealija, masnih namaza, napitaka, sireva i sušenih mešavina (R. E. Allen, Dangour, & Tedstone, 2014). Slična praksa postoji u Irskoj (Black, Walton, Flynn, Cashman, & Kiely, 2015) (Black et al., 2015) gde instant cerealije predstavljaju najznačajniji nutritivni izvor vitamina D, i kod dece i kod odraslih (Black, Walton, Flynn, & Kiely, 2013; Galvin, Kiely, & Flynn, 2003).

Brojne studije pokazale su da je obogaćivanje namirnica vitaminom D dovelo do povećanja serum 25(OH)D. Pošto je intenzitet tog povećanja zavisio od količine dodatog vitamina D i učestalosti konzumacije obogaćenih namirnica, efikasnost postojećih mera i strategija dovedene su u pitanje. Pokazalo se da obogaćivanjem pojedinačnih prehrambenih proizvoda, ili prehrambenih proizvoda iz samo jedne grupe, nisu obuhvaćene sve one grupe potrošača koje ih iz bilo kojeg razloga ne konzumiraju, kao i da čak 70% konzumenata tih prehrambenih proizvoda ne dostiže prosečnu preporučenu vrednost (EAR) za vitamin D (Black, Seamans, Cashman, & Kiely, 2012; Fulgoni et al., 2011; Kiely & Black, 2012). Pored toga, u evropskim zemljama u kojima je praksa obogaćivanja prehrambenih proizvoda dobrovoljna, procenat njihovog konzumiranja je nizak (Flynn et al., 2009).

Potrebno je pažljivo razmatrati mogućnosti za obogaćivanje različitih proizvoda, i svakom od njih prilagoditi količinu dodatog vitamina D, kako bi se optimizovala efikasnost i minimalizovao rizik prekomernog unosa (Kiely & Black, 2012). Pored tradicionalne prakse obogaćivanja namirnica egzogenim putem, koja će nastaviti da se primenjuje, pojavljuju se i nove metode „biofortifikacije“ - biološkog obogaćivanja prehrambenih sirovina životinjskog porekla, putem izlaganja životinja UV-β zracima, ili kroz ishranu životinja- premiksima obogaćenim vitaminom D. Ovo se takođe odnosi i na izlaganje pečuraka i kvasaca UV-β zracima, čime bi se vegetarijancima i veganima ponudile prirodno obogaćene namirnice (Cashman & Kiely, 2016). Naučnici smatraju da bi ovakav pristup bio potrošačima čak i privlačniji jer su životinjske namirnice prirodno bogatije vitaminom D.

U Srbiji obogaćivanje namirnica vitaminom D u potpunosti zavisi od slobodne volje proizvođača. Utvrđeno je da svi proizvođači mekih margarina dodaju vitamin D, u rasponu od 7,5-11 µg/100 g, što je u skladu sa evropskom regulativom (IMACE, 2004). Ovaj postupak se primenjuje radi nadoknađivanja nutrijenta u alternativnom prehrambenom proizvodu, tj. da

bi se nutritivni sastav margarina učinio što sličniji puteru. Pored toga, na tržištu se mogu naći poneka mleka, instant žitarice, majonezi i drugi proizvodi sa različitim sadržajima dodatog vitamina D. Međutim, ne postoje zvanični pravilnici kojima se reguliše praksa obogaćivanja prehrambenih proizvoda vitaminom D.

S druge strane, proizvodnja hrane za životinje je strogo regulisana, i pravilnici iz ove oblasti definišu koje su to količine vitamina i minerala koje se mogu dodavati potpunim<sup>1</sup> i dopunskim<sup>2</sup> smešama hrane za životinje (za različite vrste i uzraste životinja). Raspon dodatog vitamina D u potpunim smešama kreće se od 600-3000 IJ/kg (15-75 µg/kg), dok se u dopunskim smešama kreće od 3000-6000 IJ/kg (75-150 µg/kg) (Sl. glasnik RS", br. 4/2010, 113/2012, 2015) što je sve u skladu sa evropskom regulativom (European Commission, 2017). Ove količine vitamina D dodaju se premiksima radi zadovoljavanja osnovnih fizioloških potreba životinja, a ne radi podizanja sadržaja vitamina u tkivima životinja koje se koriste za ljudsku ishranu. Skorašnje studije upućuju na to da bi upotreba 25(OH)D kao aditiva u hranivima za životinje mogla, kao vid biološkog obogaćivanja, imala značajne efekte na povećanje sadržaja vitamina D u hrani životinjskog porekla: mesu, mleku i jajima (Cashman & Hayes, 2017; Hayes & Cashman, 2016; Mattila, Valkonen, & Valaja, 2011).

---

<sup>1</sup> Potpune smeše služe za podmirenje svih potreba životinja u hranljivim materijama.

<sup>2</sup> Dopunske smeše svojim hranljivim materijama treba da upotpune hraniva sa kojima se mešaju.

## Modeli za određivanje uobičajenog nutritivnog unosa i simulaciju obogaćivanja prehrambenih proizvoda

Tokom poslednje decenije objavljeno je nekoliko studija koje razmatraju različite modele koji se koriste za hipotetičko simuliranje dejstva promene koncentracija komponenti hrane (npr. vitamina, minerala, masti, šećera, itd.) na nutritivni unos kod ljudske populacije. Neki od tih modela se nadovezuju na prethodne, uzimajući u obzir i dodatne elemente koji mogu uticati na uobičajeni dnevni unos vitamina, dok drugi predstavljaju nove forme matematičkog modela. U daljem tekstu, prikazane su osnovne ideje ovih modela, hronološkim redom.

### Monte Carlo sistem za hipotetičko modelovanje

Probabilističko ili hipotetičko modelovanje predstavlja kompleksni pristup pri analizi rizika u situacijama kada se svi elementi koji doprinose riziku mogu kvantifikovati dobro definisanim, izračunljivim matematičkim izrazima. Jedan od takvih modela je Monte Carlo sistem za kvantitativnu analizu rizika unosa hemijskih komponentata iz hrane. Razvijen je u okviru projekta EK, pod imenom Monte Carlo, uz učešće partnera iz šest evropskih zemalja, koji su obezbedili ekspertizu u modelovanju unosa hemijskih komponentata iz hrane, kao i baze podataka o sadržaju hemijskih supstanci u hrani (Mc Namara, Naddy, Rohan, & Sexton, 2003). Glavni cilj ovog projekta je bio da se razvije sveobuhvatni sistem modeliranja koji može da obrađuje kompleksne baze podataka u analizi rizika, a da bude podržan softverskom arhitekturom. Glavne prednosti ovakvog sistema ogledaju se u sledećim činjenicama: 1. veoma veliki setovi podataka mogu biti instalirani i korišćeni direktno u okviru sistema; 2. potrebno je malo angažovanja oko pripreme podataka za instalaciju; 3. testiranje i validacija hipotetičke simulacije značajno je pojednostavljena; 4. obimni proračuni i prostori za pohranjivanje podataka mogu jednostavno biti angažovani za potrebe simulacija. Ovo ipak

zahteva korišćenje povezanih baza podataka, pristup web serverima i kompjutersku opremu visokih performansi, kao i web-baziranu aplikaciju pre nego softversko rešenje za individualni računar.

Analiza subjektovog unosa hrane i sadržaja pojedinih hemijskih komponenti u toj hrani jeste dobro razvijen naučno zasnovan proces. On zavisi od kolekcije nezavisnih setova podataka koji opisuju hranu, njene sastojke, načine konzumacije od strane različitih subjekata, količine sastojaka i koncentracije nutrijenata koji sačinjavaju hranu. Jednostavnije rečeno, subjektov unos date hemijske komponente datog dana računa se kao suma količina svake namirnice konzumirane tog dana, pomnoženo sa koncentracijama hemijske komponente u tim namirnicama. Uobičajeno, informacije o subjektovom načinu konzumacije namirnica dobijaju se iz studija o ishrani, dok se informacije o prisustvu i sadržaju date hemijske komponente dobijaju različitim načinima: laboratorijskim analizama, na osnovu informacija sa deklaracija, propisanih količina, i drugim. Dobijanje tačnih i proverenih podataka uglavnom je otežano, te se u praksi češće nailazi na podatke koji nose određene greške i/ili dvosmislenosti. Podaci o hemijskom sastavu namirnica su veoma generalni i nespecifični, pa se tako u praksi mnoge ključne vrednosti potrebne za izračunavanje subjektovog unosa hemijskih komponenti hrane ne izražavaju definisanim numeričkim vrednostima, već probabilističkim izrazima koji uzimaju u obzir i određeni stepen nepouzdanosti. Ovi izrazi omogućavaju dobijanje mnoštva različitih mogućih rezultata izračunavanja unosa hemijskih komponenti hrane, za šta se koristi probabilistička metodologija.

Monte Carlo sistem sprovodi kompleksne hipotetičke kalkulacije koje ponavljanjem kreiraju različite moguće ishode analize datog unosa, a zatim sakuplja te ishode da bi generisao probabilistički izraz o rasponu dobijenih rezultata.

Osnovna kalkulacija koja se ponavlja u okviru Monte Carlo sistema je jednostavna. Subjektov unos hemijske komponente,  $C_a$ , se računa kao:

$$C_a = \sum_{\text{Pojedinačne konzumirane namirnice}} [\text{količina hrane}] \times [\text{koncentracija hemijske komponente}] \quad (1)$$

Kada je numerička vrednost obezbeđena za dati element u jednačini, ta numerička vrednost se koristi za računanje. Ako je, pak, obezbeđena vrednost probabilistički izraz, onda se ona

nasumičnim kombinovanjem kreira i koristi kao vrednost za taj element u tom ponavljanju u okviru datog probabilističkog izraza. Svaki put kad se ova jednostavna jednačina ponavlja, nova, nasumična kombinacija, kreira se za sve elemente koji su definisani kao probabilistički izrazi. Svako ponavljanje će, stoga, proizvesti različite moguće ishode. Kada se postigne određen broj ponavljanja, set rezultata se prikuplja i računaju se odgovarajuće grupe statističkih mera (npr. srednja vrednost, standardna devijacija).

Monte Carlo sistem obezbeđuje dva tipa ponavljanja. U prvom, set subjekata za čiji se unos sprovodi računanje drži se fiksnim. U drugom, novi set subjekata povlači se iz originalnog seta subjekata, u skladu s predefinisanim „bootstrapping“ (eng. ponovno postavljanje) pravilima za svako ponavljanje. Prvi proces ponavljanja daje informaciju o unosu hemijskih komponentata hrane za fiksni set subjekata. Drugi proces ponavljanja je proces bootstrapping-a koji daje dodatne informacije o varijabilnosti unosa subjekta.

### *Setovi ulaznih podataka*

#### Struktura osnovnog seta podataka

Setovi ulaznih podataka potrebni za određivanje unosa hrane i hemijskih komponenti mogu biti grupisani u brojne nezavisne kolekcije. Sa Monte Carlo sistemom, ove kolekcije su organizovane u okviru povezanih, relacionih baza podataka. Da bi funkcionisao, sistem zahteva da određeni setovi podataka budu prisutni i da u okviru tih određenih setova, određena polja budu definisana. Na primer, u setu podataka iz studije o ishrani obavezno je definisati subjekte studije, odnosno baza podataka mora imati polje koje definiše subjekta (subject\_code), koje jednoznačno određuje subjekta u studiji i polje za težinu (weight) koje određuje težinu subjekta. Druge informacije kao što su pol, godine starosti, bračno/familijarno stanje i dr. mogu takođe biti uključene u set podataka o subjektu na početku procesa modeliranja. To kasnije omogućava modeliranje, tj. izbor različitih tipova subjekta na osnovu odabranog kriterijuma.

Kolekcije nezavisnih setova podataka koji se koriste u Monte Carlo sistemu su:

- Podaci iz studije o ishrani: ove tabele sadrže informacije o subjektima, dnevnik ishrane (o obrascima konzumacije obroka), podatke o recepturama i sastojcima. Subjekti su



identifikovani kao `subject_code`, namirnice kao `food_code`, dok se robne marke namirnica identifikuju kao `brand_code`.

- Podaci o hemijskom sastavu: ove tabele sadrže informacije o prisustvu i koncentraciji hemijskih komponenti u pojedinim namirnicama ili grupama namirnica, uključujući i korektivne faktore koji se moraju primeniti usled promena koncentracije komponente pri pripremi/obradi hrane. Podaci o koncentraciji komponente mogu se definisati za bilo koju kombinaciju, npr. (`food_code`, `brand_code`), ili za opštu (`group_code`).

- Podaci o faktorima biodostupnosti: ove tabele sadrže informacije o korekcionim faktorima koji moraju da se primene kod konverzije unosa sirove komponente u biološki dostupnost komponenti hrane. Faktori biodostupnosti mogu da se odrede za bilo koju kombinaciju (`food_code`, `brand_code`, `group_code`).

- Definisane grupe namirnica: ove tabele omogućavaju da se odredi grupa namirnica i primeni faktor konverzije koji omogućava konverziju količine namirnice u odgovarajuću količinu sirove namirnice koja definiše tu grupu. Na primer, moguće je konvertovati količinu koncentrata soka od jabuke u količinu sirovih jabuka.

- Definisane klase: ove tabele obezbeđuju osnovne veze između grupa definisanih na nivou (`food_code`, `brand_code`, `group_code`), unosa namirnica na nivou (`food_code`, `brand_code`), podataka o komponenti na nivou (`food_code`, `brand_code`, `group_code`) i korektivnih faktora za preradu/pripremu i biodostupnost.

Centralni element Monte Carlo sistema je mehanizam u kom su napravljene veze između izračunatih unosa hrane iz studije o ishrani i koncentracije komponenata, korektivnih faktora za preradu/pripremu i biodostupnost. U modelu, svaki događaj unosa hrane, *quantum*, na kraju je obeležen vektorom kodova (`food_code`, `brand_code`, `group_code`), i ovaj vektor se koristi da bi se ekstrahovali određeni zapisi količina unosa i prisustva koncentracije komponente u okviru simulacije. 'Quanta' predstavlja individualne unose u dnevnik datog subjekta u studiji u ishrani. Quanta predstavlja npr. konzumaciju jedne jabuke ili parčeta pite.

U setu podataka o unosu hrane, za svakog ispitanika, svaki unos je vezan za određeni `food_code`, dok *quantum* određuje količinu, ali i vreme kada je određeni `food_code` bio konzumiran u okviru studije.

U setu podataka za koncentracije komponenata, dobija se informacija i o mogućnosti prisustva i o koncentraciji date komponente, uopšteno (brand\_code, food\_code, group\_code).

Faktor biodostupnosti se povezuje samo sa kodom komponente na nivou grupe namirnica (bioav\_code, chemical\_code, group\_code). Generalno, podaci o unosu namirnica, koncentraciji komponenti i faktoru biodostupnosti su obično predefinisani i unose se u sistem jer se ne menjaju u toku vremena. Najveći deo zadatka u sistemu je definisati klase, tj. veze između različitih setova podataka.

Osnovni izlazni podaci dobijeni iz modela su vrednosti za unos hrane, unos komponenti i biodostupnost hemijske komponente po nutritivnom unosu. Svaka od ovih vrednosti dobija se kompleksnim matematičkim formulama, koje se koriste za ponovljena računanja ishoda promenom vrednosti elemenata (Mc Namara et al., 2003). One se skupljaju u zbirne matematičke izraze sledećih formi:

$$I_a(s,d,m,q)=i(s,d,m,q) \quad (2)$$

$$I_b(s,d,m,q)=i(s,d,m,q)/w_s \quad (3)$$

$$C_a(s,d,m,q)=c(s,d,m,q) \quad (4)$$

$$C_b(s,d,m,q)=c(s,d,m,q)/w_s \quad (5)$$

$$B_a(s,d,m,q)=b(s,d,m,q) \quad (6)$$

$$B_b(s,d,m,q)=b(s,d,m,q)/w_s \quad (7)$$

gde su:

$I_a(s,d,m,q)$  unos namirnice (g);

$I_b(s,d,m,q)$  unos namirnice po kg telesne težine (g/kg);

$C_a(s,d,m,q)$  unos komponente (mg);

$C_b(s,d,m,q)$  unos komponente po kg telesne težine (mg/kg);

$B_a(s,d,m,q)$  biodostupan unos komponente(mg);

$B_b(s,d,m,q)$  biodostupan unos komponente po kg telesne težine (mg/kg);

$i(s,d,m,q)$  unos namirnice (g) za subjekat  $s$  na dan  $d$  u obroku  $m$  quantum  $q$ ;

$c(s,d,m,q)$  unos komponente (mg) za subjekat  $s$  na dan  $d$  u obroku  $m$  quantum  $q$ ;

$b(s,d,m,q)$  biodostupan unos komponente (mg) za subjekat  $s$  na dan  $d$  u obroku  $m$  quantum  $q$ ;

$w_s$	težina subjekta (kg);
$s$	kod subjekta;
$m$	kod obroka;
$q$	quantum događaja konzumacije;
$b$	kod biodostupnosti;
$d$	dan.

Ovaj model primenili su Pigat i saradnici (2018) da bi procenili efekat reformulacije grupa proizvoda u rasponu od 7 godina, između 2005. i 2012. godine, u četiri nacionalne studije o ishrani. Praćen je unos nekoliko komponenti hrane - ukupne masti, zasićene masti, šećer, natrijum i energetska vrednost, pre i posle reformulacije, u različitim proizvodima identifikovanim u ovim studijama. Za svaki zabeleženi obrok, odgovarajući sadržaj komponenti je pomnožen sa količinom konzumirane hrane. Ovo je rađeno za svaki obrok, po danu, za sve ispitanike u svim studijama. Kada je ispitanik prijavio da je konzumirao reformulisanu hranu, koncentracije posmatranih komponenti uzete su iz baza podataka o sastavu ovih proizvoda. Oko 10000 Monte Carlo simulacija je urađeno za svaku analizu, da bi se postigla konvergencija izlaznih statističkih podataka. Ovi podaci uključuju srednju vrednost dnevnog unosa i 97,5 percentil (P97,5) dnevnog unosa, koji predstavlja najveće potrošače (Pigat, Connolly, Cushen, Cullen, & O'Mahony, 2018).

Konzumacija je ostala fiksna u ovoj studiji, ali podaci o sastavu namirnica su se menjali usled reformulacije proizvoda. Ovo podrazumeva da se sve promene koje su nastale vezuju isključivo za reformulaciju i/ili promenu njihovog udela na tržištu u okviru kategorije proizvoda. Stoga je učinak reformulacije analiziran na dva načina, kao promena u unosu nutrijenata u ukupnoj ishrani svih ispitanika i kao promena unosa nutrijenata iz reformuliranih proizvoda kod onih koji su ih konzumirali. Efekat reformulacije izračunat je u obliku apsolutne promene unosa komponente (g/danu) i kao procentualna promena (Pigat et al., 2018).

## Flin: Model za bezbedno dodavanje vitamina i minerala u hranu

Flin i saradnici su 2003. godine (Flynn et al., 2003) objavili model kojim se mogu odrediti maksimalni bezbedni nivoi mikronutrijenata dodatih u hranu na dobrovoljnoj bazi. U postavi ovog modela autori pretpostavljaju da je udeo unosa nutrijenata iz suplemenata zanemarljiv, te su razvili model koji ne uzima u obzir ovaj segment kao izvor nutrijenata u ljudskoj ishrani. Predloženim modelom procenjuje se nivo svakog nutrijenta koji se može bezbedno dodati u namirnice da bi se umanjio rizik od prekomernog unosa kod individua koje su veliki potrošači hrane.

Maksimalni sadržaj svakog nutrijenta, koji se može dodati celokupnoj ishrani sa malim rizikom od štetnih efekata na zdravlje populacije ( $MA_n$ ), predstavlja razliku između tolerisanog gornjeg nivoa unosa (UL) i trenutnog srednjeg unosa individua na 95. percentilu tog nutrijent ( $CI_{95}$ ), odnosno:

$$MA_n = UL - CI_{95} \quad (8)$$

Elementi ovog modela su sledeći:

UL Tolerisani gornji nivo unosa (Tolerable Upper Intake Level-UL), maksimalni nivo ukupnog hroničnog dnevnog unosa nutrijenta (iz svih izvora) koji malo verovatno može predstavljati rizik od štetnih zdravstvenih efekata na ljude.

$CI_{95}$  Procena trenutnog unosa mikronutrijenata iz neobogaćenih namirnica (odnosno isključujući dobrovoljno dodavanje) u Evropi na 95. percentilu;

$E_{95}$  Procena trenutnog energetskeg unosa u Evropi na 95. percentilu;

$MA_n$  Maksimalni sadržaj svakog nutrijenta n koji može biti dodat u celokupnoj ishrani, sa malim rizikom od štetnih efekata na zdravlje populacije;

$FA_n$  Sadržaj svakog nutrijenta n koji može biti dodat na svakih 100 kcal porcije;

$PFF_n$  Frakcija namirnica na tržištu koja je dostupna za obogaćivanje, za svaki individualni nutrijent n.

Okviri, u kojima je sistem postavljen, definisani su sledećim činjenicama. U Evropi, srednji dnevni energetska unos odraslih osoba je prosečno 2000 kcal, a odraslih muškaraca 3600 kcal na 95. percentilu. Ako se ovo izrazi kroz porcije od 100 kcal to znači da prosečna odrasla osoba u toku dana pojede 20 porcija od 100 kcal, a odrasli muškarci na 95. percentilu 36 porcija od 100 kcal. Količina svakog nutrijenta koja se može bezbedno dodati svakoj porciji od 100 kcal ( $FA_n$ ) je  $MA_n$ , podeljena sa brojem porcija namirnica obogaćenih datim nutrijentom u ishrani. Ako bi sve namirnice bile obogaćene, sadržaj svakog nutrijenta koji se može dodati na svakih 100 kcal porcije,  $FA_n$ , bio bi  $MA_n/36$ . Međutim konzervativna procena je da od svih namirnica (ili energije iz namirnica) koje se konzumiraju ne više od polovine mogu biti obogaćene - usled tehnoloških, ekonomskih i drugih ograničenja. Mora se uzeti u obzir da se sirove namirnice (povrće, voće, sirovo meso itd.) ne mogu obogaćivati. Stoga je uveden faktor ( $PFF_n$ ) koji hipotetički definiše koji procenat namirnica unetih u toku dana, tj. energije iz njih, može potencijalno biti obogaćen. Taj faktor je različit za svaki nutrijent, odnosno tehnologija dodavanja svakog pojedinačnog nutrijenta određuje koliko se svaka namirnica realno može obogatiti, stoga se ovaj faktor mora računati posebno za svaki nutrijent. Tako je onda:  $PFF_n = 36 \times 0,5 = 18$  porcija od 100 kcal.

Tada je konačna formula ovog modela:

$$FA_n = (UL - CI_{95}) / (0,5 \times 36 \times PFF_n) \quad (9)$$

Međutim, autori su smatrali da će samo polovina ovih namirnica koje se mogu obogatiti zaista i biti obogaćena, te dalja računica daje:  $18 \times 0,5 = 9$  porcija od 100 kcal.

Model omogućava procenu bezbedne konzumacije za većinu ljudi koji konzumiraju prosečne količine nutrijenata i energije, i štiti velike potrošače od prekomernog unosa.

Koristeći ove matematičke formule Flin i saradnici (2003) izložili su nivoe dodavanja za različite nutrijente. U tabeli 4. navedene su samo vrednosti za vitamin D.

**Tabela 4.** Maksimalni nivo dodavanja vitamina D namirnicama (pretpostavljajući da je 50% svih namirnica moguće obogatiti)

n	Jedinica (µg)			Max. dostupno za dodavanje namirnicama MA (UL-CI)	% obogaćenih namirnica (od dostupnih), maksimalna količina po porciji od 100 kcal <sup>2</sup> FA <sub>n</sub>				
	EC RDA	UL	Unos na 95. perc		100%	50%	25%	10%	5%
<b>Vit D</b>	5	50 <sup>1</sup>	9,9	40	2	4	9	22	45

<sup>1</sup> US FNB tolerisani gornji nivo unosa (Tolerable Upper Intake Level-UL)

<sup>2</sup> Maksimum (u µg) koji se može dodati porciji od 100 kcal namirnice bez premašivanja UL na 95. percentilu unosa

Autori zaključuju da se primenom ovog modela razni vitamini i minerali mogu bezbedno dodati do  $\geq 15\%$  RDA po porciji, čak i ako je obogaćeno samo 25% svih namirnica koje se potencijalno mogu obogatiti (Flynn et al., 2003).

### Rasmusen: Model za bezbedno dodavanje vitamina i minerala u hranu

Rasmusen i saradnici su 2006. godine objavili napredni model za dodavanje mikronutrijenata, baziran na Flinovom modelu, sa dodatnim elementima koji preciziraju i druge aspekte procene unosa mikronutrijenata, kao što je unos suplemenata i UL vrednosti za različite starosne grupe, konkretno za decu i adolescente. Ovaj model je razvijen za dansku populaciju (Rasmussen, Andersen, Dragsted, & Larsen, 2006).

Autori definišu faktore modela na sledeći način:

UL Tolerisani gornji nivo unosa nutrijenta definisanog od strane Naučnog komitet za hranu (EC SCF) EK ili nekog drugog ekspertskeg komiteta; maksimalni nivo ukupnog hroničnog dnevnog unosa nutrijenta (iz svih izvora) koji malo verovatno može predstavljati rizik od štetnih zdravstvenih efekata na ljude;

CI<sub>95</sub> Procena trenutnog unosa mikronutrijenata iz neobogaćenih namirnica, u Evropi na 95. percentilu (isključujući dobrovoljno obogaćene namirnice);

- SI Unos suplemenata, dnevni unos mikronutrijenata iz normalnih vitaminskih/mineralnih suplemenata;
- MA Maksimalno dozvoljeni unos mikronutrijenta iz obogaćenih namirnica;
- El<sub>95</sub> Unos energije na 95. percentilu;
- PFF<sub>n</sub> Frakcija namirnica na tržištu koja je dostupna za obogaćivanje;
- ALA Prihvaćeni nivo dodavanja svakog nutrijenta po porciji od 100 kcal.

Formule modela su:

$$MA = UL - (CI_{95} - SI) \quad (10)$$

$$ALA = MA / (EI_{95} \times PFF_n) \quad (11)$$

Tolerisani gornji nivo unosa vitamina D za različite starosne grupe je dat u tabeli 5.

**Tabela 5.** Tolerisani gornji nivo (UL) unosa vitamina D za različite starosne grupe (podaci iz 2002. god.) (Rasmussen et al., 2006)

UL (SCF <sup>1</sup> )/ st. grupama	1-3 god.	4-6 god.	7-10 god.	11-14 god.	15-17 god.	Odrasli
Vitamin D (µg/dan)	25	25	25	50	50	50

<sup>1</sup>(EFSA Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, 2006)

Procena unosa nutrijenata i energije rađena je na osnovu studija o ishrani izvođenih u Danskoj, u periodu od 2000-2002 godine, u formi 7-dnevnog dnevnika ishrane, obuhvatajući sve starosne grupe (osim beba mlađih od godinu dana) i sva godišnja doba. U studiji je utvrđeno da dve trećine dece redovno uzima suplemente, te je ovaj izvor nutrijenata morao biti uključen u model. Najčešći oblik suplementa koji se uzima jesu multivitaminske tablete kojima se obezbeđuje 100% dnevnih propisanih vrednosti vitamina i minerala. Stoga model pretpostavlja da je SI vrednost ukupnog unosa mikronutrijenata 100%. Tabela 6. daje pregled energetske unosa i unosa vitamina D iz hrane i suplemenata po starosnim grupama.

**Tabela 6.** Unos energije i vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{dan}$ ) na 95.percentilu iz hrane i suplemenata u Danskoj (Rasmussen et al., 2006)

Starosna grupa (god)	1-3		4-6		7-10		11-14		15-17		Odrasli muškarci		Odrasle žene	
El <sub>95</sub> (kcal/d)	2200		2500		2800		3300		3200		3800		2900	
	Cl <sub>95</sub>	Supl.	Cl <sub>95</sub>	Supl.	Cl <sub>95</sub>	Supl.	Cl <sub>95</sub>	Supl.	Cl <sub>95</sub>	Supl.	Cl <sub>95</sub>	Supl.	Cl <sub>95</sub>	Supl.
Vitamin D ( $\mu\text{g}/\text{dan}$ )	3	10	3,8	10	5,2	10	4,9	5	6,4	5	7,2	5	7,2	5

Ovaj model takođe pretpostavlja da sve namirnice neće moći da budu obogaćene. Stoga, autori prihvataju Flinovu pretpostavku da se 50% konzumiranih namirnica potencijalno mogu obogatiti i da oni potrošači koji biraju obogaćene namirnice ipak neće uspeti da uzmu više od 25% energije iz istih u toku dana. Na osnovu ovoga autori daju sledeću formulu:

$$ALA = MA / (El_{95} \times 0,25) \quad (12)$$

Uzimajući u obzir i verzije proizvoda sa smanjenim sadržajem energije, autori sugerišu korišćenje istih nivoa dodavanja mikronutrijenata kao i u njihovim visoko-kalorijskim analogonima.

Tabela 7. daje pregled rezultata modela za bezbedno dodavanje maksimalnog nivoa vitamina D koji se može dodati u hranu, na osnovu najosetljivije starosne grupe, što su ovom slučaju deca od 7-10 god.

**Tabela 7.** Bezbedni maksimalni nivo vitamina D ( $\mu\text{g}$ ) koji se može dodavati namirnicama, bazirano na najosetljivijoj grupi (Rasmussen et al., 2006)

Najosetljivija starosna grupa (god)	UL <sup>1</sup>	Cl <sub>95</sub> <sup>2</sup>	SI <sup>3</sup>	MA <sup>4</sup>	% namirnica koje se mogu obogatiti (od ukupno dostupnih) <sup>5</sup>				
					100%	50%	25%	10%	5%
					Vitamin D ( $\mu\text{g}$ ) ALA/100 kcal porcije				
7-10	25	5,2	10	9,8	1	1	3	7	14

<sup>1</sup> UL-(Upper Tolerable Level) - 25  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g

<sup>2</sup> Cl<sub>95</sub> aktuelni dnevni unos vitamina D na 95. percentilu iz neobogaćenih namirnica u Danskoj

<sup>3</sup> SI-unos suplemenata; sadržaj vitamina D u normalnim multivitaminским suplementima koji se koriste u Danskoj

<sup>4</sup> MA - Maksimalno dozvoljeni unos mikronutrijenta iz obogaćenih namirnica

<sup>5</sup> Ukupno dostupne se odnosi na 50% svih namirnica koje se potencijalno mogu obogatiti



Ovaj model se od Flinovog razlikuje u sledećem: model uključuje dnevni unos nutrijenata kroz suplemente, što je posebno važno kod dece, koja su češći korisnici suplemenata, ali i kroz obogaćenu hranu koja se posebno dizajnira za ovu starosnu grupu. Druga razlika je u korišćenju UL vrednosti za različite starosne grupe. Treća se odnosi na procenu udela obogaćene hrane u ukupnom dnevnom energetsom unosu. Autori smatraju da je 25% ukupne energije iz obogaćene hrane više nego dovoljno. Svoje argumente baziraju na prethodnim studijama koje su pokazale da odrasli Evropljani konzumiraju znatno manje obogaćene hrane, a da deca i adolescenti češće konzumiraju ove namirnice nego odrasli, te ovaj predloženi procenat ostavlja prostora za razvoj i uključivanje novih obogaćenih proizvoda u ishranu stanovništva (Rasmussen et al., 2006).

### Klosterman: Model za obogaćivanje namirnica u Holandiji

Klosterman i saradnici su 2007. godine (Kloosterman, Fransen, De Stoppelaar, Verhagen, & Rompelberg, 2007) prilagodili Rasmusenov model nutritivnoj situaciji u Holandiji. Oni razvijaju model za procenu maksimalno bezbednog nivoa obogaćivanja (MSFLs) za namirnice na holandskom tržištu. Taj model koriste i za procenu dozvoljenih nivoa obogaćivanja (AFLs) namirnica za koje je potrebno određeno izuzeće od regulative, ali se mora dokazati da nemaju štetan efekat na zdravlje ljudi.

Model se, po ugledu na prethodna dva, bazira na računanju maksimalnog nivoa obogaćivanja na porciji od 100 kcal. Formula modela u principu je slična prethodnim modelima, s tim što su određeni faktori prilagođeni holandskoj nutritivnoj situaciji:

$$\text{Procena rizika} \quad MSFL = \frac{UL - (CI_{95} + SI)}{(EI_{95}/100) * PFF_n} \quad (13)$$



Upravljanje rizikom

**AFL**

gde je:

MSFL Maksimalni bezbedan nivo obogaćivanja na 100 kcal;

AFL Dozvoljeni nivo obogaćivanja na 100 kcal;

UL Dozvoljeni gornji nivo unosa;

CI<sub>95</sub> Distribucija trenutnog uobičajenog unosa mikronutrijenta na 95. percentilu iz neobogaćene hrane (bazična ishrana) po starosnim grupama;

SI Realni scenario visokog unosa iz suplemenata;

EI<sub>95</sub> Uobičajeni unos energije po starosnim grupama;

PFF<sub>n</sub> Proporcija ukupnog unosa energije koja dolazi iz obogaćenih namirnica.

Kao i u prethodnom modelu, najniži MSFL, tj. onaj za najosetljivije starosne grupe, usvaja se kao zajednički za sve, što je uobičajena praksa u toksikološkim procenama rizika. UL vrednosti za vitamin D primenjene su kao i u prethodna dva modela. CI<sub>95</sub> i EI<sub>95</sub> računate su kao uobičajeni unos na 95. percentilu distribucije za energiju i vitamin D u osnovnoj ishrani, bazirano na podacima iz skorašnjih holandskih studija o konzumaciji hrane: DNFC3-3 (sprovedena 1997-1998. godine na celokupnoj populaciji) i DNFC3-2003 (sprovedena 2003. godine na mladim odraslim Holanđanima od 19-30 god.), koristeći dva puta ponovljeni 24HDR upitnik. Zbog nedovoljno informacija o unosu suplemenata, u ove dve studije o ishrani u modelu se koriste dva realistična scenarija visokog unosa nutrijenata iz suplemenata, jedan za odrasle ( $\geq 18$  god.), a drugi za decu (1-17 god.) na 90-95. percentilu unosa suplemenata, s podacima o sadržaju mikronutrijenata u suplementima dostupnim u Holandiji. Kao i u ranijim modelima, podrazumeva se da neće sve konzumirane namirnice biti obogaćene. Energetski unos iz namirnica koje će konačno biti obogaćene sastoji se iz dva dela. Prvi deo, udeo ukupnog energetskog unosa koji može biti obogaćen, procenjen je na 30%, za razliku od Rasmusenovog modela, koji je procenio na 50%. Procenjeni procenat unosa obogaćenih namirnica je niži jer je holandska ishrana bazirana na svežim namirnicama - voće, povrće, meso i riba, a one se ne obogaćuju. Druge deo je udeo energetskog unosa dostupne hrane za obogaćivanje koja se na kraju zaista i obogaćuje. Usled praktičnih prepreka, troškova i komplikovane tehnologije, ne mogu sve namirnice, koje bi se mogle obogatiti, zaista i biti obogaćene. Autori, kao i u

prethodnim modelima, pretpostavljaju da će 50% svih namirnica dostupnih za obogaćivanje zaista i biti obogaćeno. Ovo daje finalnu računnicu PFF<sub>n</sub> faktora od 15%. U tabeli 8. dati su rezultati ovog modela za sve starosne grupe, na osnovu dve navedene holandske studije o ishrani.

