

Optimizacija metode ekstrakcije vitamina E iz realnih uzoraka

Pritišanac, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:734859>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ivan Pritišanac

Optimizacija metode ekstrakcije vitamina E iz realnih uzoraka

Završni rad

Mentorica: doc.dr.sc. Olivera Galović

Neposredna voditeljica: dr.sc. Manuela Košević

Osijek, 2022.

SAŽETAK:

U ovome završnom radu je određivan sadržaj vitamina E u uzorcima hrane za nesilice korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Ispitivan je utjecaj promjene različitih parametara kao što su sastav ekstrakcijske smjese, omjer suhe tvari i ekstrakcijske smjese i veličina čestica uzorka na određivanje sadržaja vitamina E u realnim uzorcima. Za ekstrakciju je upotrebljena već korištena metoda. Ekstrakcija je uspješnija korištenjem usitnjene hrane za nesilice, jer je veća aktivna površina i može se ekstrahirati više vitamina E. Najviše vitamina E ekstrahirano je kada je omjer suhe tvari i ekstrakcijske smjese 1:50 uz izmijenjeni sastav ekstrakcijske smjese (u odnosu na sastav ekstrakcijske smjese u već korištenoj metodi) - 5 mL 0.2 %-tne otopine BHT (*2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol*) u metanolu, 5 mL 40%-tne otopine kalijeva hidroksida u metanolu, 5 mL ultračiste vode te 10 mL otopine heksana i etil-acetata u omjeru 65:35.

KLJUČNE RIJEČI: vitamin E, hrana za nesilice, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, ekstrakcija, optimiranje

ABSTRACT:

In this final paper, the content of vitamin E in food samples for laying hens was determined by using high-performance liquid chromatography. The impact of changing various parameters such as the composition of the extraction mixture, the ratio of dry matter to the extraction mixture and the size of the sample particles on the determination of the vitamin E content in real samples was examined. The already known method was used for extraction. Extraction is more successful using shredded feed for laying hens, because the active surface is larger and more vitamin E can be extracted. The most vitamin E was extracted when the ratio of dry matter to the extraction mixture was 1:50 with a changed composition of the extraction mixture (compared to the composition of the extraction mixture in the already used method) - 5 mL of a 0.2% BHT solution (*2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol*) in methanol, 5 mL of a 40% solution of potassium hydroxide in methanol, 5 mL of ultrapure water and 10 mL of a solution of hexane and ethyl acetate in a ratio of 65:35.

KEY WORDS: vitamin E, feed for laying hens, high resolution liquid chromatography, extraction, optimization

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

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Vitamin E	2
2.1.1. Opće karakteristike vitamina E	2
2.1.2. Struktura vitamina E	3
2.1.3. Fizikalna svojstva vitamina E	4
2.1.4. Djelovanje na čovjekovo zdravlje	5
2.1.5. Nedostatak vitamina E	7
2.1.6. Izvori vitamina E	8
2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	9
2.2.1. Princip rada	9
2.2.2. Dijelovi HPLC-a	10
2.2.3. Primjena HPLC-a	12
2.3. Sastav hrane za nesilice	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Pribor	14
3.2. Kemikalije	15
3.3. Instrumentacija	15
3.4. Uzorci za analizu	17
3.5. Priprema otopina	18
3.6. Analiza realnih uzoraka	19
3.6.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu	19
3.6.2. Priprema HPLC-a	21
3.7. Optimirani parametri ekstrakcije	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Vitamini su esencijalni spojevi koje organizam treba za pravilan rast i razvoj. Organizam nema sposobnost sinteze vitamina, već je vitamine potrebno unositi prehranom. Izvor vitamina su najčešće biljke, stoga je pravilna i raznolika prehrana jedan od temeljnih preuvjeta za održavanje zdravlja čovjeka i mogućnosti obavljanja raznih funkcija. Vitamini se mogu primjenjivati i u obliku kapsula te tako nadomjestiti manjak određenog vitamina u tijelu. Promatrajući način ishrane čovjeka danas, može se uočiti kako pileće meso predstavlja jedan od najčešće upotrebljivanih mesnih proizvoda, dok se jaja smatraju izvrsnim izvorom različitih nutrijenata. Sastav hrane kojom se hrane nesilice utječe na sadržaj određenih nutrijenata u mesu i jajima, a samim time i na količinu nutrijenata koju čovjek unosi u svoj organizam. Upravo iz tog razloga je važno biti upoznat sa sadržajem, primjerice vitamina, u hrani za nesilice jer se tako može procijeniti količina vitamina unesena u organizam. U ovome radu određivan je sadržaj vitamina E u hrani za nesilice promjenom parametara ekstrakcije već korištene metode ekstrakcije. Mijenjanjem parametara ekstrakcije prilikom određivanja sadržaja vitamina E u uzorcima omogućuje se optimiranje metode i određivanje parametara u svrhu ekstrahiranja što većeg sadržaja vitamina E. Cilj ovog završnog rada je optimirati već korištenu metodu kojom će se ekstrahirati najviše vitamina E iz uzorka hrane za nesilice, a sadržaj vitamina E odredit će se pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vitamin E

2.1.1. Opće karakteristike vitamina E

Vitamini su kemijski spojevi neophodni za život i normalno funkcioniranje organizma. Čovjeku je potrebna izrazito mala količina vitamina za zadovoljavanje metaboličkih procesa [1]. Jedna od funkcija vitamina je uloga bioloških katalizatora, jer reguliraju odvijanje pojedinih reakcija u tijelu pa samim time utječu na razvoj organizma. Ne koriste se kao izvori energije ili gradivne komponente tkiva, već za regulaciju fizioloških procesa [2]. Ljudski organizam nema sposobnost sinteze vitamina, već ih u organizam unosi putem prehrane. Vitamini se dijele s obzirom na topljivost pa tako razlikujemo vitamine topljive u vodi i vitamine topljive u mastima. Vitamin E pripada skupini vitamina topljivih u mastima. Budući da se vitamini topljivi u vodi uklanjaju iz organizma putem bubrega, suvišak vitamina E se nakuplja u tijelu i tako može izazvati određene, bilo pozitivne ili negativne, efekte na čovjekovo zdravlje [1].

Vitamin E je otkriven 1922. godine, a otkrili su ga Herbert Evans i Katherine Bishop izoliranjem iz zelenog lisnatog povrća [3]. Prvobitno je nazvan „faktor X“, odnosno „faktor antisterilnosti“, zbog njegove uloge u procesu reprodukcije štakora. 1924. godine uveden je naziv „vitamin E“. 1936. godine vitamin E je izoliran iz ulja pšeničnih klica i nazvan je „ α -tokoferol“. Danas je poznato kako skupini vitamina E pripada 8 izomera [4]. Tokotrienoli su otkriveni 1964. godine [3].

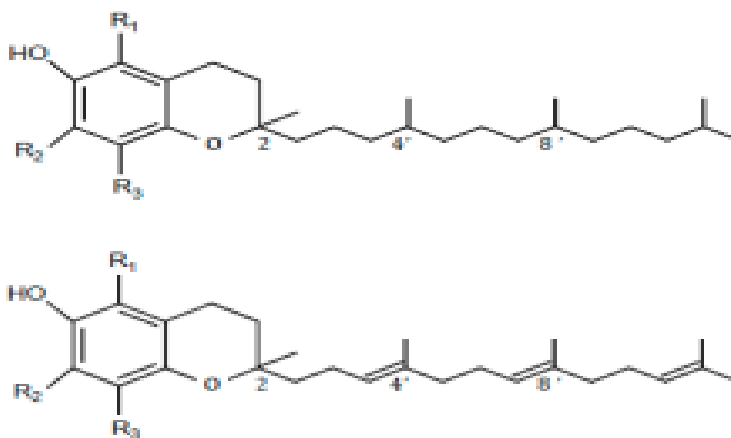
Pojam vitamin E je naziv za skupinu spojeva koju čine tokoferoli i tokotrienoli. Razlikujemo 4 tokoferola i 4 tokotrienola. Grupi tokoferola pripadaju α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol i δ -tokoferol, dok grupu tokotrienola čine α -tokotrienol, β -tokotrienol, γ -tokotrienol i δ -tokotrienol [5].