Najosetljiviju grupu u ovom modelu predstavljaju deca starosti od 4-10 godina i na osnovu njihovih parametara određuje se MSFL za celu populaciju od 3 µg/100 kcal. Kod Rasmusena je bio 1 µg/100 kcal, tj. ALA. Ova razlika vezana je za razliku u PFF<sub>n</sub> vrednostima između ova dva modela - 15% u ovom, i 25% u Rasmusenovom. U slučaju manje konzumacije obogaćenih namirnica PFF<sub>n</sub>= 10, ili sa unosom suplemenata sa vitaminom do 5 µg, MSFL može biti 4,5 µg/100 kcal za najosetljiviju grupu, te je procenjeno da ovo može biti usvojeno kao AFL vrednost za vitamin D kod određenih izuzetaka (Kloosterman et al., 2007).

**Tabela 8.** Maksimalni nivo obogaćivanja i dozvoljeni nivo obogaćivanja namirnica vitaminom D na osnovu holandskih studija o ishrani i evropskog tolerisanog gornjeg nivoa unosa za specifične starosne grupe (Kloosterman et al., 2007)

Starosna grupa		UL (µg/dan)	CI <sub>95</sub> (SE) (µg/dan)	SI (µg/dan)	EI <sub>95</sub> (SE) (µg/dan)	MSFL (µg/100 kcal) PFF <sub>n</sub> =0,15 PFF <sub>n</sub> =0,10 <sup>1</sup>		AFL (µg/100 kcal)
Deca	1-3	25	4,8 (0,6)	10	1,890 (67)	3,6	5,4	
Deca	<b>4-10</b>	<b>25</b>	<b>4,4 (0,2)</b>	<b>10</b>	<b>2,334 (50)</b>	<b>3,0</b>	<b>4,5</b>	<b>4,5</b>
Deca	11-13	50	6,5 (0,6)	10	2,935 (100)	7,6	11,4	
Adolescenti	14-18	50	7,6 (0,5)	10	3,509 (116)	6,2	9,2	
Muškarci	19-30	50	6,5 (0,4)	10	3,751 (130)	6,0	8,9	
Žene	19-30	50	5,2 (0,4)	10	2,581 (76)	9,0	13,5	
Muškarci	31-50	50	8,9 (0,4)	10	3,529 (64)	5,9	8,8	
Žene	31-50	50	6,4 (0,3)	10	2,721 (48)	8,2	12,3	
Muškarci	51-60	50	11,3 (1,2)	10	3,410 (128)	5,6	8,4	
Žene	51-60	50	6,7 (0,6)	10	2,623 (90)	8,5	12,7	
Muškarci	61-70	50	9,8 (1,0)	10	3,315 (124)	6,1	9,1	
Žene	61-70	50	6,6 (0,6)	10	2,528 (87)	8,8	13,2	
Muškarci	>70	50	12,2 (1,8)	10	3,067 (141)	6,0	9,1	
Žene	>70	50	8,6 (0,8)	10	2,487 (86)	8,4	12,6	

Najosetljivija grupa označena je podebljanim slovima.

<sup>1</sup> Dodatna kalkulacija sa potpuno istim rezultatima kao za PFF<sub>n</sub>= 0,15 u kombinaciji sa scenarijom niskog unosa suplemenata (od 5 µg/dan)

CI<sub>95</sub> – 95. percentil uobičajenog unosa vitamina D, EI<sub>95</sub> – 95. percentil uobičajenog energetskeg unosa, SE – standardna greška, SI – unos vitamina D iz suplemenata, PFF<sub>n</sub> – proporcija energetskeg unosa iz hrane koja može biti i koja će biti obogaćena, UL – tolerisani gornji nivo unosa

## Hirvonen: Model za optimalno obogaćivanje namirnica vitaminom D u Finskoj

Za razliku od prethodnih modela, koji procenjuju maksimalne bezbedne količine vitamina D koje se mogu dodavati namirnicama, Hirvonen i saradnici razvili su model za optimalni unos vitamina D kod populacije, uzimajući u obzir jako niske i jako visoke unose ovog nutrijenta (Hirvonen, Sinkko, Valsta, Hannila, & Pietinen, 2007). Pored toga, ispitali su efekat efikasnosti i bezbednosti obogaćivanja različitih namirnica.

Ovaj model bazira se na matematičkom modelu koji su razvili Nuser i saradnici 1996. godine. Model daje dugoročni prosečni dnevni unos nutrijenta uzimajući u obzir dnevne korelacije i efekte smetnji, odstupanja od normalnosti kroz polinomske transformacije i prepoznaje greške merenja vezane za jednodnevne unose (Nusser, Carriquiry, Dodd, & Fuller, 1996). Optimalni nivo za obogaćivanje namirnica procenjen je na osnovu proporcije populacije čiji se unos kreće u okvirima preporučenog dnevnog unosa (RI) i tolerisanog gornjeg unosa (UL) i nivoa obogaćivanja po jedinici energije, zbirno za sve potencijalno obogaćene namirnice. RI je 7,5 µg/dan, a UL 50 µg/dan. Urađena je analiza i na RI od 40 µg/dan i UL od 250 µg/dan, kao nove predložene referentne vrednosti. Prvi maksimalan nivo obogaćivanja određen je tako da nema rizika od premašivanja UL granice, tj. da 0% ljudi dostiže UL. Drugi optimalan nivo obogaćivanja je takav da je minimalan procenat onih koji izlaze iz RI-UL opsega. Ova izračunavanja uzela su u obzir ukupni unos nutrijenta iz hrane, suplemenata i obogaćenih namirnica, te je distribucija procenjena na osnovu Nuserovog modela. Model je eksploatisan u različitim kombinacijama obogaćenih namirnica:

- a) mleko, fermentisano mleko, jogurt i margarin;
- b) mleko, fermentisano mleko, jogurt, margarin i voćni sok;
- c) mleko, fermentisano mleko, jogurt, margarin, voćni sok i hleb;
- d) sve namirnice koje se mogu obogatiti (mleko, fermentisano mleko, jogurt, margarin, voćni sok, hleb, kiselo mleko, sir, mlečni deserti, sladoled, instant cerealije, džemovi, slatkiši, negazirana pića, biskvit, mineralna voda, prelive za salate i slane grickalice).

Ove kombinacije namirnica iskorišćene su za četiri scenarija obogaćivanja. Rezultati analize pokazali su da se povećanjem nivoa obogaćivanja procenat onih koji su ispod RI smanjuje, dok procenat onih koji se približavaju UL vrednostima raste mnogo sporije.

U prvom scenariju, koji je najbliži tadašnjoj situaciji u Finskoj<sup>3</sup>, nije bilo moguće naći nivo obogaćivanja koji bi omogućio da 100% populacije bude u okvirima RI-UL. Međutim, kada se broj namirnica obogaćenih vitaminom D povećao, bilo je moguće naći nivo obogaćivanja koji osigurava da 100% populacije bude u RI-UL opsegu. U scenariju gde su sve namirnice obogaćene, i 100% populacije u RI-UL opsegu, nivoi obogaćivanja bili su između 0,012 µg/kcal i 0,015 µg/kcal. Kada je RI postavljen na 40 µg/dan, a UL na 250 µg/dan, optimalni nivo obogaćivanja je bio 0,092-0,102 µg/kcal, u slučaju kada bi sve navedene namirnice bile obogaćene vitaminom D. Takođe, proporcija populacije koja bi bila u RI-UL opsegu bila bi 100%. Ovi predloženi nivo su u skladu sa Finovim i Rasmusenovim modelom, u kom su takođe uključene sve namirnice koje se mogu obogatiti, ali je Flinov model imao 0,3% populacije koja je prevazilazila UL vrednosti kada su sve namirnice bile obogaćene.

Studija je pokazala da je obogaćivanje različitih namirnica manjim količinama vitamina D efikasnija nego kada se obogaćuje samo jedna ili dve vrste namirnica (npr. samo mleko i margarin) višim koncentracijama, gde postoji rizik od prekomernog unosa kod potrošača s velikim konzumiranjem ovih namirnica, odnosno rizik od nedovoljnog unosa kod onih koji ne konzumiraju ove namirnice. Kada se više različitih namirnica obogati nižim količinama, veća je verovatnoća da će se širi opseg potrošača obuhvatiti ovom intervencijom, a da će se rizik od prekomernog unosa smanjiti, jer je malo verovatno da iko može uneti prekomerne količine svih nisko-obogaćenih namirnica u toku dana (Hirvonen et al., 2007).

---

<sup>3</sup> U Finskoj su u 2007. god. bila obogaćena skoro sva mleka (0,5 µg/100 ml), fermentisano mleko (0,5 µg/100 ml), neki margarin (0,1 µg/100 g), neki jogurti (0,5 µg/100 ml) i jedna mineralna voda (0,1 µg/100 ml).

## Braun: Obogaćivanje namirnica vitaminom D bazirano na modelovanju koncentracije 25(OH)D u serumu

Braun i saradnici (Brown, Sandmann, Ignatius, Amling, & Barvencik, 2013) razvili su matematički model za predviđanje sadržaja 25(OH)D u serumu i dostizanje preporučenih vrednosti za unos vitamina D, uzimajući u obzir sve izvore vitamina D - sunčevu svetlost, suplemente i hranu. Model računa optimalne nivoe obogaćivanja različitih namirnica - nosača vitamina D, koristeći dva pristupa. Prvi računa potrebne nivoe obogaćivanja baziranog na fiksnom preporučenom unosu od strane ekspertske grupe kao što su IOM ili Nemačko Nutricionističko Društvo (DGE). Drugi se bazira na postizanju određene koncentracije 25(OH)D u serumu.

Prvi pristup definiše konstantni nivo obogaćivanja različitih namirnica nosača u toku godine, kao što je uobičajeno. U kalkulaciju se ne uzima koncentracija 25(OH)D u serumu, već samo unos vitamina D iz prirodnih izvora i prosečan unos vitamina D iz suplemenata. Uzevši ove elemente u obzir, autori su razvili sledeću formulu:

$$f_c = \delta_i * 100 / F_i = (I_r - I_a) * 100 / F_i \quad (14)$$

gde su:

- $f_c$  konstantni nivo obogaćivanja;
- $\delta_i$  razlika između preporučenog unosa vitamina D i aktuelnog unosa vitamina D;
- $F_i$  unos razmatranih namirnica koje se obogaćuju;
- $I_r$  preporučeni unos vitamina D;
- $I_a$  aktuelni unos vitamina D iz hrane i suplemenata.

Namirnice koje autori u ovom modelu predlažu za obogaćivanje su hleb, mleko i voćni sok. Model bi se mogao primeniti i na druge namirnice pogodne za obogaćivanje, ali autori svoj izbor argumentuju činjenicom da su to najčešće konzumirane namirnice u nemačkoj populaciji (hleb), i time što su se u praksi u drugim zemljama pokazale kao pogodne za obogaćivanje (mleko i voćni sok). Što se tiče tipova prehrambenih proizvoda u ove tri grupe, pod hlebom se podrazumevaju samo hleb i kifle; dok se drugi proizvodi na bazi žita, kao što

su peciva, kolači, krem-pite, pice i instant žitarice i srodni proizvodi ne uzimaju u obzir. Pod mlekom se podrazumevaju mleko, mlečni napici (fermentisani i nefermentisani), jogurti i fermentisana mleka. Pod voćnim sokovima podrazumevaju se svi voćni sokovi i voćni nektari, ali ne i sokovi od povrća i voćni napici.

Logika ovog modela je da nivo obogaćivanja bude manji ako je data namirnica više konzumirana u populaciji.

U drugom pristupu teži se ka tome da se niveliše koncentracija 25(OH)D u serumu, menjajući nivo obogaćivanja u namirnicama u toku godine. Ovde je osnova kalkulacije u koncentraciji 25(OH)D u serumu, pa je bilo potrebno uključiti i faktor konverzije unesenog vitamina D iz obogaćenih namirnica u 25(OH)D u serumu, koji je predložila O'Donel (O'Donnell et al., 2008), a iznosi 2,32 nmol/L po 1 µg unetog vitamina D. Da bi se izračunao promenljivi nivo obogaćivanja za različite nosače namirnice, autori su predložili sledeću formulu:

$$f_v = \delta_c * 100 / c_f * F_i = (L_r - L_a) * 100 / (c_f * F_i) \quad (15)$$

gde su:

- $f_v$  promenljivi nivo obogaćivanja za različite nosače namirnice;
- $\delta_c$  razlika između preporučenog nivoa 25(OH)D u serumu i aktuelnog nivoa 25(OH)D u serumu;
- $c_f$  faktor konverzije;
- $F_i$  unos razmatrane namirnice koja bi se obogaćivala;
- $L_r$  preporučeni nivo 25(OH)D u serumu;
- $L_a$  aktuelni nivo 25(OH)D u serumu.

Aktuelni nivo  $L_a$  je specifičan za svaki mesec u godini.

Da bi se dobila informacija o novoj vrednosti 25(OH)D u serumu - ( $n$ ), u slučaju obogaćivanja vitaminom D za svaki „x“ mesec u godini ( $L_{nx}$ ), računaju se koncentracije vitamina D kao funkcija aktuelne („a“) 25(OH)D koncentracije po mesecu „x“ ( $L_{ax}$ ) plus njen porast usled konzumacije obogaćene hrane ( $F_i$ ):

$$L_{nx} = L_{ax} + (c_f * F_i * f_v) / 100 \quad (16)$$

Kako promena nivoa obogaćivanja na mesečnom nivou nije praktična, autori sugerišu sezonsku promenu nivoa u zimskom i letnjem periodu.

Nivoi obogaćivanja namirnica (hleba, mleka i soka) izraženi su na 100 g porcije. Sumarni rezultati dobijeni primenom ovog modela na nemačkoj studiji o ishrani su sledeći. Utvrđeno je da je prosečna dnevna konzumacija hleba 180 g. Primenom prvog modela dolazi se do konstantne količine od 6,5 µg vitamina D koji treba dodati na 100 g hleba, da bi se prosečnom potrošaču hleba obezbedilo 15 µg/dan (po IOM preporukama). Ako bi se primenjivao drugi model, koji podrazumeva sezonsku promenu koncentracije dodatog vitamina D radi postizanja i održavanja željene koncentracije 25(OH)D u serumu u toku cele godine, onda bi se dobilo da je u januaru hlebu potrebno dodati 11,3 µg/100 g da bi se postigao unos od 23,7 µg (20,3 µg iz hleba + 3,1 µg iz hrane + 0,3 µg iz suplemenata) a taj unos bi rezultirao koncentracijom 25(OH)D u serumu od 75 nmol/l. U letnjem periodu, tj. od maja do septembra, nije potrebno dodavati vitamin D hlebu. Model predviđa koncentracije za niske potrošače - na 5. percentilu, kao i za visoke - na 95. percentilu, kao i različite nivoe obogaćivanja za mleko i sokove.

Analizom svih faktora kroz oba modela, autori su došli do zaključka da hleb ima najstabilniji efekat na koncentraciju 25(OH)D u serumu, jer se konstantno konzumira u toku godine, i da je razlika između niske, srednje i visoke vrednosti konzumacije mnogo manja nego kod potrošača mleka i sokova, čija konzumacija na 5. percentilu može da bude i 0. Stoga, smatraju da hleb može biti dobar nosač vitamina D, s obzirom da ga konzumiraju sve starosne i socijalne grupe, te da je moguće centralno kontrolisati količine dodatog vitamina D. Klinička studija sprovedena u Danskoj takođe je pokazala efikasnost obogaćenog hleba (sa oko 4-5 µg/100 g) i mleka (0,4 µg/100 ml) na podizanje dnevnog unosa vitamina D i koncentracije 25(OH)D u serumu. Unos vitamina D veći od 7,5 µg/dan postignut je kod 78% dece i 56% odraslih, dok je kod 84% ispitanika, koji su konzumirali obogaćene proizvode, zabeležen porast 25(OH)D koncentracije > 50 nmol/l na kraju studije (Madsen et al., 2013). Ovaj model se može primenjivati i na druge namirnice u drugim zemljama, ukoliko su dostupni neophodni parametri (Brown et al., 2013).

Konačno, primenom prediktivnih modela obogaćivanja više vrsta prehrambenih proizvoda, koji su deo uobičajene ishrane stanovništva, iz različitih grupa, sa različitim sadržajem



vitamina D, mogla bi se uraditi studija adekvatnosti obogaćivanja, njegova optimizacija, kao i procena porasta nutritivnog unosa vitamina D u različitim populacionim grupama ukoliko bi se takav sistem primenjivao u praksi (Cashman & Kiely, 2016; Kiely & Black, 2012). Obogaćivanje više vrsta prehrambenih proizvoda odgovarajućim količinama vitamina D omogućilo bi širi spektar konzumenata, dok bi mogućnost prekomernog unosa bila svedena na minimum.

## Razvoj istraživačke infrastrukture u nutricionizmu

Razvoj harmonizovanih sistema za praćenje i procenu ishrane na različitim nivoima jeste preduslov za identifikovanje obrazaca ishrane, za sprovođenje istraživanja o povezanosti ishrane i bolesti, nutritivnog statusa, kao i za naučno-bazirano planiranje efektivnih strategija. U prethodnoj deceniji u Evropi se intenzivno radilo na građenju i harmonizovanju istraživačke infrastrukture u oblasti istraživanja ishrane i hrane. Danas mnoge zemlje Evrope imaju ustanovljene programe za praćenje obrazaca ishrane, koji obezbeđuju relevantne informacije o unosu hrane i nutrijenata u različitim grupama u populaciji. Takvih programa u našem regionu nema, te su neretko rezultati istraživanja neusklađeni sa evropskim, postoje razlike u primenjenim metodologijama, što sve onemogućava donošenje pravih odluka u oblasti javnog zdravlja na nacionalnom i regionalnom nivou (Novakovic et al., 2012). Da bi se mogli ustanoviti i pratiti problemi vezani za ishranu stanovništva potrebno je razviti **istraživačku infrastrukturu** - savremene i standardizovane alate i metode za istraživanje ishrane za koje je preduslov razvoj kapaciteta (Capacity Development-CD) u ovoj oblasti u zemljama Centralne i Istočne Evrope i Balkana kao i ulaganje u razvoj kadra za sprovođenje ovakvih istraživanja (Gurinović et al., 2010; Gurinović et al., 2014).

Razvoj kapaciteta u oblasti istraživanja ishrane podrazumeva razvoj ljudskih resursa, organizacione, institucionalne i pravne okvire, koji svi zajedno mogu da eksploatišu različita znanja u razvoju i korišćenju istraživačke infrastrukture. Naučni Komitet za Ishranu Univerziteta Ujedinjenih Nacija (United Nations University System Standing Committee for Nutrition- UNU/SCN) podržao je osnivanje Mreže za razvoj kapaciteta u ishrani u Centralnoj i Istočnoj Evropi (Network for Capacity Development in Nutrition in Central and Eastern Europe-NCDNCEE) (Pavlovic et al., 2009) koja je kasnije dobila ime CAPNUTRA (Capacity Development Network in Nutrition in Central and Eastern Europe) (Mirjana Gurinović, Milešević, Novaković, et al., 2016). Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu i CAPNUTRA priključili su se u prethodnoj deceniji brojnim projektima, koji su rezultirali značajnim unapređenjem instrumenata i baza podataka za proučavanje ishrane (Gurinović et al., 2010; Gurinović et al., 2018; Gurinović, Milešević, Kadvan, et al., 2016).

Jedan od najznačajnijih ishoda ovih projekata je EuroFIR-Evropska platforma za informacije o hrani, koja okuplja 27 evropskih i tri vanevropske nacionalne baze podataka o sastavu prehrambenih proizvoda (EuroFIR, 2018). Sve ove baze podataka su harmonizovane i standardizovane u pogledu kategorizacije prehrambenih proizvoda i informacija o sadržaju nutrijenata u njima, a svi podaci o izvoru informacija su dokumentovani. Srpska baza o sastavu prehrambenih proizvoda i receptura iz srpske ishrane jedna je od njih (Gurinović et al., 2016b).

Drugi element istraživačke infrastrukture predstavljaju programi za nutritivna izračunavanja. Ovi programi kombinuju podatke iz baza o nutritivnom sastavu prehrambenih proizvoda, podatke o konzumaciji prehrambenih proizvoda i preračunavaju nutritivne unose makro- i mikro-nutrijenata, upoređujući ih sa preporučenim nutritivnim vrednostima (Gurinović et al., 2016c). Ovakvi programi predstavljaju osnovne alatke za savremena nutritivna izračunavanja jer omogućavaju praćenja ishrane velikog broja ispitanika, različitih parametara (antropometrijskih, fizioloških, životnog stila, itd.) i njihovih odnosa.

U ovom radu koristiće se napredni softver DIET ASSESS AND PLAN (DAP) koji se bazira na elektronskim verzijama standardnih upitnika o konzumaciji hrane - 24HDR, upitnika o frekvenciji konzumacije namirnica (Food Frequency Questionnaire-FFQ), dnevnika ishrane (Food Record-FR) i upitnika o učestalosti konzumiranja namirnica (Food Propensity Questionnaire-FPQ). Softver koristi integrisani atlas porcija hrane i omogućava prikupljanje opštih, antropometrijskih i biohemijskih podataka. S druge strane, integrisana baza podataka o sastavu namirnica (BPSN) i nutritivne preporuke omogućavaju kompleksne kalkulacije i evaluacije nutritivnog unosa na individualnom i populacionom nivou, planiranje ishrane, dizajn i/ili reformulacije prehrambenih proizvoda, izradu nutritivnih deklaracija, itd. (Gurinović et al., 2018). Pomenuti softver biće korišćen u ovoj disertaciji za sva nutritivna merenja i obradu podataka.

## Baze podataka o sastavu namirnica

*"Poznavanje hemijskog sastava hrane je osnova za tretman bolesti izazvanih hranom ili za bilo koje kvantitativno istraživanje ljudske ishrane"* (McCance & Widdowson, 1940). Izraz „podaci o sastavu namirnica“ obuhvata sve informacije koje se tiču identifikacije i opisivanja namirnica i sadržaja njihovih komponenti (Becker, Unwin, Ireland, & Moller, 2007). Tradicionalno, izvor informacija o sastavu hrane štampao se u formi tabela. Danas su one zamenjene kompjuterizovanim bazama podataka o sastavu namirnica, koje su proistekle iz štampanih verzija.

Informacije o sastavu namirnica imaju široku primenu u zdravstvu, poljoprivredi i trgovini. Ovi podaci su od važnosti za planiranje ishrane na nacionalnom i međunarodnom nivou, kao i za praćenje ishranjenosti stanovništva i pojedinaca. Kako bi se ove informacije mogle koristiti širom sveta, u toku 20. veka osnovane su nacionalne i internacionalne organizacije čiji cilj je prikupljanje informacija o sastavu namirnica i njihovo pohranjivanje u harmonizovanim i standardizovanim bazama podataka. Ovako organizovane informacije omogućavaju višedimenzionalna praćenja, procene i planiranja vezana za hranu i ishranu, ali i razvoj u najširem smislu (Greenfield & Southgate, 2003).

Podaci se najčešće koriste u istraživanjima uticaja ishrane na zdravlje, reprodukciju, rast i razvoj. Primenjuju se i u planiranju ishrane na populacionom nivou i u kriznim situacijama, kao i u kliničkoj praksi. Pored ovoga, podaci predstavljaju osnovu za razvoj obrazovnih programa i širenja svesti o zdravoj ishrani. Mnoge države regulisale su pravila za nutritivno deklarisanje namirnica, čime se obezbeđuje informisanje potrošača, a informisanost omogućava bolje donošenje odluka prilikom kupovine namirnica (Greenfield & Southgate, 2003).

Podaci o sastavu namirnica prvenstveno nastaju u sertifikovanim laboratorijama i/ili u laboratorijama proizvođača hrane. U nekim zemljama proizvođači su obavezni da obezbede analitičke podatke o svojim proizvodima, dok je u drugim dozvoljena upotreba podataka iz akreditovanih izvora, kao što su nacionalne baze podataka o sastavu namirnica, koje zamenjuju primenu direktne analize. Upotreba podataka o sastavu namirnica ima važnu ulogu u međunarodnoj trgovini namirnicama, gde zemlje uvoznice, sa uspostavljenom regulativom

o deklarisanju namirnica, zahtevaju da kvalitet uvozne hrane zadovoljava standarde jednake onima na lokalnom tržištu. Imajući ovo u vidu, kompjuterizovane baze podataka imaju suštinsku prednost nad štampanim tabelama o sastavu namirnica jer mogu da obuhvate veću količinu podataka i lakše koriste u daljim izračunavanjima i izradi deklaracija. Informacije se mogu preformulisati u različite formate, prema potrebama različitih korisnika.

Na svetskom nivou uspostavljen je sistem kompatibilnih baza podataka o sastavu namirnica, u okviru programa INFOODS (International Network of Food Data Systems), osnovanog 1984. godine, po preporuci internacionalne grupe eksperata, a pod pokroviteljstvom FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) i Univerziteta Ujedinjenih Nacija (United Nations University (UNU)). Cilj ovog programa je podsticanje i koordinisanje aktivnosti u oblasti prikupljanja kvalitetnih podataka i proširivanja njihove dostupnosti širom sveta. Da bi to omogućio, INFOODS je definisao standarde i vodiče za prikupljanje, sastavljanje i objavljivanje podataka o hrani (Greenfield & Southgate, 2003).

Druga značajna organizacija, koja se na evropskom nivou bavi prikupljanjem i upravljanjem bazama podataka o sastavu namirnica je EuroFIR AISBL (Evropski izvor informacija o hrani - Nefitna internacionalna asocijacija). Ona je proistekla iz Mreže Izuzetnosti, 2009. godine, nakon projektnog ciklusa FP6, tj. EuroFIR projekta (Finglas, Berry, & Astley, 2014). EuroFIR je takođe uspostavio tehničke standarde i razvio platformu za prikupljanje, pohranjivanje i plasman podataka o sastavu hrane. Podaci su organizovani na harmonizovan način, što omogućava njihovo poređenje i nedvosmislenost identiteta i opisa namirnica, nutrijenata i njihovog sadržaja. Standard takođe obuhvata procedure za upravljanje podacima i razmenu/prenos podataka (Becker et al., 2008). EuroFIR do danas pohranjuje 27 nacionalnih evropskih i tri van-evropske baze podataka na jednoj zajedničkoj internet platformi i redovno ih ažurira. Podaci se koriste u raznovrsnim istraživačkim i razvojnim projektima u Evropi i svetu (EuroFIR AISBL, n.d.).

U okviru EuroFIR-a, razvijen je web - pretraživač – FoodEXplorer™, koji omogućava napredno pretraživanje svih ovih BPSN, po svim grupama namirnica, pojedinačno, kao i po svim nutrijentima, metodama korišćenim za njihovo dobijanje, po dostupnoj dokumentaciji, itd. (EuroFIR AISBL, 2011). Ovaj pretraživač biće korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji za ekstrakciju podataka o sadržaju vitamina D.

Rezultati hemijskih analiza nutrijenata predstavljaju osnovu baze podataka o sastavu namirnica. Standardi propisuju, između ostalog, metode koje se koriste za određivanje pojedinačnih komponenti, da bi se obezbedila uporedivost rezultata. Prilikom odabira podataka iz drugih izvora, npr. iz literature, proverava se primenjena metoda, da bi se u baze podataka uključili najadekvatniji podaci.

## Osnovne strukturne karakteristike baza podataka o sastavu namirnica

Građenje baze podataka o sastavu namirnica u okvirima propisanih standarda podrazumeva prikupljanje, opisivanje i organizovanje podataka o procedurama uzorkovanja, opis uzorka/namirnice, opis analitičke procedure ili derivacionih metoda za dobijanje nutritivnih vrednosti kombinovanih obroka (receptura), navođenje izvora podataka i definisanje kriterijuma kvaliteta rezultirajućih vrednosti. Za savremeno pohranjivanje i organizovanje podataka najčešće se koriste softveri za upravljanje bazama podataka (SUBP) koji omogućavaju da se ove informacije međusobno povezuju zajedničkim poljima, tj. imenodima ili kodovima. Ovi kodovi dodeljuju se namirnicama, vrednostima, metodama i referencama prilikom unosa, a dogovoreni su zajedničkim tezaurusima, koji se primenjuju kao svojevrsan rečnik baza podataka. Tezaurusi mogu biti organizovani po hijerarhiji, a u tom slučaju termini mogu biti povezani širim ili užim vezama. Svaki standardizovani rečnik se, uglavnom, održava i objavljuje u okvirima autoritativnih tela. Primeri su imena država i jezika, jedinice mere, klasifikacije grupe namirnica, analitičke metode (npr. AOAC, NMKL), itd. Autoritativna tela su ISO, CEN, CODEX, INFOODS, EUROFOODS i LanguaL Tehnički Komitet (Becker et al., 2007). EuroFIR je, na primer, usvojio sistem tezaurusa koji se mogu klasifikovati u sledećim grupama termina:

- Komponente
- Jedinice
- Jedinice matriksa
- Tipovi vrednosti

- Tipovi metoda
- Indikatori metoda
- Tipovi publikacija
- Tipovi izvora.

LanguaL (Lingua Alimentaria- univerzalni jezik o hrani tj. hijerarhijski sistem za klasifikaciju karakteristika hrane) tezaursi takođe su primenjeni u organizovanju, klasifikaciji i opisivanju namirnica u bazama podataka (Becker et al., 2007).

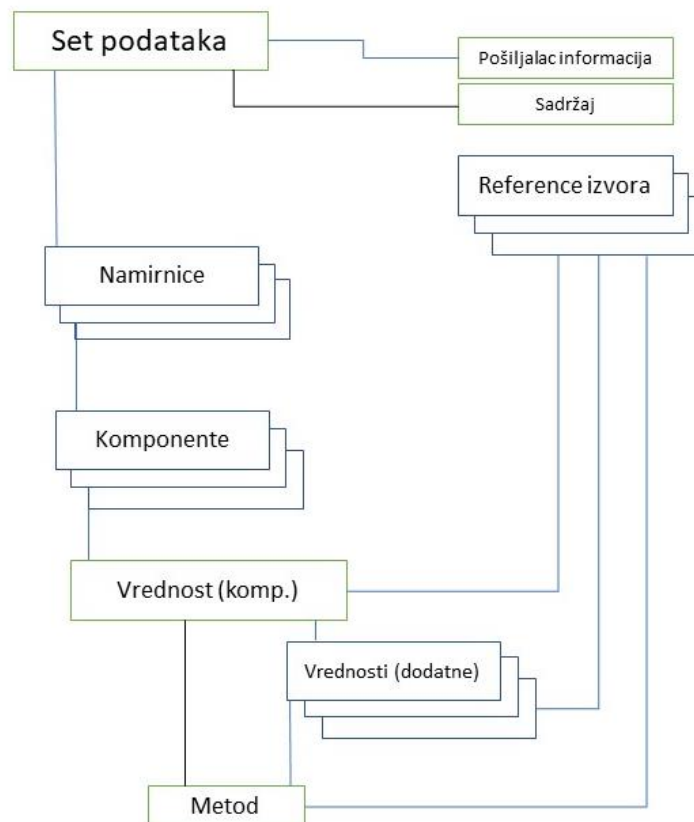
### *Definisanje i opisivanje osnovnih entiteta*

Slika 1. prikazuje šematsku povezanost i komunikaciju među različitim setovima informacija, odakle se može videti da se namirnice unose slobodno, dok su za njih vezane komponente (nutrijenti, bioaktivne supstance, pesticidi) predviđene dogovorenim tezaursima (prioritetne komponente, tj. komponente 1., 2., 3. do n-tog reda). Vrednosti sadržaja komponenti unose se zajedno sa referencama o poreklu tih vrednosti, kao i informacije o metodama koje su korišćene za dobijanje ovih vrednosti i takođe su povezane referencama. Metoda može biti direktno vezana i za vrednost, pa time i za referencu. Osnovni entiteti u ovakvoj organizaciji podataka su: namirnica, komponenta, vrednosti, specifikacija metode, reference, tip izvora, pošiljalac informacija, sadržaj.

**Namirnica** - entitet koji je obavezan u svakoj bazi i sadrži osobine koje opisuju namirnicu unesenu u bazu podataka. Veliki set deskriptora i pratećih informacija je potreban da bi se namirnica identifikovala i opisala u bazi podataka, kao što su ime, klasifikacija i opis na osnovu standardizovanog tezaurusa (npr. LanguaL-a). Pored toga, mogu se unositi specifične informacije o uzorcima analiziranim u laboratoriji, prehrambeni proizvodi od specifičnog proizvođača, kao i opšte informacije o namirnicama ili proizvodima. Za EuroFIR standard karakteristično je to da se određene namirnice mogu povlačiti iz drugih kompatibilnih baza pod uslovom da su te namirnice opisane standardizovanom terminologijom.

**Komponenta** - entitet koji je obavezan u bazi i predstavlja sastojak namirnice koji se može izmeriti hemijskim, biološkim ili mikrobiološkim metodama, ili se može izračunati na osnovu zbira količina drugih sastojaka. Ona podrazumeva nutrijente, bioaktivne supstance i kontaminante. Druge mere i osobine kao što su gustina, procenat/količina u jestivoj porciji,

vrednost pH ili npr. faktor za preračunavanje azota u proteine za izračunavanje sadržaja proteina, mogu se takođe priključiti ovim podacima. Entitet komponente obuhvata karakteristike kao što su ime (po mogućstvu u dva jezika - nacionalni i engleski) i standardnu klasifikaciju hemijskih komponenti. Primena tezaurusa za definisanje komponente je od ključnog značaja jer se time sprečava dvosmisleno dodeljivanje i tumačenje komponenti i njihovih vrednosti.



**Slika 1.** Šematski prikaz osnovnih entiteta i njihovih veza u sastavljenom setu podataka o sastavu namirnica (Becker et al., 2007).

Entitet **Vrednosti** odnosi se na količinu komponente u hrani, zajedno sa opisom te vrednosti, kao što su njene statističke karakteristike. Količine se mogu dobiti hemijskom analizom, kalkulacijom ili usvajanjem (procenom) na osnovu drugih sličnih namirnica. Upotrebljeni metod određivanja utiče na opis vrednosti koja se prikazuje, kao i na povezanu dokumentaciju o metodi i referencu. Vrednost je obavezna u bazi podataka o sastavu namirnica i sadrži



osobine koje opisuju vrednost za određenu kombinaciju hrana-komponenta. Ovi podaci podrazumevaju tipove vrednosti kao što su: srednja vrednost, manje od, ispod granice određivanja itd., vrednosti dobijene metodom derivatizacije iz drugih podataka i ocenu kvaliteta. Statistički podaci, kao što su broj uzoraka, srednja vrednost, medijana, minimum, maksimum, i standardna devijacija mogu se takođe dokumentovati. Entitet Vrednost se povezuje entitetima metoda i referentna dokumentacija za vrednost, što je prikazano na slici 1. Osobina zvana „odabrana vrednost“ je jedinstvena najreprezentativnija statistička vrednost koja je bazirana na odluci kompilatora (osobe koja se bavi prikupljanjem i građenjem BPSN). Vrednosti koje se unose moraju biti identične onima iz dokumentacije, uključujući i broj decimalnih mesta. Ove vrednosti se potom vezuju za jedinicu (mg, g, ml, l itd.) i jedinicu matriksa, koja predstavlja meru matriksa u kome se nalazi izražena komponenta, npr. na 100 g jestive porcije ili na 100 g ukupnih masnih kiselina. Iako se ovakvi podaci mogu odnositi na individualne vrednosti, obično se donosi odluka da se jedna vrsta jedinica koristi u celoj bazi. Sa jedinicom matriksa situacija je delimično komplikovanija, jer se u nekim slučajevima fiksirana jedinica matriksa vezuje za vrednosti za datu namirnicu, gde će se za neke analitičke vrednosti određene komponente primenjivati ta specifična jedinica matriksa.

Entitet Vrednosti takođe uključuje osnovnu dokumentaciju metode za vrednost, sa terminima o tipu metode i indikatorom metode.

**Specifikacija metode** je entitet koji obuhvata detaljnu specifikaciju analitičke metode korišćene da se dobije vrednost, sa kojom se povezuje. Pored karakteristika zvanične metode i informacija o referenci metode, ona uključuje delove koji sadrže informacije o glavnim analitičkim koracima i parametrima laboratorijskog učinka. Ovaj entitet nije obavezan.