2.1.2. Struktura vitamina E

Budući da skupinu vitamina E čine dvije skupine spojeva, tokoferoli i tokotrienoli, oni se uvelike razlikuju po svojim fizikalnim svojstima. Sličnost ovih skupina spojeva je kromanolni prsten (kroman-6-ol), koji predstavlja strukturnu komponentu obe skupine. Na kroman-6-ol može biti vezan zasićeni izoprenoidni lanac građen od 16 ugljikovih atoma i tako nastaje tokoferol. Ukoliko je na kroman-6-ol vezan nezasićeni izoprenoidni lanac od 16 ugljikovih atoma, tada se on naziva tokotrienol [6].

Temeljna razlika u strukturama tokoferola i tokotrienola je broj dvostrukih veza, što utječe na fizikalna svojstva ovih spojeva. Tokoferoli u svojoj strukturi nemaju nijednu dvostruku vezu, dok tokotrienole karakteriziraju tri dvostruke veze trans konfiguracije (Slika 1.) [6].

Nadalje, strukturnu razliku predstavljaju broj i položaji vodikovih atoma i metilnih skupina na kromanolnom prstenu (Tablica 1.). Prirodni tokoferoli su optički aktivni i, stereokemijski gledano, imaju RRR konfiguraciju. Sintetski proizvedeni tokoferoli su mješavine 8 stereoizomera (RRR, RSR, RRS, RSS, SRR, SSR, SRS, SSS), jer u strukturi postoje 3 asimetrična ugljikova atoma [7].



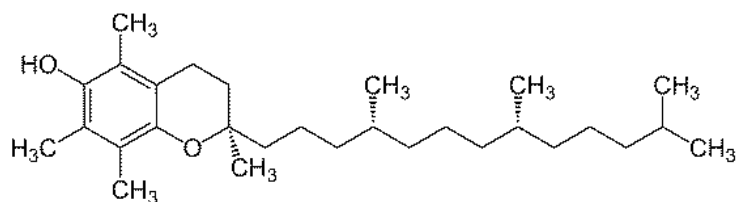
Slika 1. Strukturne razlike tokotrienola i tokoferola [7]

Tablica 1. Supstituenti tokoferola [8]

<u>Tokoferol</u>	R₁	R₂	R₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

Najpoznatiji od spojeva vitamina E je α -tokoferol (Slika 2.), stoga se pojam vitamin E najčešće odnosi upravo na α -tokoferol. Pokazuje izrazitu biološku aktivnost i zato je vrlo primjenjiv. Nalazi se u tkivima, plazmi čovjeka i koštanoj srži, a nedostatak α -tokoferola može izazvati ozbiljne posljedice na čovjekovo zdravlje [6].

Fenolna skupina tokoferola reagira s organskim peroksilnim radikalima kako bi nastali odgovarajući organski hidroperoksidi i tokoferoksilni radikali, koji se metaboliziraju i uklanjaju iz organizma [8].