Bibliografske i druge povezane informacije o originalnoj referenci citirane u bazi podataka prikupljaju se u entitetu **Reference**. Reference iz publikovane i nepublikovane literature (npr. laboratorijski izveštaji) mogu se povezivati sa vrednostima komponenata, metodama, opisom hrane/uzorka i drugim meta-podacima. Referenca se mora opisati sa dovoljno bibliografskih referentnih informacija, kako bi se jednoznačno identifikovala.

Entitet **Reference** sadrži informacije o referencama citiranim u delu baze podataka gde su entiteti Vrednosti i Metode. Reference su najčešće vezane za entitete koje ih citiraju, ili u bazi podataka linkom ili poljem u entitetu, ako on dozvoljava citiranje samo jedne reference. Vrednost se može vezati sa više Referenci, ako je rezultat vrednosti dobijen iz proseka više

vrednosti. S druge strane, polje za link može biti dovoljno za hranu (npr. ako se opisuje uzorak namirnica ili recept) ili za Specifikaciju Metode. Reference se mogu pojaviti u različitim bibliografskim formama, kao što su publikovani ili nepublikovani izveštaji, radovi iz časopisa, članci iz knjiga, veb-stranice, prehrambene deklaracije, itd. Ovaj aspekt se kodira korišćenjem tezaurusa za **Tipove Referenci**. Pored toga, **Tip Izvora** se koristi za opisivanje statusa informacija o referenci, kao što su recenzirana naučna publikacija, evaluirana tabela podataka o hrani, „vlastiti“ podaci ili podaci proizvođača namirnica.

Referenca je obavezan entitet pod uslovom da je bar jedna referenca citirana u bazi. Stil prikazivanja ovih informacija treba da bude što sličniji konvencionalnom prikazivanju naučne literature, koji je primenjen u softverima za uređivanje i publikovanje bibliografija (npr. Reference Manager, EndNote).

U razmeni podataka, zaglavlje **Pošiljalac Informacija** predstavlja entitet koji obuhvata podatke o prijavljenoj osobi/ organizaciji zaduženoj za pripremanje i otpremanje podataka o hrani, kao i kontakt informacije.

U razmeni podataka, zaglavlje **Sadržaj**, služi za elementarne informacije o bazi podataka, o entitetu Namirnica u paketu za transfer podataka, kao i o organizaciji koja je odgovorna za nju. Sadržaj precizira zakonska ograničenja, npr. autorska prava, koja se tiču podataka i sumira sadržaj paketa i daje sveobuhvatnu bibliografsku referencu za izvor podataka u entitetu Hrana (Becker et al., 2007).

### *Metode prikupljanja podataka o sastavu namirnica*

U građenju baze podataka o sastavu namirnica postoje tri pristupa prikupljanju podataka koja određuju kvalitet i upotrebljivost baze: direktni, indirektni i kombinovani metod.

#### Direktni metod

U direktnom metodu sve vrednosti su rezultati analiza sprovedenih u svrhu građenja baze podataka, a njegove prednosti su stroga kontrola uzorkovanja, analize i kvaliteta, što rezultira visoko pouzdanim podacima. Prve tabele sa podacima o sastavu namirnica bile su napravljene

od ovakvih vrednosti. Ipak, jasno je da je direktan metod skup i dugotrajan, što predstavlja glavni uzrok nedostataka ovakvih podataka u mnogim delovima sveta.

#### Indirektni metod

Indirektni metod koristi podatke iz publikovane literature ili nepublikovanih laboratorijskih izveštaja. Samim tim, kvalitet podataka je niži. Stoga se ovi podaci posebno pažljivo ocenjuju i kontrolišu prilikom uključivanja u bazu podataka. U nekim slučajevima vrednosti su usvojene, izračunate ili pozajmljene iz drugih tabela ili baza podataka i ponekad je nemoguće utvrditi poreklo podataka unazad. Ovakve vrednosti imaju niži stepen pouzdanosti. Indirektni metod uglavnom se koristi kada su analitički resursi ograničeni, ili kada su izvori hrane pretežno iz uvoza, pa se uzimaju podaci iz zemalja odakle je hrana. Ovaj metod zahteva manje vremena i resursa u odnosu na direktan metod.

#### Kombinovani metod

Danas, najveći broj baza podataka o sastavu hrane sačinjen je kombinovanjem prethodna dva metoda: originalne analitičke vrednosti, vrednosti iz literature i drugih baza podataka i usvojene i preračunate vrednosti. Ovaj kombinovani metod najisplativiji je, a i efikasan je, u situacijama kada se osnovne namirnice direktno analiziraju, a podaci za namirnice koje se ređe ili u manjim količinama konzumiraju, uzimaju iz literature. Ipak, minimalnom upotrebom usvojenih i preračunatih vrednosti, u principu, povećava se pouzdanost i reprezentativnost baze podataka (Greenfield & Southgate, 2003).

#### *Tipovi podataka o sastavu namirnica*

Baze podataka o sastavu namirnica sadrže vrednosti različitog kvaliteta, odražavajući različite načine na koje su one dobijene. Ako su podaci prikupljeni da bi imali širu internacionalnu primenu u nutritivnim istraživanjima, obrazovanju, prehrambenoj regulativi i proizvodnji, oni moraju biti konzistentni i upotrebljivog kvaliteta. Tipovi podataka i njihovi izvori mogu se identifikovati u bazama podataka po kodovima, kako je u mnogim zemljama, ili po

referencama. Po generalnom poretku, izvori podataka su: originalne analitičke vrednosti, pripisane vrednosti, izračunate vrednosti, pozajmljene vrednosti i pretpostavljene vrednosti.

#### Originalne analitičke vrednosti

Ove vrednosti uzete su iz publikovane literature ili nepublikovanih laboratorijskih izveštaja, bez obzira da li su ili ne dobijene analizama sprovedenim izričito za potrebe sastavljanja baze podataka. One mogu biti uključene u bazu podataka nemodifikovane, kao odabir ili prosek analitičkih vrednosti, ili kao kombinacije vrednosti, da bi se obezbedila reprezentativnost krajnjih vrednosti. Originalne izračunate vrednosti se uključuju u ovu kategoriju (npr. vrednosti za sadržaj proteina izračunate množenjem sadržaja azota sa odgovarajućim faktorom, ili masnih kiselina na 100 g hrane izračunatih na osnovu sadržaja masnih kiselina na 100 g ukupnih masnih kiselina).

#### Pripisane vrednosti

Ovi podaci su procenjeni na osnovu analitičkih vrednosti dobijenih iz drugih sličnih namirnica (npr. vrednosti za grašak koriste se za zelenu boraniju) ili za druge forme iste namirnice (npr. vrednosti „prokuvane“ koriste se i za namirnice pripremljene „na pari“). One se takođe mogu dobiti kalkulacijom iz nekompletnih ili parcijalnih analiza hrane (npr. ugljeni hidrati ili vlaga na osnovu razlike, natrijum iz vrednosti hlorida, ali još češće hlorid izračunat iz vrednosti natrijuma). Slične kalkulacije mogu se uraditi poređenjem podataka različitih formi iste namirnice (npr. „suvo“ prema „svežem“ ili „obezmašćeno“ prema „svežem“).

#### Izračunate vrednosti

Ove vrednosti dobijaju se iz receptura, izračunavanjem sadržaja nutrijenata u sastojcima i korigovanjem faktorima pripreme: gubitak ili dobitak na težini obično se odnosi na faktor prinosa, a promene u mikronutrijentima obično na retencione faktore. Ove vrednosti su samo

grube procene, zato što uslovi pripremanja recepata drastično variraju (temperatura ili dužina kuvanja), i u mnogome utiču na retencione i faktore prinosa.

Drugi metod kalkulacije su izračunavanja vrednosti nutrijenata kuvane hrane baziranih na njihovim vrednostima u sirovoj hrani, ili iste hrane pripremljene na drugačiji način, korišćenjem specifičnih algoritama, retencionih faktora i faktora prinosa.

#### Pozajmljene vrednosti

Ove vrednosti su uzete iz drugih tabela i baza podataka, gde povezivanje sa originalnim izvorom može, ali ne mora biti moguće. Adekvatne reference originalnog izvora su potrebne da bi se opravdalo pozajmljivanje vrednosti. U nekim slučajevima, pozajmljene vrednosti trebalo bi prilagoditi različitim sadržajima vode i/ili masti.

#### Pretpostavljene vrednosti

Za ove vrednosti se pretpostavlja da su na nivou određenom na osnovu regulative, ili nula - kod namirnica koje teoretski nikako ne mogu sadržati taj nutrijent (saharoza u uljima, holesterol u namirnicama biljnog porekla) (Greenfield & Southgate, 2003).

### Selekcija prioriternih namirnica i nutrijenata pri građenju baze podataka o sastavu namirnica

Cilj građenja baze podataka o sastavu namirnica je da obuhvati dovoljan broj namirnica i nutrijenata, kako bi se omogućilo sveobuhvatno procenjivanje ishrane jedne populacije. Jasno je da je ovaj cilj veoma zahtevan, pa se pribegava prioriternom odabiru grupa namirnica, namirnica i nutrijenata koje mogu da pomognu u procenjivanju prioriternih problematika. Razvoj baza podataka o sastavu namirnica je neprestani proces, jer se one razvijaju u skladu

s potrebama nutritivnih istraživanja, s razvojem prehrambenih proizvoda, s trendovima ishrane određene populacije, kao i s potrebama za određenim nutrijentima.

Iako je veliki broj zemalja sveta odavno počeo da izgrađuje svoje baze podataka o sastavu namirnica, ovde se navode postupni koraci u građenju *de novo* baze podatka.

Primarno utvrđivanje prioriternih namirnica koje bi trebale da se nađu u jednoj bazi podataka, izvodi se na osnovu statistike konzumiranja namirnica, na subpopulacionom ili populacionom nivou, gde se dolazi do „osnovne liste namirnica“. Da bi se došlo do ove liste nije dovoljno posmatrati samo statistiku na nivou ukupne populacije, već se moraju uzeti u obzir i obrasci ishrane specifičnih grupa, kao što su deca ili ljudi sa posebnim nutritivnim potrebama. Takođe, posmatranje specifičnih, etničkih, kulturoloških, religioznih i tradicionalnih obrazaca ishrane ulazi u okvir odabira namirnica tokom građenja baze podataka (Greenfield & Southgate, 2003). Na primer, u razvoju srpske baze podataka korišćena je velika nutritivna studija JUSAD, u okviru koje je posmatrana ishrana dece i njihovih porodica u toku dvadeset godina (Gurinović & Kadvan, 2011) te je na osnovu nje ustanovljena prioriterna lista namirnica koje su uključene u sadašnju bazu podataka. Lista je u novije vreme obogaćena tradicionalnim recepturama jela koje se svakodnevno koriste u ishrani srpskog stanovništva (Gurinović, Milešević, Kadvan, et al., 2016).

Pri odabiru namirnica, mora se uzeti u obzir njihov doprinos unosu prvenstveno energije, što znači da osnovni činioči energetskeg unosa u ishrani jedne populacije čine osnovnu listu namirnica za jednu bazu podataka. Sličan princip primenjuje se pri utvrđivanju namirnica koje su glavni izvori proteina, ali i važnih vitamina (npr. vitamin A, vitamin C) i minerala (npr. gvožđe, kalcijum). Ako je u jednoj populaciji identifikovan nedostatak nekog nutrijenta, namirnice sa tim nutrijentom treba da nađu mesto u bazi podataka, kako bi se omogućilo procenjivanje veličine problema. I obrnuto, primenom kvalitetnih baza podataka mogu se utvrditi nutritivni nedostaci u ishrani, što je jedna od njenih osnovnih funkcija. Razvoj prehrambenih proizvoda kao i konzumacija uvoznih proizvoda takođe treba da se razmatraju prilikom kreiranja prioriternih liste namirnica za bazu podataka (Greenfield & Southgate, 2003).

Kada se pristupa odabiru namirnica, važno je izbalansirati broj namirnica u okviru posebnih grupa namirnica, kako bi se izbeglo favorizovanje jedne vrste u odnosu na druge u kompletnoj ishrani populacije. Postoje različite kategorizacije grupa namirnica (FAO, EFSA, EuroFIR), koje

se delimično poklapaju, u smislu pripadanja određenih namirnica jednoj ili drugoj grupi u različitim kategorizacijama (Greenfield & Southgate, 2003). Naravno, za potrebe određenih, specifičnih istraživanja, grupisanje namirnica u druge, nestandardne grupe namirnica je moguće.

Kada se razmatraju nutrijenti koje bi trebalo uključiti u bazu podataka, ideal kome se teži je da baza sadrži sve nutrijente i bioaktivne komponente za koje se zna da su važni u ljudskoj ishrani. Kako je ovaj ideal teško ostvariv zbog ograničenih sredstava, moraju se doneti odluke o primarnim nutrijentima. Mere selekcije su jednako poželjne i praktične, posebno u pogledu analitičkog rada, koji zahteva dostupnost resursa, tako da se prilikom donošenja odluka o nutrijentima uzimaju u obzir:

- a. Potreba za osnovnim informacijama, kao što su sadržaj vode, energije, proteina, masti, ugljenih hidrata - koje predstavljaju minimum zahteva za popunjavanjem informacija o određenoj namirnici.
- b. Zdravstveni problemi u određenoj zemlji: u zemljama u kojima su nedostaci nutrijenata primarni zdravstveni problem, informacije o ključnim vitaminima i mineralima biće potrebne. S druge strane, u industrijalizovanim zemljama gde preovlađuju hronične nezarazne bolesti (kardio-vaskularne, dijabetes tip 2, hipertenzija i kancer) informacije o energiji, mastima, masnim kiselinama, holesterolu, ugljenim hidratima i natrijumu su prioritetne.
- c. Trend u nutritivnim i toksikološkim naukama: sveobuhvatna baza podataka trebalo bi da uključi i one nutrijente za koje postoje preporuke za unos, na nacionalnom ili međunarodnom nivou. Ovde takođe spadaju „novi“ ili „ponovo otkriveni“ nutrijenti za kojima je naglo poraslo interesovanje u naučnom svetu.
- d. Dostupnost postojećih podataka: velika količina podataka o nutrijentima i nutritivnim komponentama često je već dostupna, jer su predmet merenja za potrebe razvoja regulative. Ove podatke trebalo bi uključiti u bazu podataka, ako ispunjavaju kriterijume kvaliteta.
- e. Postojanje adekvatnih analitičkih metoda: dostupnost pouzdanih analitičkih metoda je osnovni faktor za uključivanje komponenti u bazu. Ma koliko postojala potreba za analizom nekog nutrijenta, ona je neisplativa ako je metoda neispitana i daje nepouzdan rezultate.
- f. Izvodljivost analitičkog rada: analiza svakog nutrijenta zavisi od praktičnih faktora:

troškova i vremena koje zahtevaju, dostupnosti opreme i hemikalija, obučenosti osoblja, itd. g. Nacionalne i međunarodne regulative deklarisanja: sa razvojem nutritivnog deklarisanja, potreba za sastavom hrane sve je veća, stoga baze podataka treba da obrađuju sve nutrijente koje pravilnici o deklarisanju zahtevaju (Greenfield & Southgate, 2003).

## Specijalizovane baze podataka o sastavu namirnica

Pored gore navedenih štampanih i elektronskih baza, vezanih za određeni softver ili na nekoj veb-platfomi, postoje i specijalne vrste BPSN koje sadrže specifične grupe podataka, čiji kvalitet je veoma često na najvišem, analitičkom nivou. Primeri takvih baza su:

- \* **FAO/INFOODS Analytical Food Composition Database Version 2.0**- baza koja sadrži isključivo analitičke podatke o preko 1900 namirnica iz 12 grupa namirnica, obuhvatajući kako sirove tako i prerađene namirnice (FAO, 2017a).
- \* **FAO/INFOODS Global food composition database for pulses – version 1.0 (uPulses1.0)** – 2017- baza koja sadrži uglavnom analitičke podatke ili podatke iz proverenih izvora, o nutritivnom sastavu mahunarki širom sveta (FAO, 2017b).
- \* **Balkanska Regionalna baza podataka o sastavu namirnica** - koja sadrži namirnice iz regiona Balkana (Srbija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Makedonija i Crna Gora) je nastala u okviru EuroFIR Nexus projekta kao rezultat razvoja istraživačke infrastrukture u regionu. Ideja ovakve baze je da se omogući zemljama u regionu, koje imaju sličnu kulturu ishrane, da koriste podatke o namirnicama i jelima iz susednih zemalja, uključujući i tradicionalna jela, i rade na razvoju iste, doprinoseći podacima iz svoje zemlje (Gurinović, Milešević, Novaković, et al., 2016).
- \* **Specijalizovana baza podataka o sadržaju vitamina D** još jedan je primer baza sa visoko kvalitetnim podacima. Ona obuhvata analitičke podatke o vitaminu D u namirnicama iz nekoliko evropskih zemalja i iz SAD-a (Milešević et al., 2018).

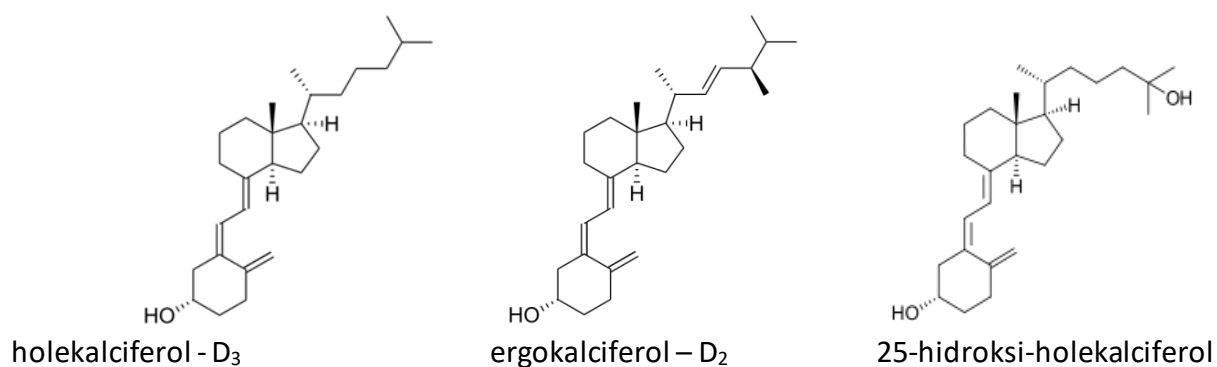


## Analiza vitamina D u hrani

Ono što otežava procenu unosa vitamina D iz hrane, kao i praćenje njegovog sadržaja u prehrambenim proizvodima, jeste primena komplikovane analitičke metode za određivanje njegovog prisustva. Iako postoji standardizovana metoda koja podrazumeva: alkalnu hidrolizu, ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE - solid-phase extraction), primenu semi-preparativne tečne hromatografije visokih performansi (HPLC - High-performance liquid chromatography) i finalnu analizu HPLC-om uz primenu UV detektora ili maseno- spektrometrijskog detektora, u praksi je potrebno dodatno razvijanje postupka za obradu uzoraka različitih tipova matriksa hrane (Bilodeau et al., 2011; Y. Chen et al., 2015; Jakobsen, Clausen, Leth, & Ovesen, 2004; Purchas, Zou, Pearce, & Jackson, 2007). Ove analize su skupe i dugotrajne, što objašnjava nedostatak podataka o sadržaju vitamina D u hrani kao i rutinske kontrole obogaćenih prehrambenih proizvoda.

### Fizičko-hemijske osobine vitamina D

Vitamin D je liposolubilna komponenta koja se u hrani javlja u više oblika: D<sub>3</sub> - holekalciferol (uglavnom u hrani životinjskog porekla), D<sub>2</sub>- ergokalciferol (uglavnom u pečurkama i kvascima), 25(OH)D<sub>3</sub> - 25-hidroksi-holekalciferol i metabolit D<sub>3</sub>, (uglavnom u krvi, mišićima i organima životinja). Hemijske formule ove tri komponente date su na slici 2.



**Slika 2.** Oblici vitamina D u hrani

Vitamini D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> su beli ili blede žuti kristali. Rastvorljivi su do 95% u etanolu, acetonu, mastima i uljima, i potpuno rastvorljivi u benzenu, hloroformu i etru. Ne rastvaraju se u vodi (Ball, 1988). Vitamin D<sub>2</sub> je stabilniji (95%) u uslovima veće relativne vlažnosti (85% RH) i na sobnoj temperaturi, bez prisustva svetlosti, dok je vitamin D<sub>3</sub> stabilniji u pomenutim uslovima, ali i na višim temperaturama (npr. 40°C), ali pri smanjenoj relativnoj vlažnosti (45% RH). U uljanim rastvorima, na 0°C biološka aktivnost vitamina D se smanjuje za 50% u toku tri do četiri godine, dok se u emulzijama ovo dešava u toku tri nedelje (Krampitz, 1980). Vitamin D je nestabilan u kiselinama, čak i u prisustvu slabih kiselina dolazi do izomerizacije i nastanka 5,6 – trans izomera i izotahisterol izomera (DeLuca, 1978). S druge strane, vitamin D je stabilan u alkalnoj sredini (Kutsky, 1973).

U rastvorima, vitamin D pokazuje reverzibilnu termalnu izomerizaciju sa previtaminom D - 7-dehidroholesterolom, formirajući uravnoteženu mešavinu. U čvrstom stanju, vitamin D ne izomerizuje. U rastvorima brzina uspostavljanja ravnoteže zavisi od temperature, pa se tako na 100°C postiže ravnoteža za 30 min, gde je odnos previtamin D: vitamin D 28:72. Na 0°C količina previtamina D nije veća od 4%, dok konverzija traje mesecima. Na temperaturi od 30°C odnos je 9:91, i uspostavljanje ravnoteže traje 10 dana. Brzina izomerizacije ne zavisi od rastvarača, svetla ili katalizatora (Mulder, Vries, & Borsje, 1971).

Osim termalne izomerizacije, rastvori vitamina D u organskim rastvaračima su veoma stabilni ukoliko nema prisustva kiseonika, svetla i kiselina. Vitamin D može da se rastvara u mnogobrojnim rastvaračima bez gubitka UV apsorpcije: dietiletar, dihlormetan, hloroform, metanol, etanol i izooktan. U rastvorima vode i 50% metanola ili etanola, dolazi do gubitka UV apsorpcije u funkciji vremena. Suprotno, alkoholni rastvori vitamina D (80-100%) pokazuju dugotrajno održavanje UV apsorpcije (Chen, Raymond Terepka, Lane, & Marsh, 1965). Stabilnost vitamina D u mastima i uljima odgovara stabilnosti konkretnih masti/ulja, slično vitaminu A, s tim da je vitamin D donekle stabilniji u datim uslovima.

Kada je oslobođen matriksa hrane, vitamin D je podložan razgradnji u prisustvu kiseonika, svetla, kiselina i vode, sa gubitkom UV apsorpcije na 265 nm (Chen et al., 1965). Vitamin D može da se očuva u procesima dimljenja ribe, pasterizacije i sterilizacije mleka i sprejnog

sušenja jaja, iako se uglavnom smatra da dolazi do njegove destrukcije usled lipidne peroksidacije. Kada se koristi za obogaćivanje mleka za odojčad, uobičajena je praksa da se dozvoljava gubitak od 25-35% dodatog vitamina D u toku procesa sušenja (Bender, 1979).

Sve vitamin D aktivne komponente poseduju širok UV apsorpcioni spektar čiji je maksimum na 265 nm. Vitamini D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> nemaju prirodne fluorescirajuće osobine.

## Uzorkovanje i priprema uzoraka hrane za određivanje vitamina D

Literatura o pripremi uzoraka za analizu vitamina D, prirodno prisutnog u namirnicama i onog dodatog u toku obogaćivanja, govori o principijelno ustanovljenoj proceduri koja se sastoji od saponifikacije, ekstrakcije i prečišćavanja uzorka za dalju analizu. Za različite namirnice navode se različite mase potrebnog uzorka da bi se postigla homogenost uzoraka, preciznost i smanjila merna nesigurnost rezultata. Za analizu mesa i proizvoda od mesa navode se sledeće mase: 7,5 g krtine (Liu, Greenfield, & Fraser, 2014; Strobel, Buddhadasa, Adorno, Stockham, & Greenfield, 2013) i 10 g krtine (Ball, 1988; Escrivá, Esteve, Farré, & Frígola, 2002), 50 g mesa, 10 g sala, 25 g slanine (Clausen, Jakobsen, Leth, & Ovesen, 2003; Jakobsen et al., 2004). Od mlečnih proizvoda, Jakobsen i saradnici radili su na uzorcima od: 125 g delimično obranog mleka, 100 g punomasnog mleka, 50 g pavlake sa 13% m.m., 30 g slatke pavlake i 15 g putera (Jakobsen & Saxholt, 2009); stručnjaci iz Agilent Technologies predlažu 15 g mleka, dok je ranija praksa bila da se radi sa 10 g obranog mleka (Ball, 1988). Za analizu jaja, kombinovano je više manjih i većih uzoraka kompletnih svežih i pripremljenih jaja (Roe, Pinchen, Church, & Finglas, 2013). U drugim radovima rađeno je sa veličinama uzoraka od prosečno  $16,25 \pm 0,97$  g za kokošija, 15 g za krokodilska jaja i 10 g za lososovu ikru (Liu et al., 2014). Uzorci margarina težili su 20 g (Brubacher, Müller-Mulot, & Southgate, 1985). Pečurke su analizirane na osnovu praškastih uzoraka od 0,5-1 g mase (Koyyalamudi, Jeong, Pang, Teal, & Biggs, 2011). Uzorci formula za odojčad pripremani su u zapremini od 15 ml (AOAC Official Method 995.05., 1997).

## Priprema uzoraka za ekstrakciju

Uzorci se usitnjavaju i homogenizuju korišćenjem uređaja za mešanje, pri čemu se vodi računa da se ne izlažu visokim temperaturama. Generalno, uzorci se pripremaju i čuvaju dalje od sunčeve svetlosti (u tamnim posudama) i u prisustvu azota (Brubacher et al., 1985), na temperaturama nižim od sobne, a u nekim slučajevima i ispod 0°C, čak do -20°C (Jakobsen & Saxholt, 2009).

### *Alkalna hidroliza (Saponifikacija)*

U analizi sadržaja vitamina D primarno je pristupiti njegovom oslobađanju, tj. raskidanju njegovih veza s proteinima, mastima i lipoproteinskim kompleksima u strukturi namirnice. U analizi namirnica životinjskog porekla, zaštitni želatinski omotač oko kapljica stabilizovanog vitamina mora biti raskinut. Ovo se najefikasnije postiže alkalnom hidrolizom (saponifikacijom). Saponifikacija je ekonomičan način da se velike količine uzorka obrade za pripremu materijala za analizu.

U literaturi se navodi da se saponifikacija na različitim uzorcima hrane uglavnom sprovodi po sledećem principu: vitamini se oslobađaju iz matriksa hrane mešavinom apsolutnog etanola (96%) i vodenog rastvora KOH (50-60% w/v). Reakcija hidrolize raskida estarske veze, oslobađa masne kiseline iz glicerida i fosfolipide iz sterolskih estara. Ova reakcija takođe razgrađuje i veliki broj pigmenata i drugih supstanci rastvorenih u vodi, koje mogu u suprotnom ometati određivanje vitamina (Ball, 1988). U najnovijoj literaturi navode se i drugi rastvarači/smeše rastvarača pogodnih za saponifikaciju kao što su: metanol:KOH, metanol:izooktan (Gomes, Shaw, Whitfield, Koorts, & Hewavitharana, 2013).

Liposolubilni vitamini, nerastvorni u vodi, mogu se ekstrahovati organskim rastvaračima iz alkalnog rastvora, dok masne kiseline i glicerol saponifikuju u uslovima alkalne sredine. Ukoliko uzorak ima puno skroba, pre saponifikacije potrebno ga je rastvoriti enzimom takadiastazom kako bi se sprečilo zgrudvavanje.

U smešu se dodaju antioksidanti, kao što su Na-askorbat, askorbinska kiselina, pirogalolska kiselina ili pirogalol. Saponifikacija se može vršiti u različitim temperaturnim uslovima. U literaturi se navodi „topla“ saponifikacija, koja se izvodi na povišenoj temperaturi (60-80°C), u toku 0,5-1 h uz refluks (AOAC Official Method 995.05., 1997; Brubacher et al., 1985; Clausen et al., 2003; Escrivá et al., 2002; Gomes et al., 2013; Jakobsen et al., 2004; Kaushik, Sachdeva, Arora, & Wadhwa, 2014; Koyyalamudi et al., 2011), ili „hladna“, koja se izvodi na sobnoj temperaturi (25°C) u toku noći (15 do 18 sati) (Bilodeau et al., 2011; Huang, LaLuzerne, Winters, & Sullivan, 2009; Liu et al., 2014; Strobel et al., 2013; Yang, 2013). U toku tople saponifikacije dolazi do termalne izomerizacije između vitamina D i provitamina D, što otežava njegovo dalje određivanje HPLC metodom, zbog interakcija sa drugim kontaminantima koji koeluiraju. Stoga se primenjuju korekcionni faktori koji su definisani uslovima saponifikacije, a predstavljaju konstantan odnos provitamin/vitamina D u izomerizaciji (Mulder et al., 1971). Alternativno, u slučaju nedovoljnog razdvajanja između D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> vitamina, primenjuje se interni standard (IS) jednog oblika vitamina D u određivanju drugog (IS D<sub>2</sub> za određivanje D<sub>3</sub> i obrnuto). Primena IS je poželjna, u kontekstu cele procedure, jer omogućava nadoknađivanje bilo kakvog gubitka vitamina D, uključujući i konverziju vitamina u provitamin u toku termalne izomerizacije. Na kraju, problem termalne izomerizacije može se zaobići primenom hladne saponifikacije. U ovim uslovima, uz konstantno mešanje, potpuno prisustvo azota i antioksidanata, postiže se saponifikacija bez gubitaka (Ball, 1988).

## Ekstrakcija

Ekstrahovati se može sledećim rastvaračima: dietiletom (bez peroksida), dihlormetanom, petroletrom, n-heksanom, etilacetatom i odgovarajućim mešavinama ovih rastvarača (po EN 12821) (CEN, 2009) ili mešavinom etar/petroletar (po USDA ref. laboratoriji). Druge laboratorije koje su radile za USDA, takođe su koristile i n-heptan i heksan (Byrdwell et al., 2008).

### Ekstrakcija iz uzoraka mesa i proizvoda od mesa

U literaturi se navodi da se vitamin D iz mesa i proizvoda od mesa, nakon saponifikacije, kao nesaponifikovani deo ekstrahuje smešom petroletra i dietiletra u odnosu 1:1 (Ball, 1988; Clausen et al., 2003; Jakobsen et al., 2004); za ribe je odnos 80:20, prva ekstrakcija se izvodi sa 150 ml, a naredne tri sa po 75 ml ove smeše (Bilodeau et al., 2011). Strobel i sar. su ekstrahovali vitamin D iz mesa petroletrom, sa 0,02 g BHT/l (Strobel et al., 2013).

Kada se slojevi razdvoje, vodeni deo se odbacuje, a organski sloj ispira dejonizovanom vodom, 10% rastvorom NaCl, 10% etanolom i vodom, do neutralne reakcije koja se utvrđuje fenolftaleinom kao indikatorom i konačno, uparava do (skoro) suva u rotacionom uparivaču uz prisustvo azota. Ako je potrebno primenjuje se  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  za potpuno otklanjanje ostatka vode.

Prečišćavanje, primenom metode SPE, se može izvoditi: n-heptanom, 2-propanol u n-heptanu, cikloheksanom, izopropanol:cikloheksanom sa dihlormetanom (DCM), itd. korišćenjem polarnih MFC18 (Jakobsen et al., 2009) i silika (Bilodeau et al., 2011) kolona ili imuno-sorbenata (Strathmann, Laha, & Hoofnagle, 2011). Razdvajanje komponenata uzorka u ovoj etapi zavisi od različitih afiniteta svake komponente prema tečnoj ili stacionarnoj fazi u toku SPE (Ball, 1988).

### Ekstrakcija iz proizvoda od mleka

Vitamin D se iz proizvoda od mleka ekstrahuje dietiletrom: petroletram (1:1) (Ball, 1988; Jakobsen & Saxholt, 2009) heksanom i vodenim rastvorom etanola (55%) (Kaushik et al., 2014) ili heksanom sa 12,5 mg/l BHT (Huang et al., 2009). Uzorak se ispira destilovanom vodom da bi se oslobodio od baznih supstanci (uz fenolftalein). Zasićeni rastvor NaCl se koristi da bi se sprečilo stvaranje emulzije, a Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> da bi se apsorbivali ostaci vode. Rastvor se uparava do suva u prisustvu azota. Ponovno rastvaranje, pre dalje analize, vrši se sa 1 ml smeše 70% acetonitril-H<sub>2</sub>O (70+30) (Huang et al., 2009) ili metanolom (Kaushik et al., 2014). Prečišćavanje se može izvoditi preparativnom HPLC, primenom silika, amino i cijano kolone, uz odgovarajuće rastvarače.

### Ekstrakcija iz jaja

Kako su proizvodi saponifikacije žumanaca veoma hidrofobni, primenjuje se smeša rastvarača dietiletra:petroletra u odnosu 75:25, u 150 ml, uz još tri ekstrakcije sa po 75 ml smeše etra:petroletra (50:50). Ovaj kombinovani rastvor se ispira dejonizovanom vodom, pet puta po 50 ml. Kada se rastvarači uklone, lipidni ostatak se rastvara u 400 µl 2% izo-propanola u heptanu, za semi-preparativno razdvajanje. Izolovane frakcije vitamina D su konačno rastvorene za analizu acetonitriplom i metanolom (Liu et al., 2014).

### Ekstrakcija iz margarina

Saponifikovani rastvor margarina rastvara se u 120 ml dietiletra, i uz intenzivno mešanje dolazi do razdvajanja faza. Vodena faza se ponovo ekstrahuje sa 120 ml dietiletra. Spojeni ekstrakti organske faze ispiraju se do neutralne reakcije (uz fenolftalein) sa: 100 ml 10% rastvora NaCl, 100 ml vode, 100 ml 10% etanolnog rastvora i 100 ml vode.

Posle dodatka 20 mg BHT, dietiletarski ekstrakt se uparava u prisustvu azota, skoro do suva. Rastvara se u 10 ml smeše heksana:etanola (1:1), i ponovo uparava do suva u prisustvu azota. Konačno, ovakav uzorak rastvoren u 2 ml metanola podvrgava se SPE uz primenu mobilne

faze metanol-voda (90:10) na silika koloni (Brubacher et al., 1985; Mattila, Piironen, Uusi-Rauva, & Koivistoinen, 1996).

#### Ekstrakcija iz pečuraka

Vitamin D<sub>2</sub> se iz sprášenih pečuraka ekstrahuje sa 15 ml dejonizovane vode, a potom sa 15 ml etanola, i ispira tri puta sa 50 ml n-pentana. Organski sloj se odvaja, i ispira tri puta sa 50 ml 3% KOH u 5% etanolu, i konačno dejonizovanom vodom do neutralne reakcije. Ekstrakt se uparava, a dobijeni ostatak rastvara u metanolu. (Koyyalamudi et al., 2011).

#### Ekstrakcija iz cerealija obogaćenih vitaminima

Cerealije su u mnogim zemljama obogaćene vitaminom D (D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>). Huang i saradnici (Huang et al., 2009) razvili su HPLC/MS/MS metodu za određivanje vitamina D u različitim tipovima namirnica, uključujući i cerealije. U njihovom radu korišćen je izotop D<sub>3</sub> vitamina kao interni standard koji omogućava efikasnije merenje uticaja matriksa hrane na sadržaj vitamina D u uzorku.