Slika 2. Strukturna formula α -tokoferola [9]

2.1.3. Fizikalna svojstva vitamina E

Vitamin E je nepolaran organski spoj koji je pri sobnoj temperaturi žuta viskozna tvar, nalik na ulje. Lako se oksidira ukoliko je izložen svjetlu, kisiku ili ionima prijelaznih metala. Netopljiv je u vodi, etanolu i drugim polarnim otapalima. Zbog nepolarnog karaktera, topljiv je u biljnim uljima i organskim otapalima. Molekule vitamina E su amfipatske molekule. Hidroksilna skupina kromanolnog prstena je polarna i hidrofilna, dok je izoprenoidni bočni lanac lipofilan. Izoprenoidni lanac omogućava vitaminu E apsorpciju u masna tkiva, mozak i jetru te efikasniji transport staničnim membranama [3].

2.1.4. Djelovanje na čovjekovo zdravlje

Kako bi se shvatila učinkovitost vitamina E na redoks reakcije u organizmu, važno je razumijeti metabolizam prehrambenih izvora vitamina E. Primjena vitamina E oralnim putem rezultira stvaranjem micela s fosfolipidima, žučnim solima ili kolesterolom, kako bi se vitamin E mogao transportirati do lumena crijeva i ondje apsorbirati. Dobiveni hilomikronski oblik vitamina E cirkulira tijelom putem limfnog sustava. Vitamin E se nakuplja u masnom tkivu, kostima, jetri, mišićima i mozgu. Izomer α -tokoferol putem prijenosnog proteina putuje iz jetre u krvotok. U krvotoku ga lipoproteini vrlo niske gustoće (eng. *Very Low-Density Lipoprotein*, VLDL) prenose do ciljnih organa [4].

Aktivnost vitamina E u organizmu se povećava u dva slučaja. Prvi slučaj je primaran, kada vitamin E vezan na proteine djeluje kao esencijalni kofaktor u redoks reakcijama koje se odvijaju u tijelu. Sekundarnu aktivnost predstavlja aktivacija akumuliranog vitamina E u slučaju nedostatka redoks-aktivnih molekula koje sudjeluju u sprječavanju oksidacije lipida i širenja produkata oksidacije koji mogu izazvati štetne učinke u organizmu. U uklanjanju reaktivnih vrsta vitamin E djeluje sinergistički s vitaminom C. Budući da je vitamin E neophodan za normalnu funkciju organizma, često se koristi u proizvodima za njegu kože. Brojni eksperimentalni dokazi upućuju na činjenicu da lokalna primjena vitamina E djeluje antitumorski, stabilizira kožnu barijeru te potiče fotozaštitna svojstva [10].

Vitamin E ima važnu ulogu u sprječavanju ateroskleroze. Ateroskleroza se uobičajeno definira kao pojava nakupljanja plakova u stijenkama arterija. Smanjuje se protok krvi, dolazi do pojave ugrušaka i to je glavni uzrok moždanog udara i srčanih bolesti. Na pojavu ateroskleroze mogu utjecati genetski ili okolišni čimbenici. Dolazi do povećanja koncentracije lipoproteina niske gustoće (eng. *Low-Density Lipoprotein*, LDL), a smanjenja koncentracije lipoproteina visoke gustoće (eng. *High-Density Lipoprotein*, HDL). Simptomi su visok krvni tlak i dijabetes. Treba izbjegavati prehranu bogatu mastima i pušenje [11].

Starenjem dolazi do propadanja stražnje mrežnice oka i to može uzrokovati gubitak vida. Vitamin E kao antioksidans može pomoći u sprječavanju sljepoće. U kombinaciji s cinkom, vitamin E usporava razvoj degeneracije oka kod ljudi [12].

Provedena su brojna istraživanja kako bi se istražio utjecaj vitamina E na liječenje Alzheimerove bolesti. Proučavan je utjecaj vitamina E na usporavanje pada kognitivnih funkcija koje su uočljive kod Alzheimerove bolesti. Zaključeno je kako vitamin E nema nikakav utjecaj na smanjenje simptoma koji nastaju kao posljedica Alzheimerove bolesti [12].