U ovom radu se uzorak nakon saponifikacije ekstrahuje sa 30 ml heksana koji sadži 12,5 mg/l BHT. Nakon uparavanja uzorka, on se rastvara smešom acetonitrila i vode (70:30). Ova metoda primenjena je i u analizi formulacije za odojčad, hrane za životinje, nekih sireva i suplemenata, ali se njena efikasnost pokazala najboljom u određivanju sadržaja vitamina D u cerealijama (Huang et al., 2009).

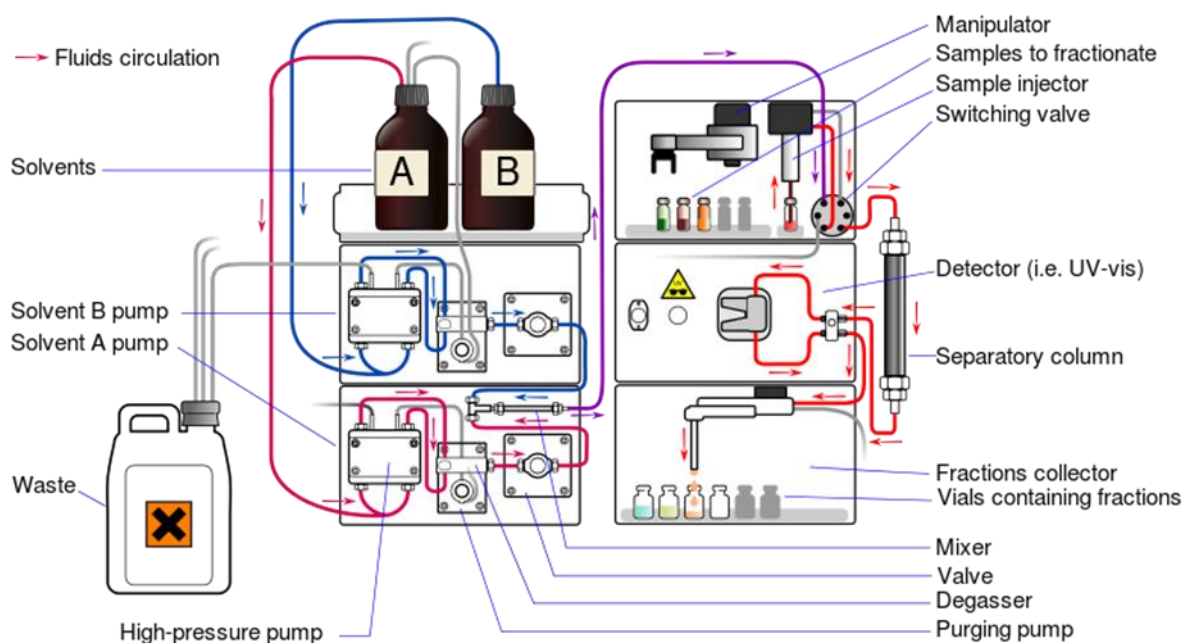
Iako postoje ustanovljene standardne metode analize, kao što su BS EN 12821 i AOAC 995.05 (AOAC Official Method 995.05., 1997; CEN, 2009) analitičari pribegavaju njihovim modifikacijama u skladu sa specifičnostima svake pojedinačne vrste namirnica.

Upravo zbog raznovrsnih mogućnosti i korekcija metoda, određivanje vitamina D još uvek je izazov za analitičare, s obzirom na potrebu za brzim i tačnim određivanjem vitamina D u sve većem broju (bio)obogaćenih proizvoda.



### Semi-preparativna HPLC

Semi-preparativna HPLC se koristi za drugo, finalno prečišćavanje ekstrakta vitamina D, odnosno izolovanje frakcija vitamina D i 25(OH)D kako bi se mogle kvantifikovati u analitičkoj fazi. Sistem za semi-preparativnu HPLC se sastoji iz pumpe, uređaja za injektovanje uzorka, kolone, UV detektora ili detektora sa nizom dioda (DAD), recipijenta za prikupljanje porcija alikvota eluenata iz kolone, sistema za prikupljanje i obradu podataka (Slika 3.).



**Slika 3.** Šema semi-preparativne HPLC sa UV detektorom (Mrabet, 2018)

Razdvajanje u semi-preparativnoj HPLC se izvodi na normalnim fazama. Koriste se kolone sa polarnim stacionarnim fazama (silika ili amino), sa česticama veličine 5  $\mu\text{m}$ , dijametra 4,0-8,0 mm (4,6 mm u USDA), dužine 250-300 mm. Kao mobilna faza najčešće se koriste sledeće smeše rastvarača:

- n-heksan i 2-propanol (98:2), (99:1) ili (95:5);
- n-heksan i izo-amil alkohol (99:1);
- n-heksan, 2-propanol i tetrahidrofuran (98:1:1);
- izo-oktan i izo-butanol (99:1);
- n-heptan i 2-propanol (97:3).

Kao detektor se koristi DAD, pri čemu se uobičajeno detektuje signal na talasnoj dužini 265 nm za vitamin D. Standardnim metodama definisan je sistem, tj. kolona, mobilna faza, i detektor (CEN, 2009). Frakcije vitamina D se prikupljaju prve nakon čega se prikupljaju frakcije 25(OH)D, obe u prethodno određenim vremenskim intervalima.

Jakobsen i saradnici (2004) izolovali su frakcije vitamina D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub>, promenama koncentracija mobilnih faza u određenim vremenskim intervalima, potrebnim za eluiranje pojedinačnih frakcija ovih vitamina (Jakobsen et al., 2004).

## Analitička HPLC

Analitička HPLC se koristi za kvantifikovanje pojedinačnih frakcija D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>2</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub>. Osnovni delovi analitičkog HPLC sistema su: pumpa, uređaja za injektovanje uzorka, kolona, detektor (UV, DAD, MS) i sistem za prikupljanje i obradu podataka. Za razliku od semi-preparativne, u analitičkoj HPLC se razdvajanje vitamina izvodi na obrnutim fazama, odnosno primenjuju se kolone sa nepolarnim stacionarnim fazama, dok je mobilna faza polarna. Najčešće se koriste kolone sa C18 – reversnom fazom, veličine čestica 5 µm, dijametra 4,0-4,6 mm, dužine 250 mm. Kao mobilna faza najčešće se primenjuje metanol ili sledeće smeše rastvarača:

- metanol i voda (95:5) ili (93:7);
- acetonitril i metanol (80:20), (90:10) ili (70:30);
- acetonitril, hloroform i metanol (93:4:3).

Standardnim metodama definisan je sistem, tj. kolona, mobilna faza i detektor (CEN, 2009).

Kvantitativno određivanje izvodi se metodom unutrašnjeg standarda, pre svega zbog složene pripreme uzorka. Kao IS koristi se D<sub>2</sub> za određivanje D<sub>3</sub> i obrnuto, što isto važi i za 25(OH)D<sub>2</sub>/25(OH)D<sub>3</sub>, pod uslovom da IS nije prisutan u uzorku (Phillips et al., 2008).

Kvantifikacija se bazira na izračunavanju faktora odgovora RF (responce factor) vitamina D u odnosu na unutrašnji standard. Tako se RF pri određivanju vitamina D<sub>3</sub> uz primenu D<sub>2</sub> kao IS računa na sledeći način:

$$RF = \frac{ASTD_3 * \rho_{STD_2}}{(ASTD_2 * \rho_{STD_3})}, \quad (17)$$

gde su:

ASTD<sub>3</sub>- površina ili visina pika za standardni rastvor vitamina D<sub>3</sub>

ASTD<sub>2</sub>- površina ili visina pika za standardni rastvor vitamina D<sub>2</sub>

ρ<sub>STD<sub>2</sub></sub>- masena koncentracija vitamina D<sub>2</sub> u standardnom rastvoru, u µg/ml

ρ<sub>STD<sub>3</sub></sub>- masena koncentracija vitamina D<sub>3</sub> u standardnom rastvoru, u µg/ml

Sadržaja vitamina D<sub>3</sub> u µg/100 g, **WD<sub>3</sub>** računa se na osnovu izraza:

$$WD_3 = ASTD_3 * IS * 100 / ASTD_2 * RF * m, \quad (18)$$

gde je:

**IS** – masa internog standarda, vitamin D<sub>2</sub>, u µg,

**m** - masa uzorka uzetog za analizu, u g

**RF** - faktor odgovora

**ASTD<sub>3</sub>** - površina ili visina pika za vitamin D<sub>3</sub> u rastvoru uzorka

**ASTD<sub>2</sub>** - površina ili visina pika za vitamin D<sub>2</sub> u rastvoru uzorka (CEN, 2009).

### 3. MATERIJALI I METODE

U ovom poglavlju doktorske disertacije opisane su metode koje su korišćene za razvijanje instrumenata potrebnih za sprovođenje istraživanja, kao i metode korišćene za merenje nutritivnih indikatora od interesa. One prate hronološki sled razvoja teme doktorske disertacije.

#### Izrada protokola za pretraživanje podataka o sadržaju vitamina D u evropskim bazama podataka, pretraživanje FoodExplorer™

Da bi se kreirala evropska baza najkvalitetnijih podataka o sadržaju vitamina D u okviru ODIN projekta (Kiely, Cashman, & Consortium, 2015) korišćen je EuroFIR FoodExplorer™ (EuroFIR ASIBL, 2011) kao primarni izvor podataka. Pored toga, korišćeni su i drugi izvori: analitički podaci iz literature, podaci proizvođača i nacionalne baze podataka izvan FoodExplorer™-a, uključujući australijsku i kanadsku bazu. Razvijen je protokol za korišćenje ovog inovativnog online pretraživača, koji omogućava pretragu i sveobuhvatnu ekstrakciju podataka o sadržaju vitamina D iz 30 standardizovanih nacionalnih baza o sastavu namirnica. Sprovedena su preliminarna pretraživanja da bi se identifikovali nacionalni setovi podataka od interesa, kao i dostupne forme vitamina D i prateće dokumentacije. USDA set podataka tretiran je zasebno jer njegova forma i dokumentacija nisu u potpunoj saglasnosti sa EuroFIR standardima, a i vitamer 25(OH)D nije bio dostupan u USDA SR26 verziji koja je bila aktuelna u momentu istraživanja (2014. god.).

### *Identifikacija nacionalnih baza podataka sa potencijalno visoko kvalitetnim podacima*

U preliminarnom pretraživanju dostupnih podataka identifikovano je nekoliko setova podataka koji bi mogli da zadovolje kriterijume za visokokvalitetne analitičke podatke o sadržaju vitamina D u namirnicama. Tražene su valjano dokumentovane analitičke vrednosti za sledeće forme vitamina D: ukupni vitamin D, vitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub> i 25(OH)D. FoodEXplorer™ je korišćen za prikupljanje podataka o sadržaju vitamina D jer omogućava simultano pretraživanje dostupnih baza na toj platformi. Korisnicima je dostupan širok izbor podataka o namirnicama iz evropskih nacionalnih baza koji su harmonizovano opisani i povezani s nutritivnim informacijama. U početku su tražene isključivo analitičke vrednosti za vitamin D i identifikovani su nacionalni setovi podataka koji ih sadrže. Identifikovano je šest nacionalnih setova - iz UK, Finske, Francuske, Holandije, Švedske i SAD. Norveška je imala značajnu količinu analitičkih podataka poreklom od proizvođača, pa su i oni bili uključeni kao potencijalni izvor informacija, da bi se popunili nedostajući podaci za neke važne izvore vitamina D, kao što su npr. masne ribe, obogaćeni masni namazi, itd. Nova turska baza podataka, publikovana u vreme istraživanja, takođe je pretražena. Konačno, laboratorija dr Jette Jakobsen na Danskom Tehničkom Univerzitetu, koja je bila analitički centar na ODIN projektu, obezbedila je podatke o sadržaju vitamina D u pojedinim namirnicama koje su bile analizirane. Dodatno su razmotreni setovi podataka iz Australije i Kanade, korišćeni za poređenje i eventualno popunjavanje nedostajućih podataka.

### *Razvoj protokola pretraživanja*

Da bi se podaci temeljno pretražili na FoodEXplorer™-u, bilo je potrebno razviti kriterijume za specifičnu i potpunu ekstrakciju najkvalitetnijih podataka. U tu svrhu je razvijen algoritam pretraživanja koji se primenjivao na svakoj grupi namirnica u svakoj zemlji. Algoritam je prikazan u tabeli 9. a parametri kojima se definiše pretraga u tabeli 10. Razmatrane su samo grupe namirnica za koje je prethodno ustanovljeno da mogu sadržati vitamin D.

**Tabela 9.** Algoritam pretraživanja za različite individualne forme vitamina D, kombinacije dva ili tri od njih, sa dva tipa metoda i dva indikatora metoda u FoodExplorer™-u

Forma vitamina D	Analitički rezultati	Analitički, opšti	Analitički metod	HPLC
Vitamin D ukupni	x	x	x	x
D <sub>3</sub> - CHOLE	x*	x	x	x
25-OH D <sub>3</sub>	x	x	x*	x*
Vitamin D+CHOLE+25-OHD <sub>3</sub>	x*	x*	x*	x*
Vitamin D+ CHOLE	x*	x	x**	x*
Vitamin D+ 25OHD <sub>3</sub>	x	x*	x*	x*
CHOLE+25OHD <sub>3</sub>	x*	x	x*	x*

CHOLE= Vitamin D<sub>3</sub>, x- podaci pretraženi i nađeni, x\* - podaci pretraženi – bez rezultata, x\*\* - isti kao analitički opšti

**Tabela 10.** Kriterijumi pretrage za vitamin D u FoodExplorer™-u

<b>Vitamin D vrednosti - izvor podataka</b>	- Analitički rezultati; Analitički, opšti; Analitički metod; HPLC
<b>Vitamin D forme</b>	- Vitamin D – ukupni - CHOLE (D <sub>3</sub> ) - 25OHD <sub>3</sub>
<b>Nacionalni setovi podataka</b>	- SAD - UK - Danska - Francuska - Holandija - Švedska - Norveška - Finska - Turska
<b>Grupe namirnica</b>	- RIBA I PROIZVODI OD RIBE - MESO I PROIZVODI OD MESA - MLEČNI PROIZVODI ○ NEOBOGAĆENI ○ OBOGAĆENI - NEMLEČNI NAPICI ○ OBOGAĆENI - MASTI I MASNI NAMAZI ○ PUTER ○ OBOGAĆENA ULJA I MARGARINI - JAJA ○ NEOBOGAĆENA ○ OBOGAĆENA - PEČURKE ○ OBOGAĆENE - PEKARSKI KVASAC ○ OBOGAĆENI - OBOGAĆENI SOKOVI - OBOGAĆENI PROIZVODI NA BAZI ŽITA - ZAMENE ZA OBROKE (FORMULISANI TEČNI OBROCI )

Pre nego što se pristupilo ekstrakciji podatka iz FoodEXplorer™-a, bilo je potrebno uraditi ažuriranje postojećih baza podataka najnovijim dostupnim podacima koji nisu prethodno bili uneti u nacionalne setove podataka. FoodEXplorer je ažuriran podacima iz USDA baze - najnovijom SR26 verzijom, uključeni su najnoviji podaci iz holandske i baze UK, dok je turska baza, kao najnovija, uključena odvojeno u finalnu bazu vitamina D. Podaci iz literature iz DTU takođe su naknadno uneti u finalnu bazu vitamina D.

U tabeli 11. prikazani su svi korišćeni izvori podatka iz nacionalnih setova.

**Tabela 11.** Nacionalne baze podataka o sastavu namirnica korišćene za ekstrakciju podataka o sadržaju vitamina D kroz FoodEXplorer™

Nacionalni set podataka	Poslednja verzija	Poslednje ažuriranje
Fineli®, Finska BPSN	Fineli, objavljena 10, 2009	20/03/2010
AFSSA/CIQUAL Francuska BPSN	FR AFSSA FCDB, verzija iz 2008	02/05/2011
NEVO-Holandska BPSN	NEVO, v. 2013/4.0	15/05/2014
Norveška BPSN	NO MVT FCDB 2006	13/08/2009
Švedska BPSN	SE FCDB 2013	10/01/2013
TürKomp, Turska BPSN	TürKomp, verzija 1.0, 2014	09/04/2014
USDA Nacionalna baza podataka o nutrijentima, standardna reference	USDA SR26	29/10/2013
McCance & Widdowson's BPSN (CoF IDS)	UK CoF IDS 2008	10/2014

*Analitički rezultati* i *analitički, opšti* predstavljaju deskriptore za opštiji tip metode u FoodEXplorer™-u, dok *analitički metod* i *HPLC* predstavljaju deskriptore za specifičniji indikator metode. Ustanovljeno je da su kompilatorske organizacije koristile sve četiri forme, neuniformno, da bi definisale tip izvora podatka o vitaminu D. Postavljanje tih kriterijuma u funkciju pretraživanja FoodEXplorer™-a rađeno je po sledećim instrukcijama:

1. Odabrati željene zemlje od interesa, i zapamtiti ih kao kriterijum pretraživanja.
2. U NAPREDNOJ PRETRAZI, pod FOOD COMPONENTS izabrati jednu ili više opcija kao u tabeli 9. sledećom putanjom: Vitamins > Fat soluble vitamins > bilo koja od Vitamin D komponenti (VIT D, cholecalciferol, ili 25-hydroxycholecalciferol).



3. U FOOD ATTRIBUTES odabrati grupu namirnica od interesa kao što je prikazano na slici
4. Za svaku odabranu komponentu definisati željeni analitički metod i uraditi pretraživanje za svaki.

- *Kao tip metode odabrati:*

- a. Analitičke rezultate (slika 5.)
- b. Analitičke, opšte (slika 6.)

- *Kao metod indikator odabrati:*

- c. Analitički metod kao izvor podataka (slika 7.)
- d. High performance liquid chromatography (slika 8.)

5. Rezultat napredne pretrage su namirnice koje zadovoljavaju sve zadate kriterijume pretraživanja. Dobijeni rezultati su sve namirnice koje imaju bar jednu ili više odabranih komponenti do kojih se došlo definisanim analitičkim metodama.

The screenshot displays the EuroFIR Food Explorer interface. At the top, the EuroFIR logo is on the left, and a search bar is on the right. Below the logo is a navigation menu with 'Home', 'About us', 'Why join', 'Food Information', and 'Food Explorer' (highlighted). The user is logged in as 'test user'.

The main search area shows the query 'chicken' in a search box. Below it are radio buttons for 'All words', 'Exact string', and checked checkboxes for 'English name', 'Original name', and 'Scientific name'. There are also links for 'Simple search', 'Select countries (27)', and 'MY CART (0)'. Below the search box are tabs for 'FOOD ATTRIBUTES' and 'FOOD COMPONENTS', along with 'Remove search criteria', 'Save search', and 'Load search' buttons.

The 'FOOD GROUPS (2)' section shows two selected groups: 'FRESH OR PROCESSED EGG (A0791)' and 'POULTRY (A0795)'. Each group has 'Broad Term' and 'Narrow Term' radio buttons, with 'Broad Term' selected. A 'Remove' button is next to each. Below this is a tree view of food groups, with 'FRESH OR PROCESSED EGG (A0791)' and 'POULTRY (A0795)' expanded.

The 'COOKING METHOD (1)' section shows one selected method: 'COOKED BY DRY HEAT (G0004)'. It also has 'Broad Term' and 'Narrow Term' radio buttons, with 'Broad Term' selected, and a 'Remove' button.

Other sections include 'FOOD SOURCE', 'TREATMENT APPLIED', and 'PRESERVATION METHOD', each with a search icon.

Slika 4. Selekcija grupe namirnica u naprednoj pretrazi FoodExplorerTM-a

The screenshot shows the EuroFIR Food Explorer interface. The user is logged in as 'jelena.milesevic'. The search criteria are set to 'All words', 'English name', 'Original name', and 'Scientific name'. The search results are filtered by 'FOOD COMPONENTS'. The selected component is 'Vitamin D components [GRP\_VITD] [8]'. The search criteria are 'more than', 'and', 'less than', and 'Unit'. The search criteria are 'Vitamin D components [GRP\_VITD] [8]' and 'cholecalciferol [CHOCAL] [3280]'. The search criteria are 'more than', 'and', 'less than', and 'Unit'. The search criteria are 'Analytical result(s) [A]'.

Slika 5. Selekcija kriterijuma za pretraživanje komponente pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za vitamin D<sub>3</sub>, koji su dobijeni kao analitički rezultat

The screenshot shows the EuroFIR Food Explorer interface. The user is logged in as 'jelena.milesevic'. The search criteria are set to 'All words', 'English name', 'Original name', and 'Scientific name'. The search results are filtered by 'FOOD COMPONENTS'. The selected component is 'Vitamin D components [GRP\_VITD] [8]'. The search criteria are 'more than', 'and', 'less than', and 'Unit'. The search criteria are 'Vitamin D components [GRP\_VITD] [8]' and 'vitamin D [VITD] [61066]'. The search criteria are 'more than', 'and', 'less than', and 'Unit'. The search criteria are 'Analytical methods [MIR001]' and 'Metod'. The search criteria are 'Analytical methods [MIR001]' and 'Metod'.

Slika 6. Selekcija kriterijuma za pretraživanje komponente pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za vitamin D<sub>3</sub>, koji su dobijeni kao analitički rezultat -opšti

The screenshot shows the EuroFIR Food Explorer interface. The user is logged in as 'jelena.milesevic'. The navigation path is 'Food Explorer > Food groups > Datasets > Advanced search > Advanced search components'. The search criteria are set to 'All words', 'English name', 'Original name', and 'Scientific name'. The selected component is 'Vitamin D components [GRP\_VITD] [8]'. The search criteria are 'more than', 'and', 'less than', and 'Unit'. The 'Select method type' dropdown menu is open, showing options: 'Aggregated from contributing food items [G]', 'Aggregation of contributing analytical results [D]', 'Analytical results [A]', 'Analytical, generic (AG)', 'Calculated as recipe [R]', 'Calculated from related food [K]', 'Calculated on component profile [P]', 'calculated, generic [CG]', 'Calculations including conversion factors [T]', 'Estimated according to logical deduction [U]', and 'Estimated according to regulatory requirements [L]'. The 'Analytical, generic (AG)' option is highlighted with a red box.

**Slika 7.** Selekcija kriterijuma za pretraživanje pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za ukupni vitamin D, koji su dobijeni kao analitički metod- nedefinisan

The screenshot shows the EuroFIR Food Explorer interface. The user is logged in as 'jelena.milesevic'. The navigation path is 'Food Explorer > Food groups > Datasets > Advanced search > Advanced search components'. The search criteria are set to 'All words', 'English name', 'Original name', and 'Scientific name'. The selected component is 'vitamin D [VITD] [61066]'. The search criteria are 'more than', 'and', 'less than', and 'Unit'. The 'Select method type' dropdown menu is open, showing options: 'High-performance liquid chromatography [M1137]'. The 'High-performance liquid chromatography [M1137]' option is highlighted with a red box. Below the dropdown, there is an 'indicator' section with options: 'Select reference type', 'Select publication date', and 'Year of publication'.

**Slika 8.** Selekcija kriterijuma za pretraživanje komponente pod FOOD COMPONENTS, u naprednoj pretrazi FoodExplorer™-a, konkretno za ukupni vitamin D, koji su dobijeni upotrebom HPLC-a

## Ekstrakcija podataka korišćenjem FoodEXplorer™ pretraživača

FoodEXplorer™ ima definisani format eksport fajla - MS Office Excel format, koji sadrži nekoliko deskriptora podataka o hrani. Odlučeno je da se ovaj format zadrži u neizmenjenom stanju kako bi se olakšalo spajanje različitih eksport fajlova, odnosno, kasnija lakša obrada, sortiranje i filtriranje podataka. Na kraju ekstrakcije i sortiranja svih podataka, konačna tabela bila je proširena sa još dve kolone za LanguaL i FoodEX2 kodove. Ekstrahovani podaci organizovani su u tri odvojena radna lista, po jedan za svaki vitamer (vitamin D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub>) i ukupni vitamin D. Sve vrednosti svih formi vitamina D izražene su u µg/100 g. Odabrane vrednosti su grupisane na osnovu kvaliteta primenjenih analitičkih metoda i prateće dokumentacije.

### Kodiranje

Dva sistema za klasifikaciju ekstrahovanih podataka korišćena su u ovoj bazi: LanguaL™ i EFSA FoodEX2.

*LanguaL™* je višejezični sistemski tezaurus koji koristi različite klasifikacije karakteristika hrane. Svaka namirnica može se opisati setom standardnih, kontrolisanih termina, izabranih u okviru jedne grupe karakteristika-faseta o nutritivnom i/ili higijenskom kvalitetu namirnice, na primer, biološko poreklo, metode kuvanja i konzerviranja ili tehnološki tretmani (Moller & Ireland, 2014). Za opisivanje svih namirnica u bazi korišćene su četiri osnovne fasete:

A. PRODUCT TYPE [A0361]

B. FOOD SOURCE [B1564]

C. PART OF PLANT OR ANIMAL [C0116]

E. PHYSICAL STATE, SHAPE OR FORM [E0113]

EFSA FoodEX2 sistem je standardizovani sistem za klasifikaciju i opisivanje namirnica koji se primarno koristi u procenama izloženosti ljudi i životinja kontaminantima. Ovaj sistem sastoji se od deskriptora velikog broja individualnih namirnica agregiranih u grupe namirnica i šire

kategorije namirnica, u hijerarhijskom roditelj-dete odnosu. Da bi se namirnice u bazi kodirale, korišćen je FoodEX2 browsing tool -instrument za pretraživanje (EFSA, 2014).

## Ažuriranje srpske baze podataka o sadržaju vitamina D

Da bi se pristupilo određivanju prosečnog unosa vitamina D u srpskoj populaciji, kao i daljoj izradi modela, srpska BPSN morala je biti ažurirana ovim podacima. Sve namirnice koje su u toku studija o ishrani identifikovane kao konzumirane, a bile su izvor vitamina D, podvrgnute su procesu ažuriranja. Korišćeni su podaci iz specijalizovane baze o sadržaju vitamina D (Milešević et al., 2018) istih ili najsličnijih namirnica, dok su nedostajući podaci nadomešteni podacima iz literature i sa deklaracija prehrambenih proizvoda sa srpskog tržišta.

## Određivanje sadržaja vitamina D u uzorcima jaja sa tržišta Srbije

U cilju utvrđivanja sadržaja vitamina D u jajima iz Srbije sprovedeno je uzorkovanje konzumnih jaja iz najvećeg trgovinskog lanca u Srbiji (Delhaize Maxi Srbija) i iz malih domaćinstava sa slobodnim uzgojem koka nosilja. Uzorci jaja, odnosno žumanaca jaja iz malih domaćinstava i jaja iz intenzivne proizvodnje, bili su predmet komparativne analize sadržaja vitamina D. Jaja su prethodno pripremljena tako što su žumanca bila odvojena i homogenizovana, po 10 komada u svakom uzorku: 10 komada jaja iz intenzivne proizvodnje (S klasa, Mikros Union), i dva puta po 10 komada jaja iz malih domaćinstava. Nakon merenja i ceđenja, žumanca su homogenizovana i zamrznuta na  $-20^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. Analiza vitamina D u žumancima urađena je u laboratoriji za analizu vitamina D na DTU u Soborgu, u Danskoj. Kako je vitamin D osetljiv na UV zračenje i oksidirajuće reagense, analize su izvedene u laboratoriji sa UV apsorbujućim filterima na prozorima, specijalno pokrivenim lampama, dok je azot uvek korišćen za zatvaranje posuda pre saponifikacije i uparavanja.

Priprema žumanaca za analizu obuhvatala je sledeće korake: homogenizaciju, saponifikaciju, ekstrakciju, prečišćavanje SPE i preparativnom HPLC. Određivanje sadržaja vitamina D izvedeno je pomoću sistema za analitičku HPLC. Paralelno sa uzorkom rađena je i analiza internog referentnog materijala u cilju provere tačnosti metode. Interni referentni materijal dobijen je od pasterizovanih danskih jaja - testirano žumance koje se koristi za potrebe laboratorije, i čiji sadržaj vitamina D je poznat i više puta proveren.

1. Homogenizacija uzoraka je izvedena mešanjem i to pre zamrzavanja i nakon odmrzavanja.
2. Saponifikacija: U tikvicu sa ravnim dnom odmereno je oko 10 g uzorka i dodati su rastvori unutrašnjih standarda i to: 100  $\mu$ l rastvora  $D_2$  (2,5  $\mu$ g/ml u n-heptanu) i 5  $\mu$ l rastvora  $25(OH)D_2$  (41,0149  $\mu$ g/ml u etanolu). Potom je dodato 500 mg natrijum askorbata, 90 ml 96% etanola i 30 ml 60% kalijum hidroksida. Tikvica je zatvorena u struji azota, postavljena na magnetnu mešalicu i saponifikacija je izvođena na sobnoj temperatura tokom noći (slika 9.).



Slika 9. Saponifikovani uzorci

3. U cilju ekstrakcije vitamina D izvedena je višestruka tečno-tečna ekstrakcija smešom rastvarača petroletar:dietiletar (50:50). U cilju sprovođenja višestruke ekstrakcije korišćen je sistem za ekstrakciju koji se sastojao od 3 levka za odvajanje koji su postavljeni jedan ispod

drugog (slika 10). Saponifikovani uzorak je kvantitativno prenet u levak za razdvajanje ispiranjem sa 250 ml vode i dodato je 150 ml rastvarača za ekstrakciju. Levak je postavljen u mućalicu (Recipro Shaker –S1, Medline) na intenzivno mućkanje u trajanju od 1 min na 250 puls/min. Nakon mućkanja i razdvajanja slojeva, neorganska faza (donji sloj) je odvojena i podvrgnuta naknadnoj ekstrakciji koja je izvođena uz primenu 75 ml rastvarača za ekstrakciju. Postupak naknadne ekstrakcije je izveden još jednom na isti način. Organske faze su spojene i ispirane destilovanom vodom do neutralne sredine. Dobijeni ekstrakt je uparavan na vodenom kupatilu na temperaturi od 100°C do zapremine od 5 ml, a potom u struji azota do suva. U slučaju kada nije postignuto uparavanje do suva na ovaj način, u ekstrakt je dodat etanol te je uparavanje do suva izvedeno rotacionim vakuum uparivačem na temperaturi od 35°C. Suv ekstrakt je rastvoren u 5 ml 1% rastvora izopropanola u 99% heptanu.



**Slika 10.** Sistem za ekstrakciju



#### 4. Prečišćavanje

Prvo prečišćavanje ekstrakta izvedeno je postupkom ekstrakcije na čvrstoj fazi primenom Isolute kolone (ISOLUTE®SI, Biotage, UK, 2 g, 15 ml) (slika 11.). Kolone su inicijalno aktivirane sa 20 ml n-heptana. Nakon nanošenja ekstrakta kolona je isprana sa 20 ml 0,5% izopropanola u heptanu. Vitamin D i 25(OH)D su eluirani sa 30 ml 6% izopropanola u n-heptanu i 20 ml 10% izopropanola u heptanu. Nakon eluiranja, uzorci su upareni do suva u vakuum centrifugi (Maxi Dry, Heto, Allerod, Danska), a ostatak je rastvoren u 1 ml 2% izopropanola u n-heptanu.



**Slika 11.** Propuštanje i ispiranje uzorka na SPE kolonici

Drugo prečišćavanje ekstrakta izvedeno je injektovanjem 150  $\mu$ l uzorka u preparativni HPLC sistem (Waters, Milford, MA, USA) koji je bio opremljen sa dve kolone - silica (Luna, Si 60, 5 mm, 250 x 4,6 mm ID) i amino (Sphereclone, Amino, 5 mm, 150 x 4,6 mm ID) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD), 600 kontrolorom -717PLUS, automatskim sistemom za unošenje uzoraka sa hlađenjem i 2487 apsorpcionim detektorom. Korišćena je mobilna faza koja se sastojala od rastvarača A (n-heptan) i B (10% izopropanol u n-heptanu) sa protokom 1 ml/min i gradijentnim uslovima elucije. Operativni parametri preparativne HPLC dati su u tabeli 12. Frakcije vitamina D i 25(OH)D prikupljane su odvojeno, te su uparene u struji azota i rastvorene u 250  $\mu$ l rastvarača. Smeša metanol:acetonitril (20:80) je korišćena kao rastvarač za vitamin D, dok je smeša metanol:voda (90:10) primenjena za 25(OH)D.

#### 5. Analitička HPLC

Određivanja sadržaja vitamina D i 25(OH)D izvedeno je injektovanjem 100  $\mu$ l uzorka u analitički HPLC sistem (Waters, Milford, MA, USA) koji je bio opremljen sa kolonom VYDAC 201TP54 (5 mm, 250 x 4,6 mm ID, The Separations Group, Inc., Hesperia, CA, USA) za vitamin D, odnosno kolonom LUNA C18(2) (5 mm, 150 x 4,6 mm ID, and 5 mm, 250 x 4,6 mm ID,

Phenomenex, Torrance, CA, SAD) za 25(OH)D. Pored toga, analitički HPLC sistem je sadržao sledeće komponente: 515 HPLC pumpa, 717PLUS automatski sistem za unošenje uzoraka, 996 detektor sa nizom fotodioda i 2487 apsorpcioni detektor. Analize su izvedene pri izokratskim uslovima elucije sa protokom mobilne faze 1 ml/min. Korišćene su mobilne faze metanol:acetonitril (20:80) za vitamin D, i metanol:voda (90:10) za 25(OH)D. Detekcija je izvedena na osnovu DAD spektra 220-320 nm, a kvantifikacije na 265 nm. Operativni parametri analitičke HPLC dati su u tabeli 12.

Kvantitativno određivanje izvedeno je metodom unutrašnjeg standarda. Kao IS pri određivanju vitamina D<sub>3</sub> korišćen je D<sub>2</sub>, dok je pri određivanju 25(OH)D<sub>3</sub> korišćen 25(OH)D<sub>2</sub>. Izračunavanje sadržaja vitamera izvedeno je na osnovu površina pikova primenom izraza 17 i 18.

**Tabela 12.** Operativni parametri preparativne i analitičke HPLC

Parametri	Preparativna HPLC	Analitička HPLC	
		Vitamin D	25(OH)D
Kolona	Silica (LUNA)+amino (Sperecone)	C18 (VYDAC)	C18 (LUNA)
Eluent	A: n-heptan	Metanol:acetonitril	Metanol:voda
	B: 10% izopropanol u n-heptanu	(20:80)	(90:10)
Gradijent	80% A+20% B (0 min) 40% A+60% B (10-20 min) 80% A+20% B (20-35 min)	-	-
Protok (ml/min)	1	1	1
Zapremina injektovanja (μl)	150	100	100
Retenciono vreme	Vitamin D: 13,5 min 25(OH)D: 26,5 min	Vitamin D <sub>2</sub> : 19,4 min Vitamin D <sub>3</sub> : 21,7 min	25(OH)D <sub>3</sub> : 17,8 min 25(OH)D <sub>2</sub> : 20,3 min
Prikupljanje (min)	Frakcija 1: 12,5-14,5 Frakcija 2: 25-28	-	
Razblaživanje do (μl)	Frakcija 1: 250 Frakcija 2: 250	- -	- -
Detekcija	UV 256 nm	DAD, 220-320 nm	DAD, 220-320 nm
Kvantifikacija	-	UV, 265 nm	UV, 265 nm

## Izračunavanje prosečnog nutritivnog unosa vitamina D korišćenjem softverske aplikacije DIET ASSESS&PLAN i statističkog programa SPADE za određivanje uobičajenog nutritivnog unosa vitamina D

U ovom istraživanju za izračunavanje prosečnog i uobičajenog unosa vitamina D korišćen je reprezentativni uzorak srpske populacije uključujući adolescente i odrasle, starosti od 10 do 74 godine. Reprezentativni uzorak od 605 ispitanika činili su odrasli muškarci i žene odabrani i anketirani u skladu s metodologijom EU Menu (European Food Safety Authority, 2014). Ova metodologija podrazumeva korišćenje 24HDR upitnika (Prilog 1.), standardnog instrumenta za procenu ishrane pojedinaca ili grupa, u jednom radnom danu i jednom danu vikenda, s minimalnim razmakom od 7 dana, čime se obezbeđuje bolja procena intra-individualne varijabilnosti u ishrani. Ovaj upitnik prikuplja podatke o svim namirnicama i tečnostima koje jedan ispitanik konzumira u prethodnih 24 sata - od momenta kada ustane do sledećeg jutra. Evidentiraju se količine pojedene i popijene hrane, recepture za pripremu jela, kao i podaci o konzumaciji suplemenata, o dodavanju šećera i soli, o okolnostima u kojim je hrana konzumirana, i drugi. Ispitanici su regrutovani iz četiri administrativna regiona Srbije (Vojvodina, Beograd, Šumadija, Zapadna Srbija i Jugoistočna Srbija) u toku cele kalendarske godine.

Sve ankete su pohranjene i obrađene u DAP softveru (Gurinović et al., 2018) koji je omogućio izračunavanje prosečnog unosa vitamina D za celu populaciju i posebno za muškarce i žene. Analiza prosečnog unosa nutrijenata na individualnom nivou za svakog ispitanika korišćena je za izračunavanje uobičajenog dnevnog unosa nutrijenata kako bi se smanjila greška nastala zbog evaluacije samo dva 24HDR. Za tu analizu korišćena je novorazvijena biblioteka u R softveru – SPADE (Statistical Program to Assess Dietary Exposure) (Dekkers, Verkaik-Kloosterman, van Rossum, & Ocké, 2014; Dekkers, Verkaik-Kloosterman, & Ocke, 2017).

Ova analiza ishrane podrazumevala je i identifikaciju najvažnijih izvora vitamina D u aktuelnoj ishrani. Takođe, uz pomoć analize ishrane u DAP-u, identifikovane su i namirnice koje se najčešće konzumiraju (po broju konzumenata i količini) a koje bi mogle biti potencijalni vektori za obogaćivanje vitaminom D.

## Simulacija modela obogaćivanja prehrambenih proizvoda vitaminom D i efekta porasta unosa vitamina D na populacionom nivou

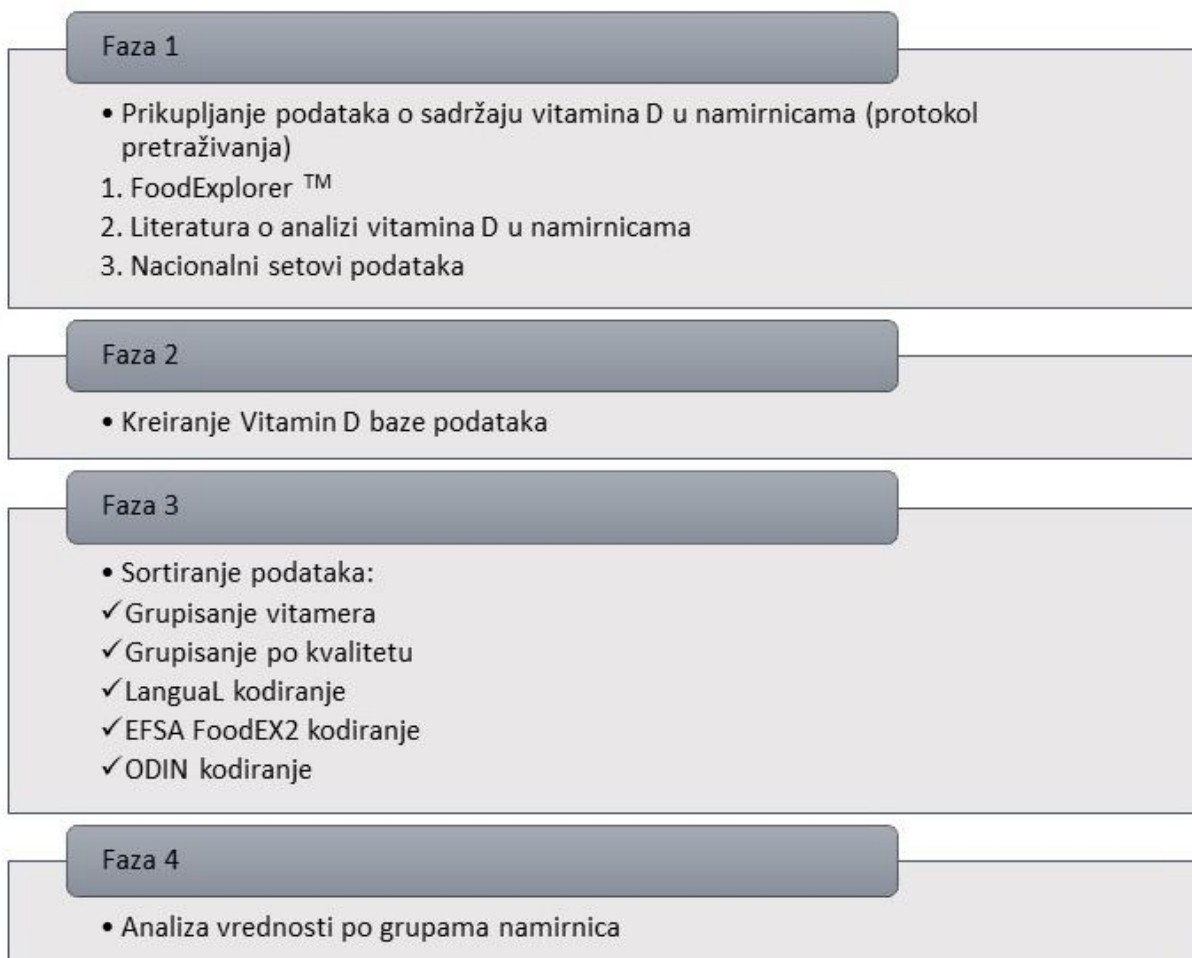
Model obogaćivanja namirnica zahtevao je razvoj matematičke formule kojom bi se izračunao nivo obogaćivanja za svaku pojedinačnu vrstu namirnica predviđenih za obogaćivanje. U ovoj studiji, čiji cilj je određivanje konkretnih količina vitamina D koje se mogu dodati u određenu namirnicu, korišćena je matematička formula koju su razvili Braun i saradnici (Brown et al., 2013). Kako navedena formula (14) podrazumeva obogaćivanje samo jedne namirnice koja bi mogla potencijalno da zadovolji potrebe populacije za vitaminom D, a cilj našeg modela je da se odrede količine vitamina D za različite namirnice koje bi sumarno mogle da doprinesu postizanju preporučenih vrednosti kod šireg opsega konzumenata, formula je dopunjena energetskim udelom koju razmatrana namirnica ima u ukupnom dnevnom energetskom unosu.

Razvijena formula je, uz primenu kombinacija promenljivih faktora- scenarija, dala **fc** vrednosti (količina vitamina D koju treba dodati datoj namirnici - vektoru). Ove vrednosti unesene su u bazu podataka da bi se dobila analiza nutritivnog unosa vitamina D ispitivane populacije. Uobičajeni unos vitamina D za sve scenarije određivan je u programu SPADE (Dekkers et al., 2014).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### Razvoj specijalizovane baze podataka o sadržaju vitamina D u prehrambenim proizvodima u Evropi

Kreiranje specijalizovane baze podataka o sadržaju vitamina D podrazumevalo je, pored prikupljanja podataka, njihovo sortiranje, kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Šematski prikaz celog procesa dat je na slici 12.



**Slika 12.** Šematski prikaz procesa kreiranja specijalizovane baze podataka o sadržaju vitamina D

Podaci su sortirani na osnovu kvaliteta analitičkih podataka i prateće dokumentacije. Tako je izdvojeno pet zasebnih grupa podataka (tabela 13.):

- (1) HPLC metoda dokumentovana referencom;
- (2) Opšti analitički podaci sa referencom;
- (3) HPLC metoda bez reference;
- (4) Opšti analitički podaci bez dokumentovane reference;
- (5) Podaci od proizvođača (gde pouzdanost izvora podataka nije mogla da bude utvrđena, ali se pretpostavlja da su podaci analitički).

Ovakvo grupisanje urađeno je kod svih formi vitamina D.

Ukupno je pronađen 981 podatak o sadržaju vitamina D u evropskim bazama podataka o namirnicama. Najveći broj podataka, 658 (67%) izražen je u formi ukupnog vitamina D. Analiza kvaliteta podataka pokazala je da je HPLC dominantno i najuobičajenije korišćena metoda za određivanje vitamina D i njegovih vitamera (Byrdwell et al., 2008; CEN, 2009). Adekvatna referentna dokumentacija za primenjenu HPLC metodu bila je dostupna za ukupni vitamin D, D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub>. Standardna HPLC metoda za analizu vitamina D opisana je u uvodnom poglavlju - Analiza vitamina D u hrani.

Drugi podaci, dokumentovani kao „analitičke“ metode za analizu vitamina D, sa i bez dokumentovane reference, takođe su razmatrani, jer se pretpostavilo da su ti podaci takođe dobijeni upotrebom standardne HPLC metode za analizu vitamina D. Sumarna distribucija podataka na osnovu kvaliteta prikazana je u tabeli 13. Pored četiri navedena kriterijuma, uključeni su i nordijski podaci dobijeni iz proizvođačkih izveštaja o masnim ribama i obogaćenim namirnicama. Podaci proizvođača iz holandske baze podataka - NEVO 2013 takođe su uključeni, jer je ovaj set sadržao značajan broj obogaćenih formulacija za specijalne vrste ishrane.

Podaci o ukupnom vitaminu D su u najvećoj meri pronađeni u holandskoj (321 namirnica) i švedskoj (135 namirnica) bazi podataka. Podaci o D<sub>3</sub> pronađeni su u UK (87 namirnica) i turskoj (40 namirnica) bazi podataka, dok su podaci o 25(OH)D<sub>3</sub> bili u holandskoj bazi (72 namirnice), UK bazi (62 namirnice) i u danskoj literaturi o analitičkim studijama (30 namirnica) (tabela 14.). Podaci (za sve vitamere) su uglavnom pronađeni za meso, obogaćene namirnice/formulacije (kategorisane kao ostali proizvodi) i za ribu. Podaci o D<sub>3</sub> vitaminu

pronađeni su za ribu, meso i mlečne proizvode (tabela 15.). Industrija hrane sklona je da analizira obogaćene masne namaze i nove funkcionalne formulacije, kao meru unutrašnje kontrole i radi izrade deklaracija i nutritivnih izjava, pa je stoga i količina analitičkih podataka u formi ukupnog vitamina D za ove proizvode veća (tabela 14.). Podaci za mleko i mlečne proizvode su malobrojni i zahtevaju više analitičkih vrednosti i bolju dokumentaciju - i od kompanijskih organizacija i od proizvođača, jer su ovi proizvodi predmet prakse dobrovoljnog obogaćivanja u Evropi (Flynn et al., 2009). Većina podataka za 25(OH)D<sub>3</sub> pronađena je za meso i ribu (130 i 23 od 164, respektivno) (Clausen et al., 2003; Jakobsen et al., 2004; Roe et al., 2013) dok su najaktuelniji podaci za jaja i mlečne proizvode, koji nedostaju u bazi, identifikovani u drugoj literaturi, koju u svom pregledu navode Šmid i Valter (Schmid & Walther, 2013). Nekoliko je razloga za ovakvu situaciju: primarno je 25(OH)D<sub>3</sub> intenzivno proučavan u ovim grupama (meso i riba) uglavnom kao materijal u studijama fokusiranim na razvoj i unapređenje analitičke HPLC metode (Clausen et al., 2003); standardne analitičke procedure za vitamin D ne uključuju analizu ovog vitamina, pa stoga ovi podaci nisu dostupni u starijim bazama podataka o sastavu namirnica (Deharveng, Charrodiere, Slimani, Southgate, & Riboli, 1999).

Podaci iz USDA SR26 analizirani su posebno jer su forme vitamina definisane na drugačiji način: ukupni vitamin D (u IJ), vitamin D<sub>2</sub>+D<sub>3</sub>, vitamin D<sub>3</sub> i vitamin D<sub>2</sub>. USDA SR26 ima ukupno 12000 podataka o vitaminu D. Od toga, 1837 vrednosti su dokumentovane kao analitičke – dobijene u USDA laboratorijama, korišćenjem standardizovane HPLC metode (Byrdwell et al., 2008) i od proizvođača. U ovom setu podataka analitički podaci su uglavnom dokumentovani u formi vitamina D<sub>2</sub>+D<sub>3</sub> (1175) i veliki deo analitičkih dokumentovanih podataka je u formi ukupnog vitamina D (356) dok je vitamin D<sub>3</sub> pronađen za 284 namirnice, a D<sub>2</sub> za 22 namirnice (tabela 16.). Podaci dobijeni od proizvođača, koji namenski analiziraju obogaćene proizvode, uglavnom su bili u formi ukupnog vitamina D. Vitamin D<sub>2</sub> bio je identifikovan u različitim tipovima pečuraka (analitički podaci) i u zamenama za mleko (podaci proizvođača).

**Tabela 13.** Distribucija podataka o sadržaju vitamina D u namirnicama, po formama vitamina i kvalitetu podataka

Vitamin D forma	Kvalitet podataka					UKUPNO	%
	1.	2.	3.	4.	5.		
<b>VITAMIN D, ukupni</b>	236	107	16	91	208	<b>658</b>	<b>67</b>
<b>VITAMIN D<sub>3</sub></b>	121	0	15	23	0	<b>159</b>	<b>16</b>
<b>25(OH)D<sub>3</sub></b>	57	0	90	17	0	<b>164</b>	<b>17</b>
<b>UKUPNO</b>	<b>414</b>	<b>107</b>	<b>121</b>	<b>131</b>	<b>208</b>	<b>981</b>	

- HPLC podaci sa referencom** – podaci o količini vitamina D dobijeni HPLC metodom, koja je dokumentovana informacijama o tipu reference, njenom nazivu, (npr. izveštaj, članak u žurnalu, deklaracija proizvoda, fajl ili baza podatka itd.) i naslov, autor i datum publikovanja reference;
- HPLC podaci bez reference**– podaci o količini vitamina D dobijeni HPLC metodom, koja nema nikakve informacije o tipu i nazivu reference, niti bilo koje druge povezane informacije;
- Analitički podaci sa referencom** - podaci o količini vitamina D dobijeni (najverovatnije HPLC, iako nije uvek prijavljeno) koji su dokumentovani informacijama o tipu reference, njenom nazivu, (npr. izveštaj, članak u žurnalu, deklaracija proizvoda, fajl ili baza podatka itd.) i naslov, autor i datum publikovanja reference;
- Analitički podaci bez reference**- podaci o količini vitamina D dobijeni najverovatnije HPLC, iako nije uvek prijavljeno, koji nemaju nikakve informacije o tipu i nazivu reference, niti bilo koje druge povezane informacije.
- Podaci proizvođača**-prikupljeni i dokumentovani u pregledanim bazama

**Tabela 14.** Distribucija podataka o vitamerima po zemljama

Zemlja	VIT D UKUPNI	VITAMIN D <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>	ukupno/zemlji	% od ukupnog zbira
Ujedinjeno Kraljevstvo	82	87	62	231	24
Danska	0	9	30	39	4
Norveška	15	0	0	15	2
Finska	22	0	0	22	2
Turska	0	63	0	63	6
Švedska	135	0	0	135	14
Francuska	83	0	0	83	8
Holandija	321	0	72	393	40
<b>UKUPNO</b>	<b>658</b>	<b>159</b>	<b>164</b>	<b>981</b>	



**Tabela 15.** Distribucija podataka o vitamerima po grupama namirnica

	VITAMIN D ukupni	VITAMIN D <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>
Biskviti, hleb, kolači, keksi, testenine	22	13	0
Puter i masni namazi	35	4	1
Jaja i proizvodi od jaja	13	10	5
Riba	115	48	23
Meso	170	47	130
Mleko	13	10	3
Mlečni proizvodi	75	26	2
Pečurke	5	0	0
Nemlečni i drugi napici	12	0	0
Ostali proizvodi	186	1	0
Instant cerealije	12	0	0
Ukupno	658	159	164
	981		

**Tabela 16.** Distribucija podataka o sadržaju vitamina D kroz grupe namirnica i vitaminske forme u USDA SR26

Grupa namirnica	VITAMIN D UKUPNI (A)	VITAMIN D UKUPNI (M)	D <sub>2</sub> +D <sub>3</sub> (A)	D <sub>2</sub> +D <sub>3</sub> (M)	D <sub>2</sub> (A)	D <sub>2</sub> (M)	D <sub>3</sub> (A)	D <sub>3</sub> (M)
Meso i proizvodi od mesa	219	12	856	10	0	0	215	0
Riba i proizvodi od ribe	35	0	77	0	0	0	20	0
Mleko, mlečni proizvodi i zamene za mleko i mlečne proizvode	33	11	132	7	0	10	34	0
Masti i ulja	1	0	9	0	0	0	1	0
Jaja i proizvodi od jaja	5	0	15	0	0	0	5	0
Žitarice i proizvodi od žitarica *	6	6	9	6	0	0	6	0
Gljive i kvasci	13	0	34	0	12	0	2	0
Proizvodi za specifičnu ishranu, i dijetetski suplementi	7	8	16	4	0	0	1	0
	356		1175		22		284	
	1837							

\*Instant cerealije-različiti brendovi i nivoi obogaćivanja, A-analički podaci, M- proizvođački podaci

Što se tiče sadržaja vitamina D u identifikovanim namirnicama, uočene su značajne varijacije u okviru grupa i između grupa namirnica. U okviru grupa namirnica, generalno, dokumentacija o analizi vitamina D

u dostupnim izvorima podataka (uglavnom nacionalne BPSN) ne obezbeđuje dovoljno pouzdanih informacija o različitim faktorima koji su mogli uticati na sadržaj vitamina D, kao

što su, na primer, informacije o delovima mesa životinja koji su korišćeni za analizu i za pripremanje hrane, procenat masti/masnog tkiva, recepture pripreme, praksa prehrane životinja i godišnje doba kada je rađeno uzorkovanje (Clausen et al., 2003; Schmid & Walther, 2013). Tabela 17. daje pregled raspona sadržaja vitamina D u pojedinim, međusobno sličnim namirnicama, identifikovanim u evropskim setovima podataka o sadržaju vitamina D.

**Tabela 17.** Rasponi sadržaja vitamina D ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) u istim ili sličnim namirnicama iz evropskog seta podataka

Grupa namirnica	Namirnica	VITAMIN D UKUPNI $\mu\text{g}/100\text{ g}$
<b>Riba</b>	Skuša (sirova, grilovana, dimljena)	3,5 - 12,8
	Skuša (konzervirana)	3,2 - 7,4
	Sardine (konzervirane)	3,3 - 10,8
	Losos (dimljen)	3,7 - 11,0
	Losos (gajen)	4,7 - 11,3
	Pastrmka (dimljena)	3,8 - 7,4
	Pastrmka (gajena)	4,3 - 7,9
<b>Mleko i mlečni proizvodi</b>	Mleko (sa različitim sadržajem mlečne masti)	0,01 - 1,4
	Mlečni proizvodi (jogurt, puding, čokoladno mleko, sir)	0,1 - 1,2*
<b>Instant cerealija</b>	Prerađene cerealije, obogaćene	0,2 - 42
<b>Jaja</b>	Jaje, celo, sirovo	0,8 - 3,2
<b>Masni namazi</b>	Margarin	7,0 - 8,4
	Puter	0,9 - 12
<b>Hleb i peciva</b>	Hleb	0,1
	Testenine i rezanci	0,1 - 0,2
	Peciva	0,2 - 55
<b>Obogaćene formulacije</b>	Hrana za odojčad, zamene za obroke, funkcionalne užine, praškovi	0,2 - 1190
<b>Nemlečni napici</b>	Napici bazirani na žitaricama	0,1 - 0,5
	Biljni kremovi	0,1 - 0,5
	Voćni nektari	0,5
<b>Meso</b>	Junetina (sirova)	0,1 - 0,5
	Piletina (u jelima)	0,1 - 0,63
	Svinjetina (sirova)	0,1 - 0,63
	Jagnjetina (sirova)	0,1 - 0,4

\* Jedan od prerađenih sireva bio je obogaćen sa 3,63  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g

U grupi masti i ulja, tj. margarina i masnih namaza, svi proizvodi bili su obogaćeni. Većina obogaćenih margarina iz nacionalnih baza podataka sadrži 7,5-8  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g, što je u skladu s evropskom regulativom o dodavanju vitamina D u margarine/masne namaze radi rekonstitucije nutritivnog sastava margarina kao alternative puteru (IMACE, 2004). Kako evropska legislativa nije u potpunosti primenjena, nacionalne legislative zahtevaju (u Finskoj, Švedskoj i UK) ili preporučuju rasprostranjeno obogaćivanje margarina (u Holandiji se čak do 75% margarina obogaćuje) (Spiro & Buttriss, 2014). U Srbiji su takođe svi meki margarini na tržištu obogaćeni sa 7,5-11  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g. U nekim severnoevropskim zemljama skorašnje studije ukazuju na primenu novih politika o obogaćivanju margarina, na osnovu kojih je sadržaj vitamina D podignut na 20  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g (Itkonen & Lamberg-Allardt, 2016).

Proizvodi od žitarica nisu značajan izvor vitamina D jer same žitarice prirodno ne sadrže ovaj vitamin, te vitamin D koji se nalazi u ovim proizvodima uglavnom potiče iz drugih sastojaka (putera, jaja ili kvasca), ili je dodat obogaćivanjem. Posebno instant žitarice predstavljaju značajan izvor vitamina D, jer se obogaćuju u toku proizvodnje (sa 17-42  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g u francuskoj i danskoj BPSN). Instant žitarice su predmet dobrovoljnog obogaćivanja u Evropi (Danska, Holandija, Francuska i UK) (Spiro & Buttriss, 2014) dok je u SAD obogaćivanje ograničeno na 8,75  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g (Calvo et al., 2004).

Obogaćene formulacije predstavljaju veliku grupu proizvoda: najrazličitije zamene za obroke, energetska pića, funkcionalna pića, hranu za odojčad i dr. U ovim proizvodima sadržaj vitamina D se kreće u rasponu od 0,1-1190  $\mu\text{g}$  vitamina D/100 g. Ovaj set podataka je tek mali segment evropskog tržišta obogaćenih funkcionalnih prehrambenih proizvoda, tj. većina ovih podataka u setu potiče iz Holandije, dok drugi setovi sadrže samo nekoliko. Prehrambena industrija reaguje na nove nutritivne preporuke i politike mnogo brže nego što to mogu kompilatorske organizacije i institucije koje se bave ažuriranjima BPSN. Autori iz Finske ukazuju na to da postoji nesklad u rezultatima u proceni nutritivnog unosa, odnosno potcenjivanje aktuelnog unosa, kada se koriste trenutne BPSN, ako se ne uzimaju u obzir nove politike obogaćivanja namirnica i pojava novih obogaćenih namirnica na tržištu (Itkonen & Lamberg-Allardt, 2016). Imajući ovo u vidu, u specijalizovanu bazu podataka o sadržaju vitamina D uključeni su i podaci o ovoj grupi namirnica koji potiču od proizvođača. Oblast

proizvodnje funkcionalne - obogaćene hrane se rapidno razvija, što je potvrdila pregledna studija Henesija i saradnika (Hennessy et al., 2013). Autori ukazuju na konstantan porast konzumacije obogaćenih proizvoda u Evropi u periodu od 1990. do 2010. godine, procentualnog udela populacije koja ih konzumira, broja namirnica koje su obogaćene i procenta unosa energije iz istih, koji su, međutim, i dalje daleko od dostizanja UL nivoa za vitamin D.

Skorašnja holandska studija pokazala je da deklarisanе vrednosti sadržaja vitamina D u obogaćenim namirnicama (npr. hrani za odojčad, kašama za bebe, mlečnim desertima) i dijetetskim suplementima značajno odstupaju od stvarnog sadržaja u ovim proizvodima. Za obogaćene namirnice je određen sadržaj vitamina D u rasponu od 50-153% od vrednosti deklarisanе na proizvodu, dok je za suplemente ovaj raspon bio od 8-177% deklarisanog sadržaja (Verkaik-Kloosterman et al., 2017). Legislativa EK odobrava odstupanja od deklarisanih sadržaja vitamina u hrani, od -35% do +50%, a u suplementima od -20% do +50% (European Commission, 2012). Ove činjenice upozoravaju na to da se podaci o vitaminu D moraju ponovo proveriti pre nutritivnih merenja, odnosno da dizajn studija mora uključiti prikupljanje aktuelnih podataka o sadržaju ovog nutrijenta u obogaćenim namirnicama i ažuriranje nacionalnih baza podataka o sastavu namirnica podacima o obogaćenim namirnicama i formulacijama, gde je to neophodno.

Značajne razlike uočene su i između evropskog i američkog seta podataka, i to kod mleka: sa redukovanom masnoćom (0,71 µg vitamina D/100 g vs. 1,18 µg vitamina D/100 g), poluobranog (0,19 µg vitamina D/100 g vs. 1,15 µg vitamina D/100 g) i punomasnog mleka (0,1 µg vitamina D/100 g vs. 0,97 µg vitamina D/100 g). Ove razlike odražavaju politiku obogaćivanja u SAD-u, gde su sva mleka obavezno obogaćena sa do 1,05 µg vitamina D/dl, dok se u Evropi prakse obogaćivanja razlikuju. U Švedskoj, obogaćivanje mleka je obavezno u rasponu od 0,38-0,5 µg vitamina D/dl. U Finskoj je 2010. godine bilo podržano obogaćivanje mleka sa 0,5 µg vitamin D/dl (Pietinen, Männistö, Valsta, & Sarlio-Lähteenkorva, 2010), a danas je ta količina dvostruko viša (Itkonen & Lamberg-Allardt, 2016). U Holandiji dobrovoljno se obogaćuju mleka sa do maksimalno 1 µg vitamina D/dl. Navedene činjenice ukazuju da upotreba USDA podataka za evropska nutritivna merenja može izazvati značajno precenjivanje unosa vitamina D.

Ograničenja ove specijalizovane baze podataka za vitamin D su: neujednačenost kvaliteta podataka o vitaminu D u evropskim zemljama; visoka zastupljenost nedokumentovanih vrednosti (skoro jedna trećina); manji broj vrednosti za vitamin D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> nego za ukupni vitamin D; nedostatak informacija o D<sub>2</sub> vrednostima. Pored toga, starost podataka (neki datiraju čak iz 1989. godine) kao i metodološke razlike između laboratorija sigurno su uticale na kvalitet podataka. Pa ipak, pažljivo korišćenje ove baze podataka, koja sadrži najbolje dostupne podatke o sadržaju vitamina D u Evropi, imaće primenu u postavljanju modela za optimalno obogaćivanje namirnica.

Ova baza podataka prilagođena je ODIN projektu, utoliko što su namirnice klasifikovane po ODIN klasifikaciji grupa namirnica, te se omogućava identifikacija obogaćenih namirnica u svakoj pojedinačnog grupi, npr. obogaćena mleka i mlečni proizvodi, obogaćene instant žitarice, itd. Druge klasifikacije u ovoj bazi (EFSA FoodEX2, LanguaL) omogućavaju njenu primenu u različitim studijama i modelima koji takođe koriste ove sisteme. Baza takođe omogućava identifikaciju većeg broja namirnica koje se mogu koristiti kao vektori za (bio)obogaćivanje, što i jeste cilj aktuelnih istraživanja u cilju kreiranja strategija za postizanje adekvatnog unosa i statusa vitamina D dodavanjem optimalnih i bezbednih količina vitamina D u hranu.

## Ažuriranje srpske BPSN vrednostima vitamina D i analiza podataka

Srpska BPSN sastoji se od 1450 namirnica i receptura. Kako se srpska BPSN kontinuirano ažurira, trenutno je u bazi registrovano 541 namirnica, jela i dijetetskih suplemenata, koje sadrže vitamin D. Baza je za potrebe ovog istraživanja ažurirana odabranim analitičkim podacima iz specijalizovane baze podataka o sadržaju vitamina D (Milešević et al., 2018), kao i podacima dostupnim iz relevantne literature. Ostali podaci pozajmljeni su sa platforme EuroFIR FoodExplorer™ za odgovarajuće namirnice. U ovom procesu vođeno je računa da namirnice i nutritivni podaci o njima (energetski sadržaj, sadržaj masti, ugljenih hidrata, proteina, itd.) budu isti ili najbliži onim u srpskoj BPSN. U tabeli 18. dat je pregled distribucije vitamina D po grupama namirnica u srpskoj BPSN.

**Tabela 18.** Broj namirnica u grupama namirnica i raspon vrednosti sadržaja vitamina D u srpskoj bazi podataka o sastavu namirnica

Grupa namirnica	Broj namirnica koje sadrže vitamin D	Raspon sadržaja ukupnog vitamina D $\mu\text{g}/100\text{ g}$
Nemlečni napici	2	0,84 - 1
Jaja i proizvodi od jaja	21	0,90 – 15,70
Masti i ulja	15	0,20 - 17,5
Voće i proizvodi od voća	3	0,08 - 1,75
Žitarice i proizvodi od žitarica	89	0,01 - 2,94
Meso i mesni proizvodi	138	0,02 - 3,69
Mleko i mlečni proizvodi i supstituti	93	0,01 - 8,30
Razno-jela	64	0,01 - 12,50
Orašasto voće i semenke i proizvodi	3	0,15 - 16,70
Proizvodi za posebne nutritivne potrebe	11	0,23 - 1200
Riba i riblji proizvodi	44	0,11 - 24,70
Šećer i proizvodi sa šećerom	22	0,01 - 2,50
Povrće i proizvodi od povrća	37	0,01 - 1,35

Po sadržaju vitamina D najznačajnije grupe namirnica su jaja, masti i ulja, meso i mesni proizvodi, mleko, mlečni proizvodi i supstituti, riba. U grupi *jaja* najveću vrednost ima žumance jajeta. Rezultati analize jaja proizvedenih u Srbiji dati su u daljem tekstu. U grupi masti i ulja po sadržaju vitamina D dominiraju margarina koji su njime obogaćeni u skladu s

evropskim propisima (IMACE, 2004). U ovoj grupi većina podataka potiče od proizvođača. Značajan sadržaj vitamina D zabeležen je i u grupi žitarica i proizvoda od žitarica, konkretno kod kroasana i drugih lisnatih peciva kod kojih su korišćeni sastojci koji su sadržali vitamin D (kvasac, jaja, puter, obogaćeni margarin). Meso i mesni proizvodi su velika grupa namirnica koja nema visoke vrednosti vitamina D. Izdvajaju se slanina i iznutrice, kao značajniji izvori vitamina D. U grupi mleko i mlečni proizvodi po značajnijim količinama vitamina D izdvaja se nekoliko vrsta tvrdih sireva (6 µg/100 g) i puter (3,8 µg/100 g). Inače, na srpskom tržištu nalazi se nekoliko vrsta sterilizovanih mleka (punomasno mleko i čokoladno mleko) koja su obogaćena vitaminom D do 0,75 µg/100 g, što je niže od onih na evropskom tržištu (>1 µg/100 g). U grupi raznih jela uglavnom se nalaze kompozitna jela sačinjena od navedenih izvora vitamina D. U ovoj grupi izdvaja se pekarski kvasac sa 12,5 µg/100 g. Kod riba je sadržaj vitamina D veoma raznolik, a najznačajniji izvori su šaran (24,7 µg/100 g), haringa (22,9 µg/100 g), sardina (20 µg/100 g), pastrmka (16-19 µg/100 g) i skuša (16 µg/100 g). U grupama proizvoda šećer i proizvodi sa šećerom i povrće i proizvodi od povrća, izvor vitamina D predstavljaju sastojci koji su korišćeni za njihovo spravljanje.

## Sadržaj vitamina D u konzumnim jajima

Da bi se upotpunio kvalitet podataka o vitaminu D u srpskoj BPSN, određen je sadržaj vitamina D u svežim konzumnim jajima iz intenzivne proizvodnje i iz malih domaćinstava na teritoriji Srbije. Analize su izvedene u DTU laboratoriji u Danskoj, standardizovanom HPLC metodom koja je prethodno opisana (Poglavlje Određivanje sadržaja vitamina D u uzorcima jaja sa tržišta Srbije). Određeni sadržaji vitamina D dati su u tabeli 19., dok su na slici 13. prikazani HPLC hromatogrami dobijeni pri određivanju vitamina D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> u žumancima jaja. Količina vitamina D u celom jajetu preračunata je proporcijom na osnovu prosečne mase sadržaja jaja (bez ljuske) i prosečne mase žumanaca.