Najvažnija uloga vitamina E je antioksidacijsko djelovanje. Jedan je od najjačih antioksidansa, a to svojstvo proizlazi iz hidroksilne skupine kromanolnog prstena. Reaktivna fenolna skupina može donirati vodik za neutralizaciju slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta, prevodeći ih u stabilnije spojeve. Na taj način aktivno inhibira pojavu oksidacijskog stresa. Slobodni radikali nastaju peroksidacijom lipida te slobodni peroksilni radikali mogu napasti staničnu membranu i tako ona gubi svoju funkciju. Proces peroksidacije lipida je najčešći uzrok bolesti srca i krvožilnog sustava, kao i povećanja koncentracije kolesterola u krvi. Antioksidacijsko djelovanje vitamina E očituje se i u reakciji s reaktivnim dušikovim vrstama (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS), poput dušikova oksida i dušikova dioksida [3].

Dijabetes je bolest uzrokovana visokim razinama glukoze u krvi, a nastaje kao posljedica oksidativnog stresa u tijelu. Dokazano je da unos vitamina E u tijelo putem prehrane smanjuje rizik od pojave dijabetesa. Dolazi do smanjenja ukupne količine kolesterola i lipida u tijelu [3].

Svi izomeri vitamina E pokazuju protuupalno djelovanje tako da inhibiraju uzročnike upale. Mogu inhibirati napredovanje staničnog ciklusa i tako inducirati apoptozu [6].

Apsorpcija vitamina E iz crijeva ovisi o aktivnosti gušterače, lučenju žuči i stvaranju micela. Uvjeti za apsorpciju su emulzifikacija sa žučnim solima, solubilizacija, unos u enterocite gdje se vitamin E ugrađuje u hilomikrone te izlučivanje vitamina E putem limfnog sustava. U prerađenoj hrani su prisutni esteri tokoferola, koji se moraju hidrolizirati u tankom crijevu prije apsorpcije [5].

2.1.5. Nedostatak vitamina E

Nedostatak vitamina E u tijelu može biti uzrokovan nepravilnom prehranom. Ukoliko prehrana ne zadovoljava potrebnu količinu vitamina E, organizam ne može optimalno funkcionirati i zadovoljiti svoje potrebe. Može se liječiti uvođenjem hrane bogate vitaminom E u prehranu ili primjenom vitamina E u obliku kapsula kako bi se nadomjestilo nedostatak. Nedostatak jednog vitamina često je povezan s nedostatkom nekog drugog vitamina ili minerala poput zinka, željeza i kalcija [2].

Nedostatak izaziva oštećenje staničnih membrana, a može doći i do prodiranja sadržaja stanice u vanjske tekućine. Enzimi poput kreatin-kinaza i piruvat-kinaza mogu iz mišića doći u plazmu te na taj način mišićima nije osigurana dovoljna energija za rad [5].

Budući da procesom lipidne peroksidacije nastaju slobodni radikali koje uklanja vitamin E, nedostatak vitamina E povećava koncentraciju peroksilnih radikala u plazmi čovjeka i uzrokuje hemolizu eritrocita. Dolazi do oksidacije lipoproteina, što uzrokuje pojavu ateroskleroze i začepljenje krvnih žila [5].

Manjak vitamina E u organizmu često se javlja kod beba koje su rođene ranije od predviđenog termina. Stoga je potrebno uvesti dopunu vitamina E [12].

Ostale bolesti koje mogu biti posljedica nedostatka vitamina E su Crohnova bolest, cistična fibroza, problemi s jetrom i nepravilan rad žučnog mjehura [12].

2.1.6. Izvori vitamina E

Glavni izvori vitamina E su biljke. Sastojak je raznih sjemenki, orašastih plodova, biljnih ulja, kukuruza, soje, voća i zelenog povrća poput špinata i brokule (Slika 3.). Također se nalazi u pšeničnim klicama i maslacu od kikirikija [12]. Vitamin E je sastojak avokada, lješnjaka, badema, suncokreta, maka, origana, sezama, pistacija i malina. Nalazi se u žitaricama poput ječma, raži, riže, zobi i pšenice u obliku tokotrienola [3]. Vitamin E se može pronaći u plodovima mora, siru i jajima [4]. Nalazi se u mahunarkama, mliječnim proizvodima, palminom ulju i kokosu [5].

Vrlo je važna antioksidativna uloga vitamina E, odnosno α -tokoferola, u kloroplastima biljaka. Osim u lišću, antioksidacijsko djelovanje vitamina E je uočeno u cvjetovima i plodovima biljaka [13].

Industrijski se dodaje kao sastojak hrani kojom se hrane životinje domaćeg uzgoja. Primjer toga je hrana za nesilice, što omogućava visok udio vitamina E u jajima. Na taj način čovjek također unosi vitamin E u svoj organizam.



Slika 3. Izvori vitamina E [14]

2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) je kromatografska tehnika koja služi za identifikaciju, razdvajanje i kvantifikaciju kemijskih spojeva iz uzorka složenog sastava. Sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti se sastoji od mobilne faze, stacionarne faze i detektora koji identificira željenu komponentu tokom analize [15].

2.2.1. Princip rada

Rad HPLC-a temelji se na protoku mobilne faze, koja je tekućina i u kojoj se nalazi uzorak, kroz stacionarnu fazu primjenom visokog tlaka. Mobilna faza se sastoji od dva otapala, dok je stacionarna faza čvrsta kolona kroz koju prolazi uzorak i koja je ispunjena određenim punilom. Komponente analita se odvajaju na temelju različite polarnosti i zato je za svaku komponentu analita karakteristično vlastito vrijeme zadržavanja. Za efikasno odvajanje komponenti, potrebno je postaviti posebne uvjete poput tlaka, pripreme kolone, stalne brzine protoka mobilne faze, pravilne pripreme uzorka i kalibracije [15].

Za uspostavljanje stanja ravnoteže, potrebno je nekoliko puta isprati kolonu. Ispiranje traje nekoliko minuta, a postupak se provodi pomoću mobilne faze [15].

U sustavu se ne smiju pojaviti mjehurići zraka, jer ometaju rad sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Ukoliko su prisutni mjehurići zraka, prije analize potrebno ih je ukloniti [15].

2.2.2. Dijelovi HPLC-a

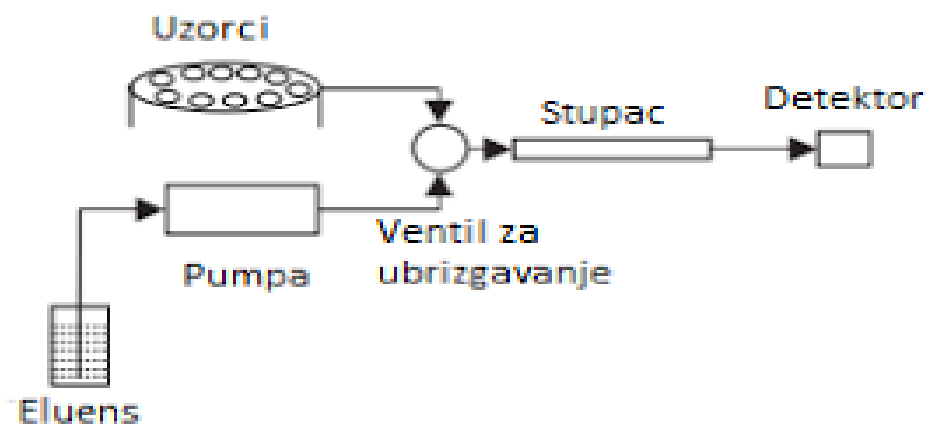
HPLC uređaj je građen od pumpe, ubrizgavača, spremišta za otapalo, uzorka, kolone i detektora (Slika 4.) [16].