**Tabela 19.** Količina vitamina D u konzumnim jajima u Srbiji – iz intenzivne proizvodnje i iz malih domaćinstava

Sadržaj vit D u jajetu	D <sub>3</sub> (µg/100 g jajeta)	25(OH)D (µg/100 g jajeta)	Ukupni vitamin D (D <sub>3</sub> +25(OH)D <sub>3</sub> x 5 <sup>1</sup> )
Intenzivna proizvodnja	2,97	0,56	5,79
Mala domaćinstva	1,58	0,28	2,99
Sadržaj vit D u žumancetu	D <sub>3</sub> (µg/100 g žumanceta)	25(OH)D (µg/100 g žumanceta)	Ukupni vitamin D (D <sub>3</sub> +25(OH)D <sub>3</sub> x 5 <sup>1</sup> )
Intenzivna proizvodnja	11,60	2,20	18,81
Mala domaćinstva	6,46	1,15	12,60

<sup>1</sup> Konverzioni faktor (Hayes et al., 2016)

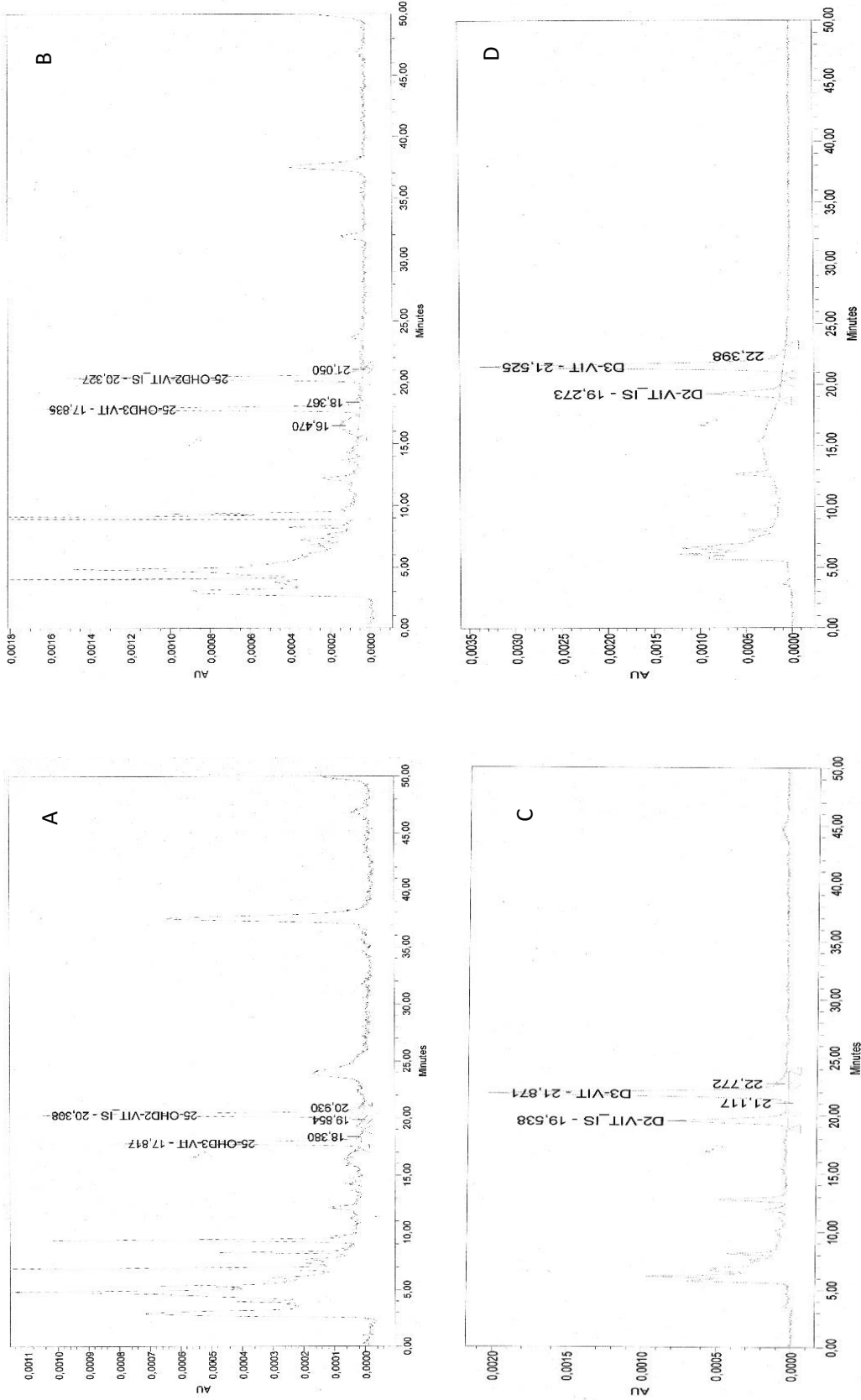
Rezultati jasno pokazuju da su jaja iz intenzivne proizvodnje dvostruko bogatija vitaminom D u poređenju s jajima iz malih domaćinstava. Iako su jaja iz malih domaćinstava od koka koje su gajene na otvorenom prostoru, izložene dnevnoj svetlosti, hranjene kombinovanom hranom- travom i kukuruznom prehranom, jaja iz intenzivne proizvodnje imaju veći sadržaj vitamina D jer su koke nosilje u intenzivnoj proizvodnji hranjene strogo kontrolisanim hranivima koja sadrže visoke koncentracije vitamina D, 37,5 - 45 µg/kg u potpunim smešama, odnosno 87,5 µg/kg u dopunskim smešama - po Pravilniku o kvalitetu hrane za životinje (Sl. glasnik RS", br. 4/2010, 113/2012, 2015). Zanimljivo je da su ta hraniva sadržala dehidrovana ulja algi iz severnih mora, dodavana premiksima da bi se poboljšao sadržaj ω-3 masnih kiselina, EPA i DHA (Bruneel et al., 2013; Fredriksson, Elwinger, & Pickova, 2006). Postoji



hipoteza da je upravo sadržaj  $\omega$ -3 masnih kiselina doprineo i većem sadržaju vitamina D u žumancetu, jer nekoliko studija sugeriraju da morske alge u svom metabolizmu sintetišu provitaminsku formu, 7-dehidroholesterol, pa čak i D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>, te se pretpostavlja da su ulja morskih algi u premiksima, bogata liposolubilnim vitaminima i njihovim prekursorima, potencijalno uticala na veći sadržaj vitamina D u ovim jajima. Ova pretpostavka mogla bi biti predmet daljih istraživanja. Ove analize predstavljaju preliminarnu proveru sadržaja vitamina D u jajima u Srbiji u poređenju s jajima iz drugih zemalja. Kako su rezultati znatno viši od onih iz drugih zemalja, potrebna je obimnija studija, sa obuhvatnijim uzorcima sa teritorije cele Srbije, i u okviru nje komparativna analiza prehrane životinja, godišnjih doba i drugih uslova gajenja životinja (npr. upotrebe UV lampi) koji mogu uticati na sadržaj vitamina D u jajima.

Bitno je naglasiti da su jaja, a posebno žumanca veoma atraktivan medijum za bio-obogaćivanje tj. dizajniranje jaja kao funkcionalne hrane, jer se sadržaj nutrijenata u hrani za koke nosilje direktno odražava na nutritivni sastav žumanceta. Pregledna studija o praksi ishrane živine širom sveta pokazala je pozitivne efekte manipulisanje prehrane koka nosilja. Naime, dodavanjem prirodnih i sintetičkih dodataka kao što su masne kiseline, selen, vitamin E u premikse za koke, dolazilo je do povećanja sadržaja ovih nutrijenata u žumancetu jaja (Grčević, Gajčević-Kralik, Kralik, & Ivanković, 2011).

Podaci o sadržaju vitamina D u jajima iz intenzivne proizvodnje i iz malih domaćinstava uneti su u srpsku BPSN kao prosečna srednja vrednost, sa primenom konverzionog faktora 5 za 25(OH)D<sub>3</sub> (Hayes et al., 2016) koji je definisan i u okviru EuroFIR standarda za agregaciju podataka o vitamerima, te je prosečan sadržaj ukupnog vitamina D u žumancima 15,70  $\mu$ g/100 g, a u svežim jajima 4,39  $\mu$ g/100 g.



**Slika 13.** HPLC hromatogrami dobijeni pri određivanju vitamina D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> u žumancima jaja iz intenzivne proizvodnje i malih domaćinstava: A-25(OH)<sub>3</sub> u jajima iz malih domaćinstava; B-25(OH)D<sub>3</sub> u jajima iz intenzivne proizvodnje, C-vitamin D<sub>3</sub> u jajima iz malih domaćinstava, D-vitamin D<sub>3</sub> u jajima iz intenzivne proizvodnje

## Nutritivni unos vitamina D u Srbiji

Reprezentativni uzorak srpske odrasle populacije čini ukupno 605 ispitanika, 326 žena i 279 muškaraca. Podeljeni su, po metodologiji EFSA EU Menu, na tri starosne grupe: adolescenti (10-17 godina, 75 ispitanika), odrasli (18-64 godina, 489 ispitanika) i stariji (65+ godina, 41 ispitanik). Ispitanici su regrutovani u toku cele kalendarske godine, u četiri regiona Srbije, u okviru studija o ishrani koje Centar izuzetne vrednosti za istraživanje ishrane i metabolizma sprovodi u okviru svojih istraživanja. Intervju se sastojao od prikupljanja podataka o opštim i demografskim karakteristikama ispitanika, popunjavanja prve 24HDR (Prilog 1.), popunjavanja upitnika o učestalosti konzumiranja grupa namirnica i suplemenata i upitnika o fizičkoj aktivnosti. Druga 24HDR rađena je u ličnom kontaktu ili putem telefona, najmanje 7 dana nakon sprovođenja prve. Za ova istraživanja korišćen je Atlas fotografija sa porcijama namirnica kao pomoćni instrument za procenjivanje količina konzumiranih namirnica (Nikolic et al., 2018). Prikupljeni podaci unošeni su u DAP softver gde su identifikovane namirnice povezivane sa namirnicama, odnosno nutritivnim podacima u srpskoj BPSN, koja je sastavni deo DAP programa. Na taj način omogućeno je izračunavanje nutritivnih parametara od interesa.

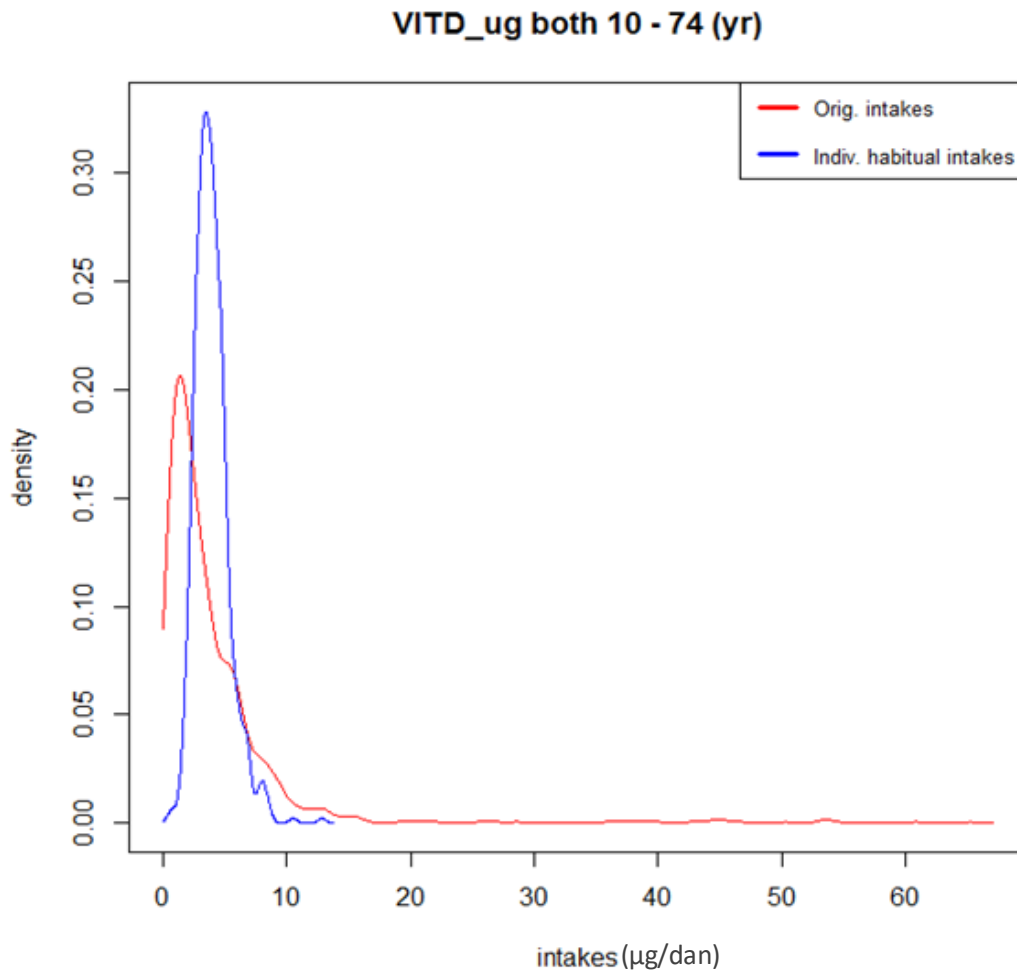
Nutritivni status ispitivane populacije i nutritivni unos vitamina D određeni su obradom podataka u DAP softveru, da bi se primenom statističkog programa SPADE odredile vrednosti uobičajenog unosa (*habitual intake*), koji uzima u obzir intra – i inter - individualne varijacije i daje precizniju procenu na populacionom nivou. Rezultati analize prikazani su u tabeli 20.

Uobičajeni energetske unos srpske odrasle populacije je  $2145,9 \pm 635,1$  kcal/dan, sa unosom  $229,1 \pm 73,4$  g/dan ugljenih hidrata,  $94,3 \pm 29,8$  g/dan masti i  $81,2 \pm 23,1$  g/dan proteina. Najveći energetske unos imaju adolescenti  $2318,4 \pm 776,5$  kcal/dan, dok energetske unos opada sa starošću. Ovaj trend prati i unos makronutrijenata. Uobičajeni unos vitamina D, određen programom SPADE, u ispitivanoj populaciji je  $4 \pm 1,4$  µg/dan, dok je prosečna vrednost unosa  $4,1 \pm 4,4$  µg/dan. Ove vrednosti su u skladu sa nalazima prethodnih ispitivanja rađenih u Srbiji (Djekic-Ivankovic et al., 2015; Novakovic et al., 2012). Budući da je ovom studijom obuhvaćen do sada najveći broj odraslih osoba, kvalitet uzorka potvrđuje nalaz o rasprostranjenosti neadekvatnog unosa vitamina D u svim starosnim grupama i među polovima. Najniži unos

imaju ispitanici 65+ starosne grupe: žene  $3,0 \pm 0,9$   $\mu\text{g}/\text{dan}$  i muškarci  $3,8 \pm 1,4$   $\mu\text{g}/\text{dan}$ . Adolescenti imaju najviši unos: devojke  $3,9 \pm 1,2$   $\mu\text{g}/\text{dan}$  i momci  $4,7 \pm 1,3$   $\mu\text{g}/\text{dan}$ . Muška populacija ima nešto veći unos vitamina D od ženske,  $4,3 \pm 1,5$   $\mu\text{g}/\text{dan}$ , prema  $3,7 \pm 1,2$   $\mu\text{g}/\text{dan}$ . Pa ipak, identifikovane vrednosti daleko su od preporučenih za EAR (10  $\mu\text{g}/\text{dan}$ ) i AI (15  $\mu\text{g}/\text{dan}$ ), prema preporuci EFSA-a (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2016). Ustanovljeno je da u proseku 95% srpske populacije ne dostiže EAR vrednosti (tabela 21.).

Da bi se upotpunilo razumevanje uzroka nedostatka vitamina D u ishrani srpske populacije urađena je i analiza unosa kalcijuma, čije usvajanje i homeostaza u organizmu zavisi od prisustva vitamina D (Lanham-New, 2008; New, 1999). Unos kalcijuma u ispitivanoj populaciji bio je  $824,3 \pm 285,4$  mg/dan (tabela 20.) što je ispod preporučenih vrednosti - PRI (Population Recommended Intake) za kalcijum od 950 mg/dan za starije od 25 godine, 1000 mg/dan za mlađe od 25 godina i 1150 mg/dan za adolescente od 11-17 godina (Vieille et al., 2015). Ovaj podatak bi se takođe mogao uključiti u razmatranje razvoja obogaćenih prehrambenih proizvoda, jer je ova praksa već ustanovljena na nekim proizvodima, kao što je npr. sok od pomorandže obogaćen kalcijumom i vitaminom D (Tangpricha et al., 2003).

Na slici 14. dat je prikaz razlike distribucije vrednosti unosa vitamina D pre i posle primene programa SPADE. Distribucija uobičajenog unosa (plava kriva) približnija je normalnoj raspodeli koja je i očekivana na populacionom nivou. Do distribucije uobičajenog unosa dolazi se putem SPADE modela koji uzima u obzir inter- i intra-individualne varijacije na nivou ispitanika istog pola i starosne kategorije. Preciznije, distribucija unosa dobijena procenom iz dve 24HDR ankete ishrane (crvena kriva) koriguje se varijacijom između dve ankete i varijacijom između ispitanika istog pola i starosnih kategorija. Primenom ovog modela optimizuje se uticaj ekstremnih vrednosti unosa, prisutnih kod malog broja ispitanika, na standardnu grešku (plava linija).



**Slika 14.** Razlika u raspodeli nutritivnog unosa vitamina D između prosečnog unosa (crvena linija) ispitivane populacije i uobičajenog unosa (plava linija) određenog u programu SPADE

Tabela 20. Nutritivni status i nutritivni unos vitamina D i kalcijuma u srpskoj odrasloj populaciji

Pol	Ž				M				SVI			
	10 - 17	18 - 64	65+	Total	10 - 17	18 - 64	65+	Total	10 - 17	18 - 64	65+	Total
St. Grupe	38	267	21	326	37	222	20	279	75	489	41	605
Br. ispitnika	2049,9±627,5*	1931,9±471,5	1950,9±493,2	1946,9±493,1	2594,0±824,9	2364,0±681,8	2140,7±583,5	2378,4±701,0	2318,4±776,5	2128,1±614,9	2043,5±540,9	2145,9±635,1
Energija (kcal)	232,3±67,6	215,7±58,7	224,5±62,9	218,2±60,1	280,4±95,6	237,4±82,1	220,8±75,7	241,9±84,7	256,0±85,5	225,5±71,0	222,7±68,6	229,1±73,4
UH (g/dan)	91,0±31,5	84,5±21,7	82,1±24,5	85,1±23,2	113,6±40,3	104,7±31,9	93,1±27,1	105,0±33,0	102,1±37,6	93,7±28,6	87,5±26,1	94,3±29,8
Masti (g/dan)	72,9±18,6	73,1±17,2	71,0±16,5	73,0±17,3	97,5±26,8	90,5±25,1	81,4±21,4	90,7±25,2	85,0±26,0	81,0±22,8	76,1±19,5	81,2±23,1
Proteini (g/dan)	3,9±1,2	3,7±1,2	3,0±0,9	3,7±1,2	4,7±1,3	4,3±1,5	3,8±1,4	4,3±1,5	4,3±1,3	4,0±1,4	3,4±1,2	4±1,4
Vit D (µg/dan)	813,4±252,8	787,4±247,8	781,4±229,8	790±246,7	1000,6±350,7	843,4±314,5	845,3±280,1	864,4±320,6	905,7±317,3	812,8±281,2	812,5±254,4	824,3±285,4
Ca (mg/dan)	*srednja vrednost ± SD											

**Tabela 21.** Prikaz procentualnog udela populacije ispod i iznad EAR (10 µg/dan) vrednosti

pol		starosna grupa			PROSEČNO
		10 - 17	18 - 64	65 +	
Ž	% < EAR	97%	96%	100%	97%
	% ≥ EAR	3%	4%	0%	3%
M	% < EAR	92%	93%	90%	93%
	% ≥ EAR	8%	7%	10%	7%
SVI	% < EAR	95%	95%	95%	95%
	% ≥ EAR	5%	5%	5%	5%

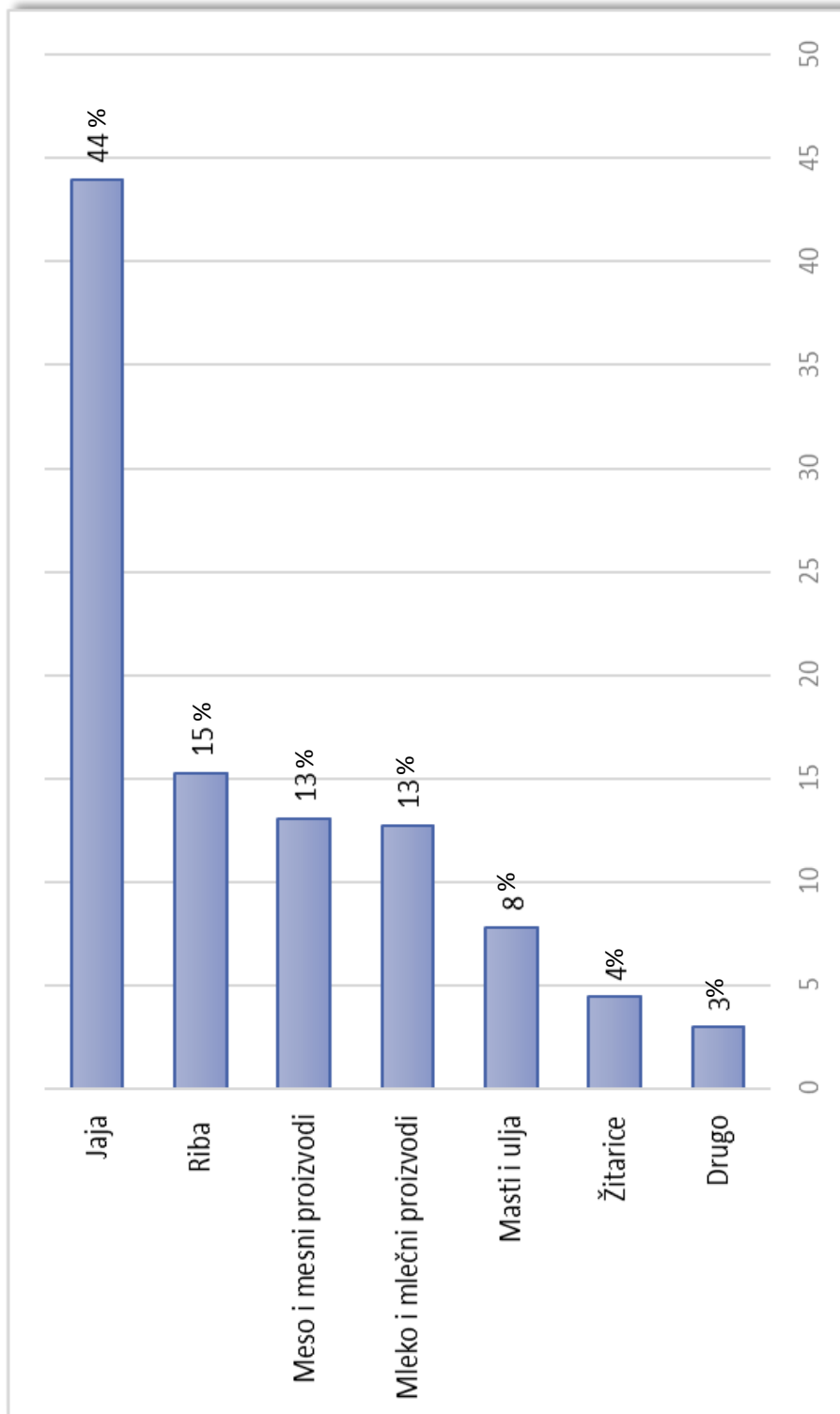
## Glavni izvori vitamina D u ishrani srpske populacije

Glavni izvori vitamina D u ishrani srpske populacije su jaja, riba, meso i mlečni proizvodi. Unos namirnica (g/dan) prikazan je u tabeli 22. Jaja predstavljaju odličan izvor vitamina D i usled česte konzumacije zauzimaju dominantno mesto u distribuciji unosa ovog nutrijenta. Riba se značajno manje konzumira u posmatranoj populaciji (oko 28 g/d), ali je zbog visokog sadržaja vitamina D drugi najznačajniji izvor ovog nutrijenta. Meso, mleko i mlečni proizvodi konzumiraju se u značajnim količinama. Iako je sadržaj vitamina D u ovim proizvodima generalno nizak, sumarno doprinose ukupnom unosu. Slika 15. prikazuje procentualnu distribuciju ukupnog unosa vitamina D iz glavnih prehrambenih izvora. U grupi masti i ulja, samo margarina i masni namazi obogaćeni vitaminom D predstavljaju izvor vitamina D. U grupi žitarica, izvor vitamina D nalazi se u sastojcima korišćenim za spravljanje jela od žitarica (kvascima, masnoćama i jajima). U grupi „Drugo“ nalaze se konditorski proizvodi (među čijim sastojcima su i namirnice sa vitaminom D), obogaćeni praškasti proizvodi kao što su kakao napici, proizvodi za zamenu obroka i suplementi.

U uzorku populacije unos suplemenata sa vitaminom D je veoma nizak. Naime, identifikovano je samo petoro ispitanika koji su konzumirali suplemente sa vitaminom D - uglavnom trudnice (u sklopu prenatalnih multivitaminskih suplemenata), vegetarijanci i starije žene.

Konzumacija obogaćenih namirnica identifikovana je kod 35 ispitanika, a te namirnice su bile: obogaćena mleka i biljna mleka, kakao prah, obogaćeni sokovi, margarin i instant žitarice. Mnogi od ovih proizvoda (sokovi, instant žitarice i kakao prah) su uvoznog porekla.





Slika 15. Glavni izvori vitamina D u posmatranoj srpskoj populaciji

Tabela 22. Dnevni unos (g/dan) glavnih izvora vitamina D u istraživanom uzorku populacije

Pol	Ž				M				PROSEČNO			
	10 - 17	18 - 64	65 +	SVI	10 - 17	18 - 64	65 +	SVI	10 - 17	18 - 64	65 +	SVI
Starosne grupe												
Br. ispitanika	38	267	21	326	37	222	20	279	75	489	41	605
Jaja	137±66*	104±60	80±49	106±61	149±73	119±69	110±62	122±70	143±70	111±65	95±57	113±66
Ulja i masti	27±12	23±9	22±10	23±9	33±18	26±12	25±10	27±13	30±15	24±10	23±10	25±11
Riba	9±32	40±116	9±14	35±106	4±7	24±86	8±13	20±77	7±24	33±104	9±13	28±94
Meso	135±57	121±60	105±60	122±60	198±67	179±91	137±60	179±87	166±69	147±81	121±61	148±79
Mleko i mlečni proizvodi	299±124	245±119	213±106	249±120	342±148	240±146	219±124	252±148	320±137	243±132	216±114	250±134

\*srednja vrednost ± SD (g/danu)

## Identifikacija namirnica za obogaćivanje

Odabir adekvatnih namirnica za obogaćivanje zasniva se na sledećim kriterijumima (L. Allen, Benoist, Dary, & Hurrell, 2006; Darton-Hill, Neufeld, Vossenaar, Osendarp, & Martinez, 2017):

- **Univerzalna konzumacija** (određena na osnovu broja potrošača i prosečne i ukupne količine konzumiranih namirnica u posmatranoj populaciji) – namirnice treba da imaju konstantnu učestalost konzumacije.
- **Udeo energetskog unosa iz odabrane namirnice**
- **Bezbedne količine dodatog nutrijenta** - ova količina se procenjuje na osnovu dnevnog unosa iz svih izvora (namirnica, obogaćenih namirnica i suplemenata), a ne sme premašiti UL na 95. percentilu unosa.
- **Efikasnost** – mera obogaćivanja odabranih namirnica treba da utiče na porast nivoa serum 25(OH)D.
- **Bio-dostupnost i stabilnost** - vitamin D dodat namirnicama treba da bude stabilan u toku proizvodnje i pripreme (tj. da ne dovodi do promene senzorskih karakteristika namirnice) i da ima visoku bio-dostupnost kroz tu namirnicu.
- **Kulturološko prihvatanje** - religijska ili dijetarna ograničenja mogu da utiču na izbor obogaćenih namirnica.
- **Individualna tolerantnost** - namirnice koje izazivaju probleme u varenju ili alergije nisu adekvatan izbor.
- **Dostupnost** - namirnice moraju biti dostupne čak i u udaljenim i manjim mestima.
- **Pristupačnost** – namirnice moraju imati pristupačnu cenu na tržištu.
- **Isplativost** - tehnološka izvodljivost procesa obogaćivanja mora biti ekonomski opravdana.
- **Centralizacija procesa obogaćivanja** – centralizovanost treba da obezbedi efikasnu implementaciju i kontrolu kvaliteta.

Nutritivna analiza pokazala je da je ispitivana grupa konzumirala ukupno 686 namirnica iz 12 grupa namirnica. Od toga je 210 namirnica sadržalo vitamin D > 0 µg/100 g, pri čemu je sadržaj vitamina D u 159 namirnica bio <1 µg/100 g.

Za potrebe dizajniranja modela, uzimajući gore navedene kriterijume u obzir, odabrano je 70 namirnica koje su bile sortirane u sedam karakterističnih grupa namirnica: beli hleb, mleko, jogurt, sir, pavlaka, jaje i paradajz pire.

**1. Beli hleb** - predstavlja najčešće konzumiranu namirnicu, po količini i po broju konzumenata, i daleko više je konzumiran nego druge vrste hleba. Pored toga, u prethodnim istraživanjima pokazao se kao adekvatan vektor za obogaćivanje, dodavanjem sintetskog vitamina D<sub>3</sub> u zames (Brown et al., 2013; Hirvonen et al., 2007; Madsen et al., 2013; Natri et al., 2006). Iako je kvasac koji se koristi u proizvodnji hleba izvor vitamina D<sub>2</sub>, istraživanja su pokazala da konzumacija hleba sa UV-β tretiranim kvascem (vid bio-obogaćivanja) ne izaziva porast 25(OH)D<sub>3</sub> u serumu, odnosno da ova forma vitamina D nema potencijal za značajno podizanje 25(OH)D<sub>3</sub> kod ljudi (Itkonen et al., 2016).

**2. Mleko** predstavlja zbirnu konzumaciju svih tipova mleka, sterilisanih, pasterizovanih i onih sa različitim sadržajem mlečne masti. Zbirna konzumacija uzeta je u obzir sa pretpostavkom da konzument može da odabere bilo koju vrstu mleka dostupnog na tržištu. Ono je poznato kao idealan vektor za obogaćivanje vitaminom D (Calvo & Whiting, 2013; Hirvonen et al., 2007; Madsen et al., 2013).

**3. Jogurt** predstavlja zbirnu konzumaciju svih tipova jogurta, kiselih mleka i kefira, sa različitim sadržajem mlečne masti. Jogurt je pogodan vektor za obogaćivanje vitaminom D, a srpska populacija ga i konzumira više nego mleko. Zbirna konzumacija uzeta je u obzir zbog pretpostavke da konzument može da odabere bilo koju od namirnica iz ove grupe, dostupnih na tržištu. U ranijim istraživanjima jogurt je takođe razmatran i usvojen kao pogodan vektor za obogaćivanje vitaminom D (Calvo & Whiting, 2013; Hirvonen et al., 2007).

**4. Sir** predstavlja zbirnu konzumaciju svih tipova sireva - svežih, zrelih, punomasnih i sireva sa smanjenim sadržajem mlečne masti, od različitih vrsta mleka. Zbirna konzumacija uzeta je u obzir na osnovu pretpostavke da konzument može da odabere bilo koju vrstu sira od dostupnih na tržištu. Sir je pogodan vektor za obogaćivanje kako su pokazala i prethodna istraživanja u kojima je korišćena lipozomska enkapsulacija vitamina D (Banville, Vuillemand, & Lacroix, 2000; Calvo & Whiting, 2013; Manios, Moschonis, Mavrogianni, et al., 2017).

**5. Pavlaka** predstavlja zbirnu konzumaciju svih tipova pavlake (sa različitim sadržajem mlečne masti). Zbirna konzumacija uzeta je u obzir, na osnovu pretpostavke da konzument može da odabere bilo koju vrstu pavlake dostupne na tržištu. Iako u prethodnim studijama o

obogaćivanju namirnica vitaminom D nije razmatrana pavlaka kao vektor, pretpostavljeno je da se ona može na sličan način tretirati kao ostali navedeni mlečni proizvodi, a sadrži značajne količine mlečne masti koja obezbeđuje stabilnost vitamina D. Pored toga, pavlaka je jedan od najčešće konzumiranih mlečnih proizvoda u Srbiji.

**6. Jaje**, odnosno žumance, prirodno predstavlja značajan izvor vitamina D. Pored toga, jaja spadaju i u najčešće konzumirane namirnice u srpskoj populaciji. Kako se u jajima, odnosno žumancima, značajno odražava svaka intervencija u ishrani koka nosilja, ona su idealan vektor za bio-obogaćivanje. Prethodna istraživanja o suplementaciji koka nosilja vitaminom D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> pokazala su značajna povećanja sadržaja ovih vitamina u žumancima (Hayes et al., 2016; Mattila et al., 2011), što je vid bio-obogaćivanja. Ovakav pristup obogaćivanju namirnica ima i povoljnu komercijalnu stranu jer su prirodno obogaćene, tj. nutritivno vrednije namirnice atraktivnije opcije savremenom potrošaču.

**7. Paradajz pire** predstavlja grupu prehrambenih proizvoda napravljenih od pasiranog i termički obrađenog paradajza koji se koristi u pripremi raznih jela u Srbiji. Ova vrsta prehrambenih proizvoda našla se visoko na listi najčešće konzumiranih namirnica te je odlučeno da se uključi u dalje razmatranje u modelu. Ideja za odabir ove vrste namirnica potekla je iz prakse obogaćivanja soka od pomorandže (Biancuzzo et al., 2010; Tangpricha et al., 2003) koja se praktikuje u mnogim zemljama Evrope i SAD. Analiza unosa namirnica u Srbiji pokazala je da ovaj sok nije značajno zastupljen u srpskoj ishrani, dok paradajz pire jeste. Pripremljeni paradajz pirei, kečapi i paradajz premazi sadrže mali udeo masti a i modifikacije recepture dodavanjem masnoće (npr. palminog, suncokretovog ili maslinovog ulja) mogle bi da obezbede stabilnost vitamina D. Pretpostavka je da se i paradajz pire i proizvodi od njega mogu obogatiti primenom nano/mikro-enkapsulacije (koacervati, liposomi itd.) vitamina D (Wilson & Shah, 2007). Kako se ovi proizvodi često pakuju u tamnije boce, tetrapak i druge materijale koji štite proizvod od svetlosti, obezbedila bi se stabilnost vitamina D u njima.

Lista ovih grupa namirnica data je u tabeli 23. sa distribucijom konzumacije svake grupe namirnica na 5., 50. i 95. percentilu i prosečnim energetske unosom iz svake grupe u posmatranoj populaciji.

**Tabela 23.** Odabrane namirnice za obogaćivanje, distribucija unosa (g) i prosečnog energetskeg unosa (kcal) iz svake od njih

Grupe namirnica	A	B	C	D	E*
	5. perc. unosa (g)	Sr. vred. unosa (g)	95. perc unosa (g)	prosečan energetskeg unos (kcal)	Energetski udeo (%TE)
Hleb, beli	30	81,8	183,1	187,1	8,7
Mleko	12,15	88,8	209,3	43,13	2,0
Jogurt	18,65	193,2	333,4	57,63	2,7
Sir	11	46,5	95,6	107,6	5,0
Pavlaka	4	18,5	50	11,53	0,5
Jaja	6,3	44	120	61,24	2,9
Paradajz pire	6	34	79	10,57	0,5

\* %TE je izračunat na osnovu prosečnog energetskeg unosa od 2145,9 kcal/dan

## Razvoj prediktivnog modela obogaćivanja različitih prehrambenih proizvoda vitaminom D. Validacija razvijenog modela simulacijom nutritivnog unosa

Osnova prediktivnog modela obogaćivanja različitih prehrambenih proizvoda vitaminom D je u matematičkoj formuli kojom se izračunava količina vitamina D koju treba dodati određenoj grupi prehrambenih proizvoda, u skladu s količinom njihove konzumacije i udelom u dnevnom energetske unosu. Ova formula izvedena je iz Braunove formule (Brown et al., 2013) i dopunjena faktorom procentualnog udela datog proizvoda (vektora za obogaćivanje) u ukupnom energetske unosu u posmatranoj populaciji, unosa vitamina D na n-tom percentilu, i količinom unosa vektora (u gramima) na n-tom percentilu:

$$f_c = [(I_r - I_{a_n}) * 100 / F_{i_n}] * v / 100, \quad (19)$$

gde su:

$f_c$	količina vitamina D koju treba dodati vektoru (u $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ );
$I_r$	preporučena vrednost unosa vitamina D (EAR, AI, UL);
$I_{a_n}$	aktuelna vrednost ukupnog unosa vitamina D na n-tom percentilu;
$F_{i_n}$	unos (u gramima) vektora na n-tom percentilu (tabela 23., kolone A, B, C);
$v$	prosečan udeo (%TE) vektora $F_i$ u prosečnom energetske unosu u toku dana (tabela 23., kolona E).

Faktori korišćeni u formuli 19 definisani su na sledeći način:

<b>Faktor</b>	<b>Vrednost</b>	
I <sub>r</sub>	EAR	10 µg/dan
	AI	15 µg/dan
	UL	100 µg/dan
I <sub>a<sub>n</sub></sub>	5. percentil	2,16 µg/dan
	srednja vrednost	3,97 µg/dan
	95. percentil	6,68 µg/dan
Energetski unos	Prosečan za celu populaciju	2145,9 kcal/dan

Kombinovanjem navedenih faktora dobijeni su scenariji u kojima je izračunata količina vitamina D koju treba dodati u sve odabrane namirnice - fc vrednost. Ovi scenariji razmatraju mogućnosti dostizanja preporuka (EAR, AI i UL) pri niskim (5. percentil), srednjim (50. percentil) i visokim (95. percentil) unosima odabranih namirnica, kao i pri niskim, srednjim i visokim nivoima unosa vitamina D (na 5., 50. i 95. percentilu) u populaciji. Količina konzumiranog vektora kao i aktuelni unos vitamina D suprotno su proporcionalni fc vrednostima, odnosno što je aktuelni unos veći, i/ili konzumacija vektora veća, time je količina vitamina D za dodavanje vektorima niža, i obrnuto. U tabeli 24. prikazane su fc vrednosti za sve scenarije dobijene primenom razvijene formule.

Sledeći korak u građenju prediktivnog modela je simulacija uobičajenog unosa vitamina D za posmatrani uzorak populacije. Odgovarajuće fc vrednosti vitamina D iz jednog scenarija „dodaju“ se odabranim vektorima u srpskoj BPSN, da bi se simulirao njihov unos u odabranoj populaciji, te se obradom podataka u DAP softveru dobijaju novi podaci za unos vitamina D za svakog ispitanika u svakom od scenarija. Ovi podaci obrađuju se u programu SPADE i dobijaju se novi uobičajeni unosi vitamina D. U ovakvom modelu obrazac ishrane populacije ostaje isti kao i u početnom stanju, ali se procenjuje porast unosa vitamina D, usled obogaćivanja, u celoj populaciji.



## Validacija prediktivnog modela obogaćivanja namirnica vitaminom D u Srbiji u poređenju s nutritivnim preporukama

Obzirom na to da su razlike u  $f_c$  vrednostima među nekim scenarijima veoma male (tabela 24.), odabrano je sedam scenarija koji su simulirani da bi se validirao efekat „dodavanja“ vitamina D na dostizanje zadatih referentnih vrednosti. Odabrani su sledeći scenariji:

1. Scenario 1: prosečan unos vitamina D ( $Ia_{50}$ ) i prosečna konzumacije odabranih vektora ( $Fi_{50}$ ) za zadovoljenje AI;
2. Scenario 2: nizak unos vitamina D ( $Ia_5$ ) i prosečna konzumacije odabranih vektora ( $Fi_{50}$ ) za zadovoljenje AI;
3. Scenario 3: prosečan unos vitamina D ( $Ia_{50}$ ) i nizak unos odabranih vektora ( $Fi_5$ ) za zadovoljenje AI;
4. Scenario 4: prosečan unos vitamina D ( $Ia_{50}$ ) i visok unos odabranih vektora ( $Fi_{95}$ ) za dostizanje UL;
5. Scenario 5: testira efikasnost scenarija 4 kada bi se u vektor paradajz pire dodavala količina vitamina D koja odgovara 5. percentilu unosa vitamina D i 5. percentilu konzumacije paradajz pirea za dostizanje UL-a, odnosno  $8,03 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ;
6. Scenario 6: testira efikasnost scenarija 4 kada bi se u vektor paradajz pire dodavala polovina količine vitamina D koja odgovara 5. percentilu unosa vitamina D i 5. percentilu konzumacije paradajz pirea za dostizanje UL-a, odnosno  $4,015 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ;
7. Scenario 7: prosečan unos vitamina D ( $Ia_{50}$ ) i prosečna konzumacije odabranih vektora ( $Fi_{50}$ ) za dostizanje UL.

Simulacija scenarija 5 i 6 rađena je da bi se testiralo dostizanje UL količina vitamina D u uslovima niske konzumacije namirnice koja se inače količinski manje konzumira (paradajz pire), a visoke konzumacije svih ostalih vektora. Za ove testove korišćene su ekstremne  $f_c$  vrednosti za paradajz pire ( $Ia_5 / Fi_5 - 8.03 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  i polovina od te vrednosti).

Rezultati simulacija po navedenim scenarijima prikazani su u tabeli 25. Scenario 1 (prosečan unos vitamina D i konzumacija) i 2 (nizak unos vitamina D i prosečna konzumacija) su dali

slične rezultate za zadovoljenje AI. Scenario 3 (prosečan unos vitamina D, niska konzumacija) za zadovoljenje AI, daje dvostruko veće vrednosti unosa, dok su ove vrednosti nešto niže pri uslovima srednjeg unosa vitamina D i visoke konzumacije vektora za dostizanje UL vrednosti (scenario 4).

U literaturi je navedeno da je optimalan unos vitamina D onaj u kojem cela populacija dostiže donji granični nivo- EAR, većina dostiže AI a niko ne prelazi UL (Hirvonen et al., 2007). U ovom radu, simulacijom modela (tabela 25.) za scenarije 1 i 2 podižu se vrednosti unosa vitamina D, ali se ne postiže EAR vrednost čak ni na 92.5 percentilu unosa populacije. Scenario 3 omogućava postizanje EAR vrednosti na 25. percentilu, približne vrednosti za AI na 65. percentilu, dok je unos vitamina D na 92.5. percentilu ispod 25 µg/dan, što čini ovaj scenario optimalnim u ovom modelu. Scenariji 4, 5 i 6, daju nešto niže vrednosti nego scenario 3, ali su one značajne jer potvrđuju bezbednost dodavanja viših količina vitamina D pri visokoj konzumaciji odabranih vektora. Pored toga, scenariji 5 i 6 su pokazali da se dodatkom ekstremnih količina vitamina D u namirnice koje se konzumiraju u malim količinama (paradajz pire) ne mogu premašiti referentne vrednosti. Scenario 7, sa znatno višim fc vrednostima, daje distribuciju unosa u kojoj se preko 50% populacije nalazi u rasponu od AI-UL, ne prelazeći ni 50 µg/dan na 92.5 percentilu, te se ove fc vrednosti mogu smatrati maksimalnim količinama vitamina D koje se mogu bezbedno dodavati odabranim vektorima, u uslovima prosečne konzumacije i prosečnog unosa vitamina D. Na slici 16. je dat grafički prikaz distribucije uobičajenog unosa vitamina D dobijen simulacijom kroz scenario 1, 3 i 7.

**Tabela 24.** Izračunate vrednosti količine vitamina D (fc) koja bi se trebala dodati odabranim vektorima (namirnicama) za obogaćivanje na osnovu konzumacije vektora (Fi) na 5., 50. i 95. percentilu, i na 5., 50. i 95. percentilu unosa vitamina D (Ia), u cilju dostizanja preporučene nutritivne vrednosti (AI, EAR i UL)

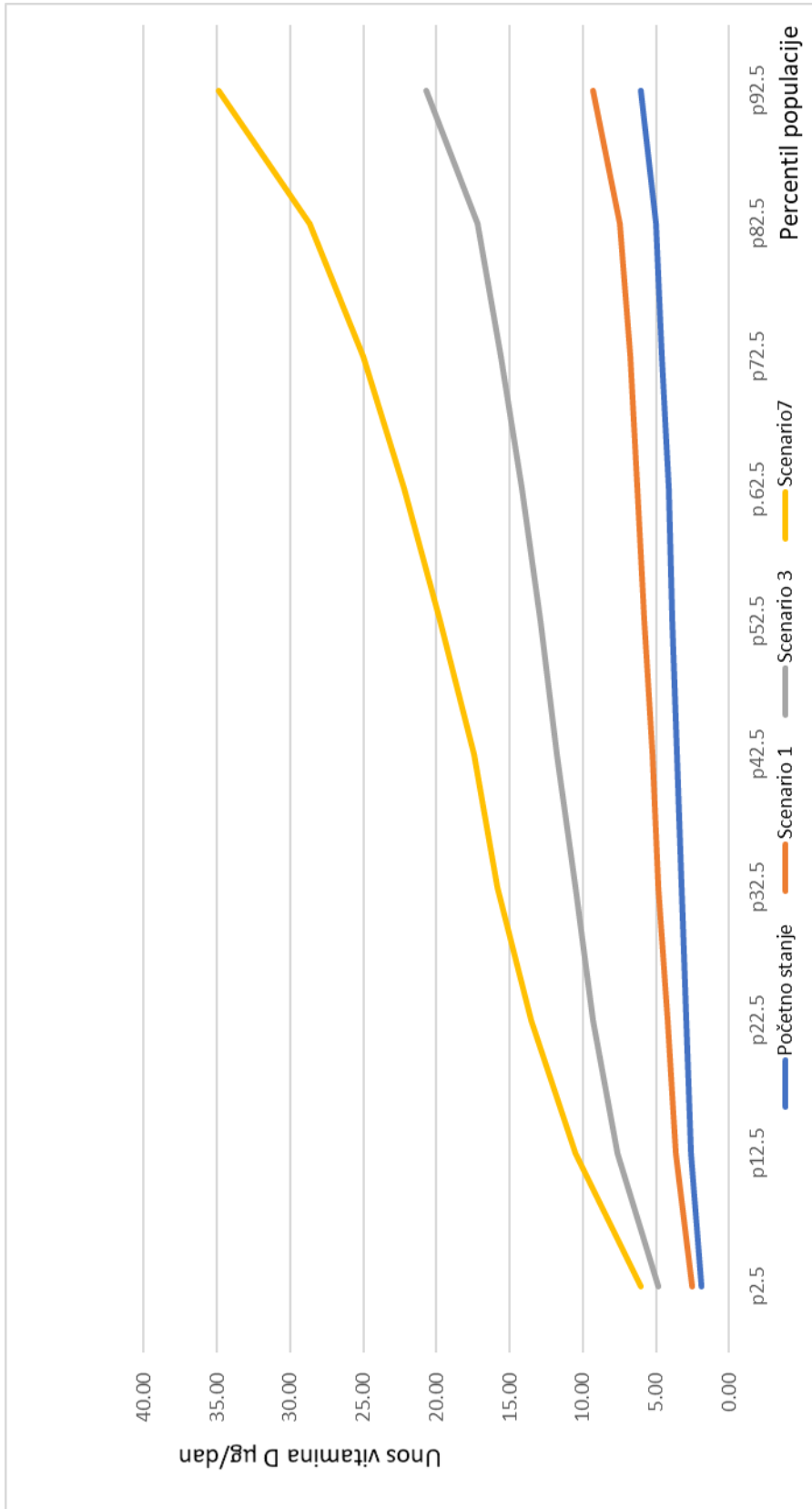
Preporuke	Vektori za obogaćivanje	fc (µg/100 g)								
		Ia5 / Fi95	Ia50 / Fi95	Ia95 / Fi95	Ia5 / Fi50	Ia50 / Fi50	Ia95 / Fi50	Ia5 / Fi5	Ia50 / Fi5	Ia95 / Fi5
AI	hleb	0,61	0,53	0,40	1,37	1,18	0,89	3,73	3,21	2,42
	mleko	0,12	0,11	0,08	0,29	0,25	0,19	2,12	1,82	1,38
	jogurt	0,10	0,09	0,07	0,18	0,15	0,12	1,85	1,59	1,20
	sir	0,67	0,58	0,44	1,38	1,19	0,90	5,85	5,03	3,79
	pavlaka	0,14	0,12	0,09	0,37	0,32	0,24	1,72	1,48	1,12
	jaja	0,31	0,26	0,20	0,83	0,72	0,54	5,82	5,00	3,77
	paradajz pire	0,08	0,07	0,05	0,19	0,16	0,12	1,05	0,91	0,68
EAR	hleb	0,37	0,29	0,16	0,84	0,64	0,35	2,28	1,75	0,96
	mleko	0,08	0,06	0,03	0,18	0,14	0,08	1,30	1,00	0,55
	jogurt	0,06	0,05	0,03	0,11	0,08	0,05	1,13	0,87	0,48
	sir	0,41	0,32	0,17	0,85	0,65	0,36	3,57	2,75	1,51
	pavlaka	0,08	0,06	0,04	0,23	0,18	0,10	1,05	0,81	0,45
	jaja	0,19	0,14	0,08	0,51	0,39	0,22	3,55	2,73	1,50
	paradajz pire	0,05	0,04	0,02	0,11	0,09	0,05	0,64	0,50	0,27
UL	hleb	4,66	4,57	4,44	10,43	10,24	9,95	28,44	27,91	27,12
	mleko	0,94	0,92	0,90	2,21	2,17	2,11	16,18	15,89	15,44
	jogurt	0,79	0,77	0,75	1,36	1,33	1,30	14,09	13,83	13,44
	sir	5,13	5,04	4,89	10,55	10,36	10,06	44,60	43,77	42,54
	pavlaka	1,05	1,03	1,00	2,84	2,79	2,71	13,14	12,90	12,54
	jaja	2,33	2,28	2,22	6,35	6,23	6,05	44,32	43,50	42,27
	paradajz pire	0,61	0,60	0,58	1,42	1,39	1,35	8,03	7,88	7,66

EAR-10 µg/dan, AI- 15 µg/dan, UL-100 µg/dan

**Tabela 25.** Distribucija uobičajenog unosa vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{dan}$ ), dobijena simulacijom kroz sedam scenarija obogaćivanja vektora -namirnica

percent il	Početno stanje	Scenario 1	Scenario 2	Scenario 3	Scenario 4	Scenario 5	Scenario 6	Scenario 7
<b>p 2,5</b>	1,91	2,51	2,64	4,85	3,90	4,44	4,22	6,08
<b>p 12,5</b>	2,59	3,64	3,81	7,65	6,30	7,06	6,69	10,47
<b>p 22,5</b>	2,95	4,24	4,43	9,32	8,06	8,88	8,48	13,51
<b>p 32,5</b>	3,27	4,86	5,12	10,54	9,11	10,11	9,61	15,84
<b>p 42,5</b>	3,55	5,27	5,52	11,78	10,12	11,10	10,58	17,41
<b>P 52,5</b>	3,88	5,77	6,08	12,86	11,11	12,30	11,72	19,74
<b>p 62,5</b>	4,17	6,25	6,63	14,16	12,49	13,49	12,99	22,21
<b>P 72,5</b>	4,58	6,77	7,15	15,60	13,87	15,09	14,47	25,01
<b>p 82,5</b>	5,01	7,50	7,89	17,18	15,56	16,91	16,14	28,67
<b>p 92,5</b>	6,05	9,31	9,79	20,68	18,65	19,73	19,23	34,92

- Scenario 1 AI pri Ia50 / Fi50
- Scenario 2 AI pri Ia5 / Fi50
- Scenario 3 AI pri Ia50 / Fi5
- Scenario 4 UL pri Ia50/Fi95
- Scenario 5 UL pri Ia50/Fi95+paradajz pire – 8,03  $\mu\text{g}/100\text{ g}$
- Scenario 6 UL pri Ia50/Fi95+paradajz pire – 4,015  $\mu\text{g}/100\text{ g}$
- Scenario 7 UL pri Ia50/Fi50



**Slika 16.** Grafički prikaz distribucije uobičajenog unosa vitamina D

Početno stanje: bez obogaćivanja,

Scenario 1: prosečni unos vitamina D i prosečna konzumacija odabranih vektora za zadovoljenje AI,

Scenario 3: prosečni unos vitamina D i niska konzumacija odabranih vektora za zadovoljenje AI,

Scenario 7: prosečni unos vitamina D i prosečna konzumacija odabranih vektora za dostizanje UL.

## Definisanje adekvatnih količina vitamina D za dodavanje namirnicama

Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da scenario 3 daje optimalne, a scenario 7 maksimalne vrednosti količina vitamina D koje se mogu bezbedno dodati odabranim namirnicama u cilju zadovoljenja potreba srpske populacije za ovim vitaminom. U slučaju jogurta scenario 3 dao je veće fc vrednosti u odnosu na scenario 7. Stoga je za ovu namirnicu kao optimalna fc vrednost usvojena ona dobijena po scenariju 7, a kao maksimalna dobijena po scenariju 3. Rezultati su pokazali da se paradajz pire može obogatiti sa do 8  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  u uslovima optimalnog obogaćivanja ostalih vektora. U tabeli 26. prikazane su definisane adekvatne količine vitamina D za dodavanje namirnicama, odnosno optimalne i maksimalne vrednosti.

**Tabela 26.** Pregled optimalnih i maksimalnih količina vitamina D koje se mogu dodati odabranim namirnicama da bi se zadovoljile potrebe srpske populacije za ovim vitaminom

	<b>Optimalno (vitamin D <math>\mu\text{g}/100\text{ g}</math>)</b>	<b>Maksimalno (vitamin D <math>\mu\text{g}/100\text{ g}</math>)</b>
Hleb, beli	<b>3,21</b>	<b>10,24</b>
Mleko	<b>1,82</b>	<b>2,17</b>
Jogurt	<b>1,33</b>	<b>1,59</b>
Sir	<b>5,03</b>	<b>10,36</b>
Pavlaka	<b>1,48</b>	<b>2,79</b>
Jaja	<b>5,00</b>	<b>6,23</b>
Paradajz pire	<b>0,91</b>	<b>1,39*</b>
*Paradajz pire se može obogatiti sa do 8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ u uslovima optimalnog obogaćivanja ostalih vektora		

Dobijene vrednosti za optimalno i maksimalno dodavanje vitamina D (tabela 26.) odabranim namirnicama u okvirima su onih prethodno određenih drugim modelima (Calvo et al., 2004; Danish Veterinary and Food Administration, 2017; Flynn et al., 2003; Kloosterman et al., 2007; Rasmussen et al., 2006). Takođe, ovaj model predstavlja amalgam prethodnih modela, u smislu da uzima u obzir faktore koji određuju unos vitamina D iz potencijalno obogaćenih

namirnica. Pored toga model određuje koje količine vitamina D treba dodati najčešće konzumiranim namirnicama jer one u složenom sistemu ishrane jedne populacije simultano doprinose unosu vitamina D. U odnosu na Braunov model,  $f_c$  vrednosti su značajno manje, jer se dopunjenom formulom omogućava proporcionalna distribucija vitamina D potrebnog za dodavanje, na više različitih namirnica.

Za razliku od Flinovog i Rasmusenovog modela (Flynn et al., 2003; Rasmussen et al., 2006) koji pretpostavljaju procenat energetskeg unosa iz obogaćenih namirnica prema ukupnom energetskeg unosu iz svih namirnica, model razvijen u ovom radu pretpostavlja da su sve odabrane namirnice obogaćene, uzimajući njihov udeo u ukupnom energetskeg unosu. Njihovi modeli podrazumevaju dobrovoljno obogaćivanje, pa je arbitrarno određen procenat namirnica koje se potencijalno mogu obogatiti, a arbitrarna je i procena koliko se tih obogaćenih namirnica realno može konzumirati. Ove procene su se pokazale nerealan visokim, pa je u norveškom modelu taj procenat bio smanjen sa 25% na 15% (Norwegian Food Safety Authority, 2012) što je rezultiralo višim vrednostima dodatog vitamina D. U razvijenom modelu razmatrane su optimalne količine vitamina D koje bi se mogle dodati svim odabranim namirnicama. Ovakav pristup podrazumeva sprovođenje studije procene rizika, razvoj strategije i usvajanje regulative o praksi obaveznog obogaćivanja namirnica u Srbiji.

Bitno je naglasiti da se model zasniva na pretpostavci da se ishrana populacije ne menja, tj. ne implicira promenu obrazaca ishrane, niti uvođenje novih namirnica u ishranu. Ona uzima u obzir namirnice široke potrošnje te se pretpostavlja da bi se efekat obogaćivanja odrazio i na delove populacije koji iz bilo kog razloga ne konzumiraju neke od odabranih namirnica. U analizi ishrane posmatrane populacije identifikovano je sedmoro ispitanika koji nisu konzumirali ni jednu od odabranih namirnica, niti su uneli vitamin D iz bilo koje namirnice ili suplemenata u toku ispitivanih dana. Utvrđeno je da su ovi ispitanici imali potpunu vegansku ishranu i da izbor njihovih namirnica nije uključivao konzumaciju namirnica sa  $D_2$  vitaminom kao što su pečurke, kvasni hlebovi, biljna obogaćena mleka, itd. Ovaj slučaj pokazuje da je potrebno razvijati obogaćene proizvode za ljude sa specifičnom redukovanom ishranom, odnosno razvijati više biljnih proizvoda sa dodatim vitaminom D. U ovoj studiji razmotrili smo mogućnost razvoja jednog takvog proizvoda - paradajz pirea, i odredili količinu vitamina D koja bi se mogla dodati u skladu sa aktuelnom konzumacijom svih proizvoda iz ove grupe.

Drugi primer bi mogli da budu biljni namazi (paštete od leguminoza, uljanih semenki i pečuraka) jer su sve popularniji među vegetarijancima, veganima i onima koji poste, a mogli bi da budu adekvatan vektor za obogaćivanje.

Dalje, ova studija je pokazala da je trenutna konzumacija obogaćenih namirnica u Srbiji ograničena. Mali broj ispitanika sporadično je konzumirao obogaćene namirnice, i to poreklom iz uvoza, iz zemalja gde je obogaćivanje regulisano kao dobrovoljno. U studiji procene rizika ovaj aspekt ishrane morao bi biti detaljnije istražen metodama koje bi bile specijalizovane za prikupljanje odgovarajućih podataka o: brendovima obogaćenih namirnica, sadržaju vitamina D u identifikovanim namirnicama, frekvenciji konzumacije, ciljnim grupama i dr. Pretpostavlja se da je svest potrošača o značaju vitamina D i efikasnosti obogaćenih namirnica na nezadovoljavajućem nivou te da strategija obogaćivanja namirnica treba da sadrži i plan informisanja potrošača o važnosti vitamina D i njegovim izvorima.

Studija razmatra obogaćivanje namirnica iz četiri velike grupe namirnica: jaja, mleko i mlečni proizvodi, pekarski proizvodi i proizvodi od povrća. Ono što bi u daljim istraživanjima trebalo ispitati je efekat koji bi bio-obogaćivanje mesa i proizvoda od mesa, kao veoma zastupljenih u ishrani srpske populacije, imalo na porast unosa vitamina D. Skorašnje studije pokazale su da se obogaćivanjem ishrane životinja (Cashman & Hayes, 2017) i izlaganjem životinja UV-β zračenju (Kühn et al., 2015; Larson-Meyer et al., 2017) može značajno povećati sadržaj vitamina D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> u mišićnim i drugim tkivima tretiranih životinja.

Konačno, razvijeni model osmišljen je tako da se može primenjivati i na većem broju i tipova namirnica-vektora, čak i u drugim zemljama ukoliko se primene odgovarajući faktori koji određuju kontekst ishrane istraživane populacije. Kada bi se model primenio na većem broju namirnica-vektora, količine dodatog vitamina D bile bi generalno niže u pojedinačnim namirnicama, što bi osiguralo bezbednu konzumaciju i pružilo potrošačima veći izbor odabranih namirnica. Na taj način pružila bi se mogućnost različitim populacionim grupama da kroz uobičajenu ishranu upotpune/zadovolje svoje potrebe za vitaminom D.



## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije razvijena je specijalizovana baza podataka o sadržaju vitamina D u namirnicama u Evropi, a zatim je ažurirana srpska baza podataka o sastavu namirnica odabranim podacima iz ove baze. Baza je potom primenjena na određivanje unosa vitamina D u srpskoj populaciji i na razvoj prediktivnog modela za obogaćivanje prehrambenih proizvoda vitaminom D radi zadovoljavanja nutritivnih preporuka. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

Specijalizovana baza podataka o sadržaju vitamina D predstavlja izvor odabranih analitičkih vrednosti ovog nutrijenta u uobičajenim namirnicama, poreklom iz osam evropskih nacionalnih BPSN i naučne literature. Ona je standardizovana i harmonizovana u skladu sa klasifikacionim sistemima ODIN, EuroFIR, LanguaL i EFSA FoodEX2, što omogućava njenu primenu u sistemima za procenu unosa vitamina D. Evropskim BPSN nedostaju informacije o vitaminu D<sub>2</sub>, dok su neke od informacija dostupne u USDA bazi (za pečurke, obogaćene mlečne proizvode i napitke, instant cerealije i namirnice za specijalne nutritivne potrebe formulisane od strane prehrambene industrije). Suprotno navedenom, USDA SR26 setu nedostaju informacije o 25(OH)D<sub>3</sub>. Pa ipak, ni evropski set podataka ne predstavlja značajan izvor informacija o vitaminu D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> u poređenju s brojem vrednosti za ukupni vitamin D. Generalno, da bi se vrednosti mogle na adekvatan način interpretirati, potrebna je bolja dokumentovanost uzorkovanja i analitičkih metoda.

Različite strategije obogaćivanja u evropskim zemljama odražavaju se na sadržaj vitamina D u obogaćenim namirnicama. Takođe, postoje značajne razlike između evropskih i američkih strategija, te primena američkih podataka u studijama o ishrani u Evropi može dovesti do značajnog precenjivanja unosa vitamina D. Ova baza razvijena je u okviru projekta ODIN i može se proširivati i ažurirati kako se novi (bio)obogaćeni proizvodi budu razvijali.

Dobijeni rezultati takođe potvrđuju da je potreban veći angažman nacionalnih institucija za BPSN na prikupljanju podataka o vitaminu D uopšte, a naročito zbog rastućeg broja obogaćenih namirnica na tržištima. Baza podataka dostupna je preko EuroFIR platforme - [www.eurofir.org](http://www.eurofir.org).

Specijalizovana baza podataka o sadržaju vitamina D korišćena je za ažuriranje srpske BPSN. Dalje, da bi se upotpunio kvalitet podataka o sadržaju vitamina D u srpskoj BPSN, određen je sadržaj vitamina D u svežim konzumnim jajima, iz intenzivne proizvodnje i iz malih domaćinstava, sa tržišta Srbije. Analiza sadržaja vitamina D u jajima realizovana je kao pilot studija. Njeni rezultati pokazali su da su jaja iz intenzivne proizvodnje dvostruko bogatija vitaminom D nego jaja iz malih domaćinstava, 5,78 µg/100 g u odnosu na 2,99 µg/100 g. Ovo je rezultat strogo kontrolisane ishrane u intenzivnoj proizvodnji koka nosilja hranivima koja imaju značajne količine vitamina D.

Ažurirana srpska BPSN korišćena je za određivanje unosa vitamina D u ispitivanoj populaciji. Utvrđeno je da je uobičajeni unos vitamina D bio  $4 \pm 1,4$  µg/dan, bez značajnih razlika između polova i starosnih grupa, a da je 95% populacije ispod EAR vrednosti. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima u Srbiji, kao i u većini evropskih država.

Glavni izvori vitamina D u ishrani srpske populacije su jaja, riba, meso, mleko i mlečni proizvodi, dok su ostale namirnice manje značajni izvori. Korišćenje suplemenata u odrasloj populaciji Srbije može se smatrati minimalnim i sporadičnim. U ovoj studiji utvrđeno je da suplemente vitamina D koriste uglavnom trudnice, starije žene i vegetarijanci. Obogaćene namirnice se takođe retko konzumiraju. Iako na tržištu postoji ograničen broj različitih obogaćenih proizvoda, oni su uglavnom uvoznog porekla. U Srbiji su proizvedeni: obogaćeno mleko, meki margarin i neki masni namazi.

Imajući u vidu i druge bitne kriterijume za odabir adekvatnih vektora za obogaćivanje vitaminom D, identifikovani su prehrambeni proizvodi: jaja, mleko, jogurt, sir, pavlaka, beli hleb i paradajz pire, da se na njima izgradi prediktivni model obogaćivanja.

Razvijeni prediktivni model za obogaćivanje namirnica baziran je na prethodnim istraživanjima, a dopunjen elementima koji uključuju udeo energetske unosa svake od odabranih grupa namirnica. Simulacijom modela sedam scenarija definisane su optimalne i

maksimalne količine vitamina D koje se mogu dodati odabranim namirnicama da bi se zadovoljile potrebe srpske populacije za ovim vitaminom.

Dobijeni rezultati su u okvirima vrednosti koje se dodaju nekim od namirnica u drugim evropskim zemljama. Pored toga, u model su uključeni i novi prehrambeni proizvodi (pavlaka i paradajz pire) koji do sada nisu bili razmatrani u drugim modelima, a predstavljaju adekvatne vektore za obogaćivanje. Uvođenje novih proizvoda implicira primenu bio-obogaćivanja i enkapsulacije vitamina D kao tehnoloških rešenja za ovu praksu.

Rezultati ove studije ukazuju na to da, kada bi se odabrani proizvodi obogatili optimalnim količinama vitamina D, 65% stanovništva dostiglo bi AI vrednosti, dok bi se primenom maksimalnih vrednosti 75% stanovništva nalazilo u opsegu AI -UL vrednosti. Dalja istraživanja trebala bi da procene rizike vezane za dobrovoljno i/ili obavezno obogaćivanje namirnica i time pomognu u formiranju i uspostavljanju zakonskih i regulatornih okvira za ovu praksu u Srbiji.

Razvijeni model se može primenjivati i na više različitih (grupa) namirnica što bi podrazumevalo generalno manje količine za dodavanje na nivou pojedinačne namirnice, ali bi omogućilo veću dostupnost različitim konzumentima. Primena modela moguća je i u drugim zemljama, pod uslovom da se model koristi u nutritivnom kontekstu date populacije.

## Budući pravci istraživanja

Radi uspostavljanja zakonske regulative a potom i prakse obogaćivanja namirnica vitaminom D u Srbiji, potrebno je sprovesti dodatna istraživanja. Ona bi trebalo da obuhvate:

- Studiju o tehnološkoj efikasnosti procesa dodavanja vitamina D u namirnice;
- Eksperimentalnu studiju na životinjama;
- Interventnu i kliničku studiju, koje bi za predmet imale različite vidove i efekte konzumacije obogaćenih namirnica, na primer porast unosa i statusa vitamina D u populaciji, utvrđivanje bioraspoloživosti i dostupnosti vitamina D iz obogaćenih namirnica;
- Studiju o prihvatljivosti obogaćenih proizvoda od strane potrošača, uz procenu zadovoljavanja nutritivnih potreba kroz prosečnu potrošačku korpu;
- Unapređenje prediktivnog modela faktorima statusa vitamina D u letnjem i zimskom periodu, odnosno preciznije procene sezonskih nutritivnih potreba stanovništva, radi prilagođavanja količina vitamina D potrebnih za dodavanje namirnicama;
- Studiju o proceni rizika od prekomernog unosa vitamina D kroz obogaćene namirnice;
- Usavršavanje prehrambenih preporuka radi dostizanja adekvatnog unosa vitamina D kroz hranu i razvoj različitih vidova informisanja potrošača o tim preporukama, i uopšte, o značaju vitamina D.

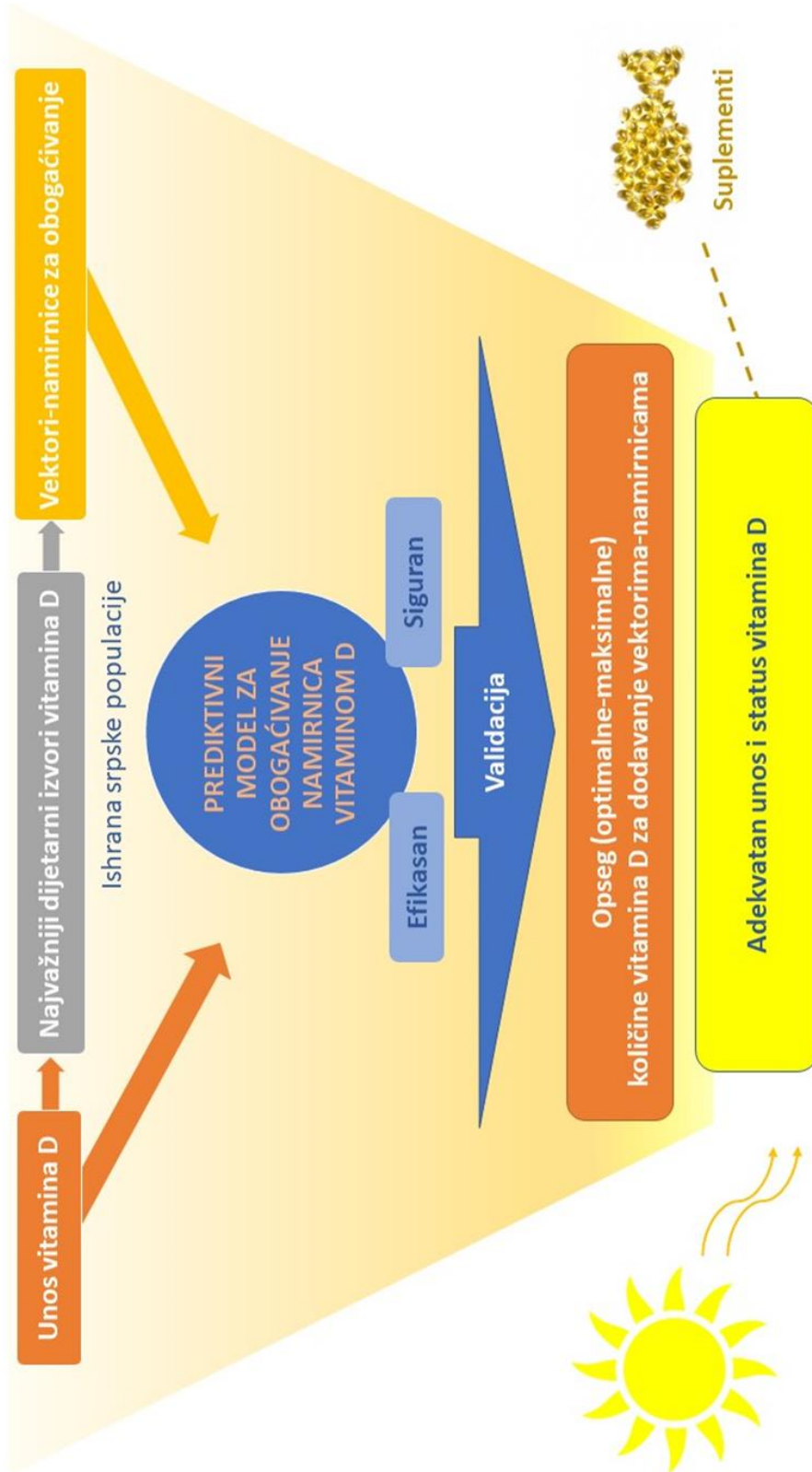
## 6. REZIME

- 1) Nutritivni unos vitamina D u srpskoj odrasloj populaciji je  $4\pm 1,4$   $\mu\text{g}/\text{dan}$ , što je ispod preporučenih vrednosti ( $< \text{EAR}$ ).
- 2) Glavni izvori vitamina D u ishrani srpske populacije su jaja, riba, meso i mlečni proizvodi.
- 3) Na osnovu kriterijuma za odabir adekvatnih namirnica za obogaćivanje odabrano je 70 najčešće konzumiranih namirnica iz sedam specifičnih grupa: beli hleb, mleko, jogurt, sir, pavlaka, jaja i paradajz pire.
- 4) Na osnovu dobijenih rezultata dizajniran je prediktivni model specifičan za ishranu srpske populacije kojim se simulira zadovoljavanje nutritivnih preporuka za vitamin D a posredstvom obogaćivanja odabranih namirnica.
- 5) Definisane su optimalne i maksimalne količine vitamina D koje se mogu dodati odabranim namirnicama:

	<b>Optimalno (vitamin D <math>\mu\text{g}/100</math> g)</b>	<b>Maksimalno (vitamin D <math>\mu\text{g}/100</math> g)</b>
Hleb, beli	<b>3,21</b>	<b>10,24</b>
Mleko	<b>1,82</b>	<b>2,17</b>
Jogurt	<b>1,33</b>	<b>1,59</b>
Sir	<b>5,03</b>	<b>10,36</b>
Pavlaka	<b>1,48</b>	<b>2,79</b>
Jaja	<b>5,00</b>	<b>6,23</b>
Paradajz pire	<b>0,91</b>	<b>1,39*</b>

*\*Paradajz pire se može obogatiti sa do 8  $\mu\text{g}/100$  g u uslovima optimalnog obogaćivanja ostalih vektora.*