Pumpa je dio uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti koji stvara visoki tlak unutar kolone i tako čini metodu preciznom i osjetljivom. Visok tlak omogućava prolazak otapala kroz gustu kolonu. Gustoća kolone utječe na efikasnost razdvajanja pojedinih komponenata smjese za analizu. Pumpa mora biti građena tako da može stvoriti tlak dovoljan za pravilan rad kolone, treba biti prikladna za različita otapala, generirati konstantan tlak bez značajnijih odstupanja, održavati stalnu brzinu protoka mobilne faze i biti jednostavna za upotrebu. HPLC pumpe dijelimo na klipne pumpe, pneumatske pumpe i pumpe nalika na špricu [16].

Ubrizgavač je dio HPLC-a koji osigurava dovod tekućeg uzorka u mobilnu fazu koja putuje kolonom. Izrađen je tako da pravilno i oprezno injektira uzorak u mobilnu fazu, pazeći na preciznost zbog vrlo visokog tlaka. Injektiranje uzorka odvija se uz pomoć autoinjektora, ali može se izvesti i ručno. Zadatak ubrizgavača je osigurati jednaki volumen svih uzoraka za analizu, spriječiti stvaranje i dovođenje mjehurića zraka koji ometaju očitavanje konačnih rezultata te injektirati uzorak tek onda kada je protok mobilne faze stalan i tlak održan konstantnim. Temeljne vrste ubrizgavača su Rheodyne ubrizgavač i vanjska šprica za ubrizgavanje koja se naziva Hamiltonova šprica [16].

Kolona je sastavnica HPLC uređaja čija je uloga razdvajanje komponenti uzorka primjenom različitih parametara. Građena je od metalne cijevi koja predstavlja kučište i ispunjena je vrlo malim kuglicama. Sastavnice uzorka stvaraju interakcije s česticama kolone i tako različitim brzinama putuju kroz kolonu. Na temelju toga, svaku komponentu uzorka karakterizira različito retencijsko vrijeme. U koloni mora biti i filter koji će osigurati prolazak mobilne faze, a spriječiti prolazak kuglica matriksa. Kolone se mogu podijeliti u nekoliko skupina, a to su monolitne kolone, kolona normalne faze, kolona obrnute faze, kolona isključenjem po veličini, kolona ionske zamjene i bio-sklona kolona [16].

Detektor je dio sustava tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti čija je uloga otkrivanje sastojaka smjese koji su izdvojeni iz kolone. Detektira komponente tek kada izađu iz kolone i pretvara analizirani podatak u električni signal. Karakteristike detektora su velika osjetljivost, stabilnost, pristupačna cijena, brzi odziv, jednostavnost prilikom upotrebe i neosjetljivost na visoke temperature [16].



Slika 4. Dijelovi HPLC-a [17]

2.2.3. Primjena HPLC-a

HPLC se primjenjuje u brojnim istraživanjima danas i predstavlja vrlo učinkovitu i pouzdanu tehniku kvalitativnog i kvantitativnog određivanja sastava nekog uzorka. Koristi se za dokazivanje prisutnosti neke supstance u uzorku ili količine neke tvari u uzorku za analizu. Primjenjuje se u biokemiji, forenzici, zaštiti okoliša, kliničkim pretragama i farmaciji. U kliničkim pretragama, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se koristi u svrhu analize lijekova i određivanja količine pojedine supstance u određenom lijeku [15]. U forenzici se HPLC koristi za analizu tkanina i bojila. U zaštiti okoliša, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti pronalazi svoju primjenu u analizi vode, stijena i drugih prirodnih izvora u svrhu očuvanja okoliša.

Primjena HPLC-a je česta u analitičkoj kemiji pri identifikaciji uzoraka. Uređajem treba upravljati stručno osposobljena osoba, jer je postavljanje uvjeta rada vrlo kompleksno. Uređaj je skup i potrebno je vremena za ispravljanje pogrešaka koji su nepredvidive. Potrebno je identificirati varijable, odnosno uvjete analize i kontrolirati sustav prilikom rada [18].