**Šema razvoja i primene prediktivnog modela za obogaćivanje namirnica vitaminom D data je na slici 17.**



Slika 17. Šema razvoja prediktivnog modela za obogaćivanje namirnica vitaminom D

## 7. LITERATURA

- Allen, L., Benoist, B. de, Dary, O., & Hurrell, R. (2006). Guidelines on Food Fortification With Micronutrients. *WHO & FAO UN*, 341. <https://doi.org/10.1242/jeb.02490>
- Allen, R. E., Dangour, A. D., & Tedstone, A. E. (2014). Update of the vitamin D content of fortified foods and supplements in the UK National Diet and Nutrition Survey Nutrient Databank. *Nutrition Bulletin*, 39(3), 247–252. <https://doi.org/10.1111/nbu.12099>
- AOAC Official Method 995.05. (1997). Vitamin D in Infant Formulas and Enteral Products. Liquid Chromatographic Method. *Journal of AOAC*, 50(1), 23.
- Ball, G. F. M. (1988). *Fat-soluble vitamin assays in food analysis: a comprehensive review. Fat-soluble vitamin assays in food analysis: a comprehensive review*. London, UK: Elsevier Science Publishers Ltd.
- Banville, C., Vuillemand, J. ., & Lacroix, C. (2000). Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. *International Dairy Journal*, 10(5–6), 375–382. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00054-6)
- Battault, S., Whiting, S. J., Peltier, S. L., Sadrin, S., Gerber, G., & Maixent, J. M. (2013). Vitamin D metabolism, functions and needs: From science to health claims. *European Journal of Nutrition*, 52(2), 429–441. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0430-5>
- Becker, W., Moller, A., Ireland, J., Roe, M., Unwin, I., & Pakkala, H. (2008). *Proposal for structure and detail of a EuroFIR Standard on food composition data II. Technical Annex*. Copenhagen. [https://doi.org/ISBN\\_978-87-92125-10-1](https://doi.org/ISBN_978-87-92125-10-1)
- Becker, W., Unwin, I., Ireland, J., & Moller, A. (2007). *Proposal for structure and detail of a EuroFIR standard on food composition data Proposal for structure and detail of a EuroFIR standard on food composition data I: Description of the standard. EuroFIR Technical Report*. Brussels.
- Bender, A. E. (1979). The effects of processing on the stability of vitamins in foods. In *The Importance of Vitamins to Human Health* (pp. 111–125). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-6229-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-011-6229-6_13)

- Biancuzzo, R. M., Young, A., Bibuld, D., Cai, M. H., Winter, M. R., Klein, E. K., ... Holick, M. F. (2010). Fortification of orange juice with vitamin D 2 or vitamin D 3 is as effective as an oral supplement in maintaining vitamin D status in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, *91*, 1621–1626. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27972>
- Bilodeau, L., Dufresne, G., Deeks, J., Clément, G., Bertrand, J., Turcotte, S., ... Fouquet, A. (2011). Determination of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(3), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.002>
- Black, L., Seamans, K., Cashman, K., & Kiely, M. (2012). An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Vitamin D Food Fortification. *Journal of Nutrition*, *142*(6), 1102–1108. <https://doi.org/10.3945/jn.112.158014.vitamin>
- Black, L., Walton, J., Flynn, A., Cashman, K., & Kiely, M. (2015). Small Increments in Vitamin D Intake by Irish Adults over a Decade Show That Strategic Initiatives to Fortify the Food Supply Are Needed. *Journal of Nutrition*, *145*(5), 969–976. <https://doi.org/10.3945/jn.114.209106>
- Black, L., Walton, J., Flynn, A., & Kiely, M. (2013). Adequacy of vitamin D intakes in children and teenagers from the base diet, fortified foods and supplements. *Public Health Nutrition*, *17*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1368980013000359>
- Borissova, A.-M., Shinkov, A., Vlahov, J., Dakovska, L., Todorov, T., Svinarov, D., & Kassabova, L. (2013). Vitamin D status in Bulgaria—winter data. *Archives of Osteoporosis*, *8*(1–2), 133. <https://doi.org/10.1007/s11657-013-0133-4>
- Brannon, P. M., Yetley, E. A., Bailey, R. L., & Picciano, M. F. (2008). Overview of the conference “Vitamin D and Health in the 21st Century: an Update.” *The American Journal of Clinical Nutrition*, *88*, 483S–490S.
- Brown, J., Sandmann, A., Ignatius, A., Amling, M., & Barvencik, F. (2013). New perspectives on vitamin D food fortification based on a modeling of 25(OH)D concentrations. *Nutrition Journal*, *12*(1), 151. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-151>
- Brubacher, G., Müller-Mulot, W., & Southgate, D. A. T. (1985). Vitamin D in Margarine: HPLC Method. In *Methods for the Determination of Vitamins in Food* (pp. 141–151). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-4944-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-009-4944-7_12)



- Bruneel, C., Lemahieu, C., Fraeye, I., Ryckebosch, E., Muylaert, K., Buyse, J., & Foubert, I. (2013). Impact of microalgal feed supplementation on omega-3 fatty acid enrichment of hen eggs. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 897–904. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2013.01.039>
- Byrdwell, W. C., DeVries, J., Exler, J., Harnly, J. M., Holden, J. M., Holick, M. F., ... Wolf, W. R. (2008). Analyzing vitamin D in foods and supplements: Methodologic challenges. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(2), 554–557. <https://doi.org/88/2/554S> [pii]
- Calvo, M. S., Calvo, M. S., Whiting, S. J., Whiting, S. J., Barton, C. N., & Barton, C. N. (2004). Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1710S–1716S.
- Calvo, M. S., & Whiting, S. J. (2013). Survey of current vitamin D food fortification practices in the United States and Canada. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 136, 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.034>
- Calvo, M. S., Whiting, S. J., & Barton, C. N. (2005). Symposium : Vitamin D Insufficiency: A Significant Risk Factor in Chronic Diseases and Potential Disease-Specific Biomarkers of Vitamin D Sufficiency “Vitamin D Intake: A Global Perspective of Current Status.” *American Society for Nutritional Sciences*, 135(2), 317–322.
- Cashman, K. D., Dowling, K. G., Skrabakova, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtuena, J., De Henauw, S., ... Kiely, M. (2016). Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *American Journal of Clinical Nutrition*, 103(C), 1–12. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120873>.
- Cashman, K. D., & Hayes, A. (2017). Red meat’s role in addressing ‘nutrients of public health concern.’ *Meat Science*, 132(April), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.011>
- Cashman, K. D., & Kiely, M. (2016). Tackling inadequate vitamin D intakes within the population: fortification of dairy products with vitamin D may not be enough. *Endocrine*, 51(1), 38–46. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0711-x>
- CEN. (2009). Foodstuffs- Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography- Measurement of cholecalciferol (D3) and ergocalciferol (D2). E.C.F.S.
- Chen, P. S., Raymond Terepka, A., Lane, K., & Marsh, A. (1965). Studies of the stability and extractability of vitamin D. *Analytical Biochemistry*, 10(3), 421–434. <https://doi.org/10.1016/0003->

2697(65)90311-8

Chen, Y., Reddy, R. M., Li, W., Yettlla, R. R., Lopez, S., & Woodman, M. (2015). Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Vitamins A and D<SUB>3</SUB> in Fluid Milk Products. *Journal of AOAC International*, 98(2), 390–396. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-137>

Clausen, I., Jakobsen, J., Leth, T., & Ovesen, L. (2003). Vitamin D-3 and 25-hydroxyvitamin D-3 in raw and cooked pork cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5), 575–585. [https://doi.org/10.1016/s0889-1575\(03\)00064-4](https://doi.org/10.1016/s0889-1575(03)00064-4)

Codex Alimentarius Commission. (1987). General principles for the addition of essential nutrients to foods CAC/GL 9-1986. *Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission*.

Crowe, F. L., Steur, M., Allen, N. E., Appleby, P. N., Travis, R. C., & Key, T. J. (2010). Plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans: results from the EPIC–Oxford study. *Public Health Nutrition*, 14(2), 340–346. <https://doi.org/10.1017/S1368980010002454>

Danish Veterinary and Food Administration. (2017). Executive Order on the addition of vitamins and minerals to foods - retsinformation.dk. Retrieved May 2, 2018, from <https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=195030>

Darton-Hill, A. I., Neufeld, L., Vossenaar, M., Osendarp, S., & Martinez, H. (2017). Large-scale food fortification: An overview of trends and challenges in low-and middle-income countries in 2017. Micronutrient Forum. <https://doi.org/ISBN: 978-0-9959892-2-1>

Dekkers, A. L. M., Verkaik-Kloosterman, J., van Rossum, C. T. M., & Ocké, M. C. (2014). SPADE, a new statistical program to estimate habitual dietary intake from multiple food sources and dietary supplements. *The Journal of Nutrition*, 144(12), 2083–2091. <https://doi.org/10.3945/jn.114.191288>

Dekkers, A., Verkaik-Kloosterman, J., & Ocke, M. (2017). *SPADE: Statistical Program to Assess habitual Dietary Exposure User's manual (version 2.)*. RIVM.

DeLuca, H. F. (1978). Vitamin D. New York, USA: Plenum press.

Djekic-Ivankovic, M., Weiler, H. A., Nikolic, M., Kadvan, A., Gurinovic, M., Mandic, L. M., & Glibetic,

M. (2015). Validity of an FFQ assessing the Vitamin D intake of young Serbian women living in a region without food fortification: the method of triads model. *Public Health Nutrition*, 19(3), 437–445. <https://doi.org/10.1017/S136898001500138X>

Djekic-Ivankovic, M., Weiler, H., Jones, G., Kaufmann, M., Kaludjerovic, J., Aleksic-Velickovic, V., ... Glibetic, M. (2016). Vitamin D status in mothers with pre-eclampsia and their infants: a case–control study from Serbia, a country without a vitamin D fortification policy. *Public Health Nutrition*, (2), 1–11. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1017/S1368980016000409>

Drincic, A. T., Armas, L. A. G., Van Diest, E. E., & Heaney, R. P. (2012). Volumetric Dilution, Rather Than Sequestration Best Explains the Low Vitamin D Status of Obesity. *Obesity*, 20(7), 1444–1448. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.404>

Dwyer, J. T., Woteki, C., Bailey, R., Britten, P., Carriquiry, A., Gaine, P. C., ... Smith Edge, M. (2014). Fortification: New findings and implications. *Nutrition Reviews*, 72(2), 127–141. <https://doi.org/10.1111/nure.12086>

EFSA. (2014). Food Classification, FoodEx2 browsing tool.

EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA). (2016). Dietary reference values for vitamin D. *EFSA Journal*, 14(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4547>

EFSA Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, N. and A. (2006). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. *EFSA Journal*.

Escrivá, A., Esteve, M., Farré, R., & Frígola, A. (2002). Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography Analysis*, 947(2), 313–318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01618-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01618-1)

EuroFIR AISBL. (n.d.). EuroFIR HISTORY. Retrieved June 11, 2018, from [http://www.eurofir.org/about\\_eurofir/](http://www.eurofir.org/about_eurofir/)

EuroFIR ASIBL. (2011). FoorEXplorer. Retrieved June 12, 2018, from <http://www.eurofir.org/foodexplorer/login1.php>

European Commission. (2012). Guidance document for competent authorities for the control of compliance with EU legislation on food supplements with regard to the setting of tolerances for nutrient values declared on a label. Brussels.

European Commission. (2017). Commission implementing regulation (EU) 2017/ 1492 - of 21 August 2017 - concerning the authorisation of cholecalciferol as a feed additive for all animal species.

*Official Journal of the European Union*, L 216/19.

FAO. (2017a). *FAO/INFOODS Databases Analytical food composition database Version 2.0 – AnFood2.0 User guide*. (U. R. Charrondière, D. Rittenschober, F. Grande, V. Nowak, & B. Stadlmayr, Eds.). Rome, Italy: FAO.

FAO. (2017b). *FAO/INFOODS Global Food Composition Database for Pulses Version 1.0 - uPulses 1.0*. Retrieved from <http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/faoinfoods-databases/en/>

Finglas, P. M., Berry, R., & Astley, S. (2014). Assessing and improving the quality of food composition databases for nutrition and health applications in Europe: the contribution of EuroFIR. *Advances in Nutrition*, 5(5), 608S–614S. <https://doi.org/10.3945/AN.113.005470>

FINLEX®. (2002). Decree of the Ministry of Trade and Industry on the addition of vitamins and certain other substances to foods 917/2002. Helsinki: Oikeusministeriö.

Flynn, A., Hirvonen, T., Mensink, G. B. M., Ocké, M. C., Serra-Majem, L., Stos, K., ... Wildemann, T. (2009). Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food and Nutrition Research*, 53(SUPPL. 1).

<https://doi.org/10.3402/fnr.v53i0.2038>

Flynn, A., Moreiras, O., Stehle, P., Fletcher, R. J., Møller, D. J. G., & Rolland, V. (2003). Vitamins and minerals: A model for safe addition to foods. *European Journal of Nutrition*, 42(2), 118–130.

<https://doi.org/10.1007/s00394-003-0391-9>

Foss, Y. J. (2009). Vitamin D deficiency is the cause of common obesity. *Medical Hypotheses*, 72(3), 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.10.005>

Fredriksson, S., Elwinger, K., & Pickova, J. (2006). Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. *Food Chemistry*, 99(3), 530–537. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.08.018>

Fulgoni, V., Keast, D., Bailey, R., & Dwyer, J. (2011). Food, Fortificants, and Supplements: Where do Americans Get their Nutrients? *The Journal of Nutrition, Nutrient Requirements and Optimal*

*Nutrition*, 141, 1847–1854. <https://doi.org/10.3945/jn.111.142257>

Galvin, M. a, Kiely, M., & Flynn, A. (2003). Impact of ready-to-eat breakfast cereal (RTEBC) consumption on adequacy of micronutrient intakes and compliance with dietary recommendations in Irish adults. *Public Health Nutrition*, 6(4), 351–363. <https://doi.org/10.1079/PHN2002441>

Gomes, F. P., Shaw, P. N., Whitfield, K., Koorts, P., & Hewavitharana, A. K. (2013). Recent trends in the determination of vitamin D. *Bioanalysis*, 5(24), 3063–3078. <https://doi.org/10.4155/bio.13.283>

Grant, W. B., Cross, H. S., Garland, C. F., Gorham, E. D., Moan, J., Peterlik, M., ... Zittermann, A. (2009). Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 99(2–3), 104–113.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.02.003>

Grčević, M., Gajčević-Kralik, Z., Kralik, G., & Ivanković, S. (2011). Hen egg as functional food. *Krmiva, Zagreb*, 53(2), 93–100.

Greenfield, H., & Southgate, D. A. T. (2003). *Food Composition Data*. (B. A. Burlingame & U. R. Charrondiere, Eds.) (2nd ed.). Rome, Italy: FAO. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3544-7>

Gurinović, M., & Kadvan, A. (2011). Methodology of the dietary survey in YUSAD study. In S. I. Nedeljković (Ed.), *Yugoslav study of atherosclerosis precursors in schoolchildren in Serbia: twenty years follow-up* (Monograph, pp. 334–342). Belgrade: Medical Faculty, University of Belgrade, Serbia.

Gurinović, M., Kadvan, A., Bucchini, L., Matthys, C., Torres, D., Novaković, R., ... Glibetić, M. (2010). EURRECA nutritional planning and dietary assessment software tool: NutPlan. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64 Suppl 2(c), S38-42. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.59>

Gurinović, M., Milešević, J., Kadvan, A., Djekić-Ivanković, M., Debeljak-Martačić, J., Takić, M., ... Glibetić, M. (2016). Establishment and advances in the online Serbian food and recipe data base harmonized with EuroFIR™ standards. *Food Chemistry*, 193, 30–38.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.107>

Gurinović, M., Milešević, J., Kadvan, A., Nikolić, M., Zeković, M., Djekić-Ivanković, M., ... Glibetić, M. (2018). Development, features and application of DIET ASSESS & PLAN (DAP) software in supporting public health nutrition research in Central Eastern European Countries (CEEC). *Food Chemistry*, 238,

186–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.114>

Gurinović, M., Milešević, J., Novaković, R., Kadvan, A., Djekić-Ivanković, M., Šatalić, Z., ... Glibetić, M. (2016). Improving nutrition surveillance and public health research in Central and Eastern Europe/Balkan Countries using the Balkan Food Platform and dietary tools. *Food Chemistry*, *193*, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.103>

Hayes, A., & Cashman, K. D. (2016). Food-based solutions for vitamin D deficiency: putting policy into practice and the key role for research. *Proceedings of the Nutrition Society*, *25*(February 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0029665116000756>

Hayes, A., Duffy, S., O'grady, M., Jakobsen, J., Galvin, K., Teahan-Dillon, J., ... Cashman, K. D. (2016). Vitamin D-enhanced eggs are protective of wintertime serum 25-hydroxyvitamin D in a randomized controlled trial of adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, *104*(3), 629–637. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.132530>

Heaney, R. P. (2006). Symposium : Optimizing Vitamin D Intake for Populations with Special Needs : Barriers to Effective Food Fortification and Supplementation Barriers to Optimizing Vitamin D 3 Intake for the Elderly 1. *The Journal of Nutrition*, *136*(4), 1126–1129.

Hennessy, Á., Walton, J., & Flynn, A. (2013). The impact of voluntary food fortification on micronutrient intakes and status in European countries: a review. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *72*(4), 433–440. <https://doi.org/10.1017/S002966511300339X>

Hilger, J., Friedel, A., Herr, R., Rausch, T., Roos, F., Wahl, D. A., ... Hoffmann, K. (2014). A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *British Journal of Nutrition*, *111*(1), 23–45. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001840>

Hirvonen, T., Sinkko, H., Valsta, L., Hannila, M. L., & Pietinen, P. (2007). Development of a model for optimal food fortification: Vitamin D among adults in Finland. *European Journal of Nutrition*, *46*(5), 264–270. <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0660-0>

Holick, M. F., & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical Nutrition*, *87*(4), 1080S–1086S. <https://doi.org/87/4/1080S> [pii]

Huang, M., LaLuzerne, P., Winters, D., & Sullivan, D. (2009). Measurement of Vitamin D in Foods and

Nutritional Supplements by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 92(5), 1327–1335.

Ilicic, B., Stokic, E., Stošic, Z., Kojic, N. E., Katsiki, N., Mikhailidis, D. P., & Isenovic, E. R. (2017). Vitamin D status and circulating biomarkers of endothelial dysfunction and inflammation in non-diabetic obese individuals: A pilot study. *Archives of Medical Science*, 13(1), 53–60.  
<https://doi.org/10.5114/aoms.2016.61812>

IMACE. (2004). Code of practice on vitamin A and D fortification of margarines and fat spreads, (May), 1–7.

Itkonen, S. T., & Lamberg-Allardt, C. (2016). Food fortification as a means to increase vitamin D intake. *British Journal of Nutrition*, 25(1), 2–3. <https://doi.org/10.1017/S0007114516001227>

Itkonen, S. T., Skaffari, E., Saaristo, P., Saarnio, E. M., Erkkola, M., Jakobsen, J., ... Lamberg-Allardt, C. (2016). Effects of vitamin D2-fortified bread v. supplementation with vitamin D2 or D3 on serum 25-hydroxyvitamin D metabolites: an 8-week randomised-controlled trial in young adult Finnish women. *British Journal of Nutrition*, 115(7), 1232–1239.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114516000192>

Jääskeläinen, T., Itkonen, S. T., Lundqvist, A., Erkkola, M., Koskela, T., Lakkala, K., ... Lamberg-Allardt, C. (2017). The positive impact of general Vitamin D food fortification policy on Vitamin D status in a representative adult Finnish population: Evidence from an 11-y follow-up based on standardized 25-hydroxyVitamin D data. *American Journal of Clinical Nutrition*, 105(6), 1512–1520.  
<https://doi.org/10.3945/ajcn.116.151415>

Jakobsen, J., Bysted, A., Andersen, R., Bennett, T., Brot, C., Bügel, S., ... Ovesen, L. (2009). Vitamin D status assessed by a validated HPLC method: Within and between variation in subjects supplemented with vitamin D3. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 69(2), 190–197. <https://doi.org/10.1080/00365510802471570>

Jakobsen, J., Clausen, I., Leth, T., & Ovesen, L. (2004). A new method for the determination of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(6), 777–787. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.012>

Jakobsen, J., & Saxholt, E. (2009). Vitamin D metabolites in bovine milk and butter. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.01.010>

- Kaushik, R., Sachdeva, B., Arora, S., & Wadhwa, B. K. (2014). Development of an analytical protocol for the estimation of vitamin D<sub>2</sub> in fortified toned milk. *Food Chemistry*, *151*, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.085>
- Kiely, M., & Black, L. (2012). Dietary strategies to maintain adequacy of circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, *243*(Suppl 243), 14–23. <https://doi.org/10.3109/00365513.2012.681893>
- Kiely, M., Cashman, K. D., & Consortium, O. (2015). The ODIN project: Development of food-based approaches for prevention of vitamin D deficiency throughout life. *Nutrition Bulletin September*, *40*(3), 235–246. <https://doi.org/10.1111/nbu.12159>
- Kloosterman, J., Fransen, H. P., De Stoppelaar, J., Verhagen, H., & Rompelberg, C. (2007). Safe addition of vitamins and minerals to foods: Setting maximum levels for fortification in the Netherlands. *European Journal of Nutrition*, *46*(4), 220–229. <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0654-y>
- Koyyalamudi, S. R., Jeong, S.-C. C., Pang, G., Teal, A., & Biggs, T. (2011). Concentration of vitamin D<sub>2</sub> in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(7), 976–979. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.02.007>
- Krampitz, G. (1980). Vitamin D in animal nutrition. *Vitamin D in Animal Nutrition*. Basel: F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.
- Kühn, J., Schutkowski, A., Hirche, F., Baur, A. C., Mielenz, N., & Stangl, G. I. (2015). Non-linear increase of vitamin D content in eggs from chicks treated with increasing exposure times of ultraviolet light. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *148*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.015>
- Kutsky, R. J. (1973). *Handbook of vitamins and hormones. Handbook of vitamins and hormones*. Van Nostrand Reinhold Company.
- Laaksi, I. T., Ruohola, J.-P. S., Ylikomi, T. J., Auvinen, A., Haataja, R. I., Pihlajamäki, H. K., & Tuohimaa, P. J. (2006). Vitamin D fortification as public health policy: significant improvement in vitamin D status in young Finnish men. *European Journal of Clinical Nutrition*, *60*, 1035–1038. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602414>



- Lanham-New, S. A. (2008). Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2), 163–176. <https://doi.org/10.1017/S0029665108007003>
- Larson-Meyer, D. E., Ingold, B. C., Fensterseifer, S. R., Austin, K. J., Wechsler, P. J., Hollis, B. W., ... Alexander, B. M. (2017). Sun exposure in pigs increases the vitamin D nutritional quality of pork. *PLOS ONE*, 12(11), e0187877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187877>
- Lehtonen-Veromaa, M., Möttönen, T., Leino, A., Heinonen, O. J., Rautava, E., & Viikari, J. (2008). Prospective study on food fortification with vitamin D among adolescent females in Finland: Minor effects. *British Journal of Nutrition*, 100(2), 418–423. <https://doi.org/10.1017/S0007114508894469>
- Liu, J., Greenfield, H., & Fraser, D. R. (2014). An exploratory study of the content of vitamin D compounds in selected samples of Australian eggs. *Nutrition and Dietetics*, 71(1), 46–50. <https://doi.org/10.1111/1747-0080.12056>
- Madsen, K. H., Rasmussen, L. B., Andersen, R., Mølgaard, C., Jakobsen, J., Bjerrum, P. J., ... Tetens, I. (2013). Randomized controlled trial of the effects of vitamin D – fortified milk and bread on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in families in Denmark during winter : the VitmaD study 1 – 3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98, 374–382. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.059469.1>
- Manios, Y., Moschonis, G., Lambrinou, C. P., Mavrogianni, C., Tsigoti, L., Hoeller, U., ... Mathers, J. C. (2017). Associations of vitamin D status with dietary intakes and physical activity levels among adults from seven European countries: the Food4Me study · on behalf of the Food4Me Study. *European Journal of Nutrition*, 0(0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1415-1>
- Manios, Y., Moschonis, G., Mavrogianni, C., van den Heuvel, E., Singh-Povel, C. M., Kiely, M., & Cashman, K. D. (2017). Reduced-fat Gouda-type cheese enriched with vitamin D3 effectively prevents vitamin D deficiency during winter months in postmenopausal women in Greece. *European Journal of Nutrition*, 56(7), 2367–2377. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1277-y>
- Mattila, P. H., Piironen, V. I., Uusi-Rauva, E. J., & Koivistoinen, P. E. (1996). New analytical aspects of vitamin D in foods. *Food Chemistry*, 57(1), 95–99. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(96\)00144-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(96)00144-6)
- Mattila, P. H., Valkonen, E., & Valaja, J. (2011). Effect of different vitamin D supplementations in poultry feed on vitamin D content of eggs and chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8298–8303. <https://doi.org/10.1021/jf2012634>

- Mc Namara, C., Naddy, B., Rohan, D., & Sexton, J. (2003). Design, development and validation of software for modelling dietary exposure to food chemicals and nutrients. *Food Additives and Contaminants*, 20(Supplement 1), S8–S26. <https://doi.org/10.1080/0265203031000152460>
- McCance, R., & Widdowson, E. (1940). *The chemical composition of foods* (Medical Re). London, UK: HMSO.
- Milenković, S., Dimić, A., Stanković, A., Aleksić, I., & Petrović, D. (2010). Vitamin d status in women with postmenopausal osteoporosis. *Acta Medica Medianae*, 49(4), 16–18.
- Milešević, J., Samaniego, L., Kiely, M., Glibetić, M., Roe, M., & Finglas, P. (2018). Specialized food composition dataset for vitamin D content in foods based on European standards: Application to dietary intake assessment. *Food Chemistry*, 240, 544–549. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.135>
- Minister van Volksgezondheid, W. en S. (2007). Warenwetregeling vrijstelling toevoeging foliumzuur en vitamine D aan levensmiddelen.
- Mithal, A., Wahl, D. A., Bonjour, J. P., Burckhardt, P., Dawson-Hughes, B., Eisman, J. A., ... Morales-Torres, J. (2009). Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*, 20(11), 1807–1820. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0954-6>
- Moller, A., & Ireland, J. (2014). Languag. Roskilde: Danish Food Informatics (DFI).
- Mrabet, Y. (2018). Preparative HPLC apparatus scheme. Retrieved from <https://howlingpixel.com/en/Chromatography>
- Mulder, F. J., Vries, E. J. DE, & Borsje, B. (1971). Chemical analysis of vitamin D in concentrates and its problems. 12. Analysis of fat-soluble vitamins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 54(5), 1168–1174.
- National Nutrition Council. (2010). *Report of vitamin D working group (Valtion ravitsemusneuvottelukunta. D-vitamiinityöryhmän raportti)*.
- Natri, A.-M., Salo, P., Vikstedt, T., Palssa, A., Huttunen, M., Kärkkäinen, M. U. M., ... Lamberg-Allardt, C. J. (2006). Bread Fortified with Cholecalciferol Increases the Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentration in Women as Effectively as a Cholecalciferol Supplement. *The Journal of Nutrition*, 136(1), 123–127. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.123>

New, S. A. (1999). Bone health: the role of micronutrients. *British Medical Bulletin*, 55(3), 619–33.

<https://doi.org/10.1258/0007142991902501>

Nikolic, M., Milešević, J., Zekovic, M., Gurinovic, M., Glibetic, M., & ... (2018). The development and validation of food atlas for portion size estimation in the Balkan region. *Frontiers in Nutrition*, 5(78), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/FNUT.2018.00078>

Norwegian Food Safety Authority. (2012). How to market fortified food in Norway - The Norwegian Food Safety Authority.

Norwegian Scientific Committee for Food Safety. (2013). Assessment and updating of the fortification model from 2006.

Novakovic, R., Cavelaars, A. E. J. M., Bekkering, G. E., Glibetic, M., Nikolic, M., Roman-Vinas, B., ... Zvonimir, S. (2012). Micronutrient intake and status in Central and Eastern Europe compared with other European countries, results from the EURRECA network, 16(5), 824–840.

<https://doi.org/10.1017/S1368980012004077>

Nusser, S. M., Carriquiry, A. L., Dodd, K. W., & Fuller, W. A. (1996). A Semiparametric Transformation Approach to Estimating Usual Daily Intake Distributions. *Journal of the American Statistical Association*, 91(436), 1440–1449. <https://doi.org/10.1080/01621459.1996.10476712>

O'Donnell, S., Cranney, A., Horsley, T., Weiler, H. A., Atkinson, S. A., Hanley, D. A., & Sampson, M. (2008). Efficacy of food fortification on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations: systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1528–1534.

Pavlovic, M., Witthöft, C. M., Hollman, P., Hulshof, P. J. M., Glibetic, M., Porubska, J., ... Oshaug, A. (2009). Training and capacity building in central and eastern Europe through the EuroFIR and CEE networks. *Food Chemistry*, 113(3), 846–850. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.069>

Phillips, K. M., Craig Byrdwell, W., Exler, J., Harnly, J. M., Holden, J. M., Holick, M. F., ... Wolf, W. R. (2008). Development and validation of control materials for the measurement of vitamin D3 in selected US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(7), 527–534.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.05.003>

Pietinen, P., Männistö, S., Valsta, L. M., & Sarlio-Lähteenkorva, S. (2010). Nutrition policy in Finland. *Public Health Nutrition*, 13(6A), 901–906. <https://doi.org/10.1017/S1368980010001072>

Pigat, S., Connolly, A., Cushen, M., Cullen, M., & O'Mahony, C. (2018). A probabilistic intake model to estimate the impact of reformulation by the food industry among Irish consumers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 0(0), 1–8. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1438375>

Piirainen, T., Laitinen, K., & Isolauri, E. (2007). Impact of national fortification of fluid milks and margarines with vitamin D on dietary intake and serum 25-hydroxyvitamin D concentration in 4-year-old children. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(1), 123–128.

<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602506>

Pludowski, P., Grant, W. B., Bhattoa, H. P., Bayer, M., Povoroznyuk, V., Rudenka, E., ... Konstantynowicz, J. (2014). Vitamin D status in Central Europe. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/589587>

Povoroznyuk, V. V, Balatska, N. I., Muts, V. Y., Klymovytsky, F. V, & Synenky, O. V. (2012). *Vitamin D deficiency in Ukraine: A demographic and seasonal analysis*. *Gerontologija* (Vol. 13).

Purchas, R., Zou, M., Pearce, P., & Jackson, F. (2007). Concentrations of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in raw and cooked New Zealand beef and lamb. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.07.001>

Rasmussen, S. E., Andersen, N. L., Dragsted, L. O., & Larsen, J. C. (2006). A safe strategy for addition of vitamins and minerals to foods. *European Journal of Nutrition*, 45(3), 123–135.

<https://doi.org/10.1007/s00394-005-0580-9>

Reinert-Hartwall, L., Honkanen, J., Härkönen, T., Ilonen, J., Simell, O., Peet, A., ... Vaarala, O. (2014). No association between vitamin D and  $\beta$ -cell autoimmunity in Finnish and Estonian children. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 30(8), 749–760. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2550>

Roe, M., Pinchen, H., Church, S., & Finglas, P. (2013). *Nutrient analysis of eggs*.

Roman Viñas, B., Ribas Barba, L., Ngo, J., Gurinovic, M., Novakovic, R., Cavelaars, A., ... Serra Majem, L. (2011). Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 59(2–4), 84–95. <https://doi.org/10.1159/000332762>

Ross, A. C., Taylor, C. L., Yaktine, A. L., & Del, H. B. (2011). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. (Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Institute of Medicine: A. Catharine Ross, C. L., Taylor, A. L., Y. And, & H. B. Del Valle, Eds.), *Institute of Medicine*,

Washington DC (Vol. 32). Washington, D.C.: National Academy of Sciences.

<https://doi.org/10.17226/13050>

Sandmann, A., Brown, J., Mau, G., Saur, M., Amling, M., & Barvencik, F. (2015). Acceptance of vitamin D-fortified products in Germany - A representative consumer survey. *Food Quality and Preference*, 43, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.02.011>

Schmid, A., & Walther, B. (2013). Natural Vitamin D Content in Animal Products. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4(4), 453–462. <https://doi.org/10.3945/an.113.003780>

Sl. glasnik RS", br. 4/2010, 113/2012, 27/2014 i 25/2015). (2015). Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje. *Službeni Glasnik RS, Broj 25/2015 Od 13/03/2015*.

Sokolovic, S., Alimanovic-Alagic, R., Džananovic, L., Cavaljuga, & S., Beslic, N., & Ferhatbegovic-Opankovic, E. (2017). Vitamin D status in Bosnia and Herzegovina: the cross-sectional epidemiological analysis. *Osteoporosis International*, 28, 1021–1025.

<https://doi.org/10.1007/s00198-016-3831-0>

Spiro, A., & Buttriss, J. L. (2014). Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutrition Bulletin*, 39(4), 322–350. <https://doi.org/10.1111/nbu.12108>

Statutory Instrument No. 2182. (1997). The Foods Intended for Use in Energy Restricted Diets for Weight Reduction Regulations 1997. Queen's Printer of Acts of Parliament.

Statutory instrument no. 3116. (1995). The Spreadable Fats (Marketing Standards) Regulations 1995. HMSO. Queen's Printer of Acts of Parliament.

Statutory instrument No. 77. (1995). The Infant Formula and Follow-on Formula Regulations 1995. HMSO. Queen's Printer of Acts of Parliament.

Stokić, E., Kupusinac, A., Tomić-Naglić, D., Kovačev-Zavišić, B., Mitrović, M., Smiljenić, D., ... Isenović, E. (2015). Obesity and Vitamin D Deficiency: Trends to Promote a More Proatherogenic Cardiometabolic Risk Profile. *Angiology*, 66(3), 237–243.

<https://doi.org/10.1177/0003319714528569>

Strathmann, F. G., Laha, T. J., & Hoofnagle, A. N. (2011). Quantification of 1,25-dihydroxy vitamin D by immunoextraction and liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 57(9), 1279–1285. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.161174>

Strobel, N., Buddhadasa, S., Adorno, P., Stockham, K., & Greenfield, H. (2013). Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D determination in meats by LC-IT-MS. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1042–1047.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.041>

Swedish Food Administration. (2018). LIVSFS 2018: 5. Retrieved May 5, 2018, from

<https://www.livsmedelsverket.se/om-oss/lagstiftning1/gallande-lagstiftning/livsfs-20185>

Tangpricha, V., Koutkia, P., Rieke, S. M., Chen, T. C., Perez, A. A., & Holick, M. F. (2003). Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1478–1483. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1478>

The European Parliament, & Council of The European Union. (2006). Regulation (EC) No. 1925/2006 of the European Parliament and the Council of 20 December 2006 on the addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods. *Official Journal of the European Union*, L 404/26(1925), 26–38.

Välimäki, V.-V., Löyttyniemi, E., & Välimäki, M. (2007). Vitamin D fortification of milk products does not resolve hypovitaminosis D in young Finnish men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 493–497. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602550>

Verkaik-Kloosterman, J., Seves, S. M., & Ocké, M. C. (2017). Vitamin D concentrations in fortified foods and dietary supplements intended for infants: Implications for vitamin D intake. *Food Chemistry*, 221, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.128>

Vieille, S. La, Marchelli, R., Martin, A., Naska, A., Neuhäuser-berthold, M., Turck, D., & Hans, V. (2015). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. *EFSA Journal*, 13(5:4104).

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4101>

Vimaleswaran, K. S., Berry, D. J., Lu, C., Tikkanen, E., Pilz, S., Hiraki, L. T., ... Collins, F. S. (2013). Causal Relationship between Obesity and Vitamin D Status: Bi-Directional Mendelian Randomization Analysis of Multiple Cohorts. *PLoS Medicine*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001383>

Wacker, M., & Holick, M. F. (2013). Vitamin D-effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients*, 5(1), 111–148. <https://doi.org/10.3390/nu5010111>

Wahl, D. A., Cooper, C., Ebeling, P. R., Eggersdorfer, M., Hilger, J., Hoffmann, K., ... Dawson-Hughes, B. (2012). A global representation of vitamin D status in healthy populations. *Archives of*

*Osteoporosis*, 7(1–2), 155–172. <https://doi.org/10.1007/s11657-012-0093-0>

Wilson, N., & Shah, N. P. (2007). Microencapsulation of vitamins. *International Food Research Journal*, 14(1), 1–14.

Yang, L. (2013). *Investigation of vitamin D3 content in fortified fluid milk and the stability of vitamin D3 in milk to light exposure*. The University of British Columbia.