2.3. Sastav hrane za nesilice

Hrana za nesilice je proizvod vrlo kompleksnog sastava koji se koristi prilikom uzgoja nesilica. Izvor je svih potrebnih tvari za očuvanje zdravlja nesilica i njihov pravilan rast i razvoj. Smeđe je boje, sastavljena od krupnih zrna i prethodno obrađena. U sastav hrane za nesilice ulaze proteini, vlakna, masti, aminokiseline (metionin, lizin, treonin, cistein), vitamin E, natrij, željezo, klor, kalcij, kalij i fosfor. Sastavljena je od zrnaca kukuruza, pšenice, soje, ječma, sjemenki suncokreta, kalcijeva karbonata i zobi. Osigurava nesilicama dovoljnu količinu potrebnih nutrijenata primjenom hrane za nesilice u malim dozama [19].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Pribor

- odmjerna tikvica (50 mL, 100 mL, 500 mL)
- staklena bočica (50 mL, 10 mL, 5 mL) s plastičnim čepom
- pipeta (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL)
- propipeta
- menzura (100 mL)
- reagens bočice
- štrcaljka (2 mL)
- filter (0.45 μm)
- špatula
- plastična žlica
- kapalice
- mikropipeta (1000 μL)
- HPLC vialice

3.2. Kemikalije

- 0.2 %-tni 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) u metanolu
- 40 %-tni kalijev hidroksid (KOH) u metanolu
- ultračista voda
- heksan
- etil-acetat
- metanol
- bezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4)
- propan-2-ol

3.3. Instrumentacija

- analitička vaga (Slika 5.)
- laboratorijska tresilica
- uređaj za ultračistu vodu
- vodena kupelj (Slika 6.)
- rotacijski uparivač (Slika 7.)
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)



Slika 5. Analitička vaga



Slika 6. Vodena kupelj



Slika 7. Rotacijski uparivač

3.4. Uzorci za analizu

Prilikom svih analiza korišteni su uzorci hrane za nesilice (Slika 8.) bez ikakvih dodatnih sastojaka.



Slika 8. Uzorci hrane za nesilice

3.5. Priprema otopina

Priprema 40 %-tne otopine kalijeva hidroksida (KOH) u metanolu:

Za pripremu 40 %-tne otopine KOH u metanolu potrebno je izvagati 31.68 g kalijeva hidroksida na analitičkoj vagi. Kruti uzorak se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL. U tikvicu se polagano dodaje čisti metanol uz miješanje jer je otapanje vrlo egzotermno. Odmjerna tikvica se ispuni metanolom do oznake.

Priprema 0.2 %-tne otopine BHT u metanolu:

Za pripremu 0.2 %-tne otopine BHT u metanolu potrebno je na analitičkoj vagi izvagati 0.0789 g BHT. Izvagana krutina se prebaci u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni čistim metanolom do oznake. Sadržaj se promiješa i prebaci u reagens bocu (Slika 9.).

Priprema otopine heksan : etil-acetat:

Za pripremu otopine heksan : etil-acetat u omjeru 85:15 je potrebno u odmjernu tikvicu od 100 mL dodati 85 mL heksana i 15 mL etil-acetata i sadržaj promiješati. Prilikom pripreme otopine heksan : etil-acetat u omjeru 65:35 je potrebno u odmjernu tikvicu od 100 mL dodati 65 mL heksana i 35 mL etil-acetata i sadržaj promiješati.

Priprema mobilne faze:

Za pripremu mobilne faze potrebno je pripremiti otopinu propan-2-ol : metanol u omjeru 45:55. U odmjernu tikvicu od 500 mL se doda 225 mL propan-2-ola i 275 mL metanola te se sadržaj promiješa.

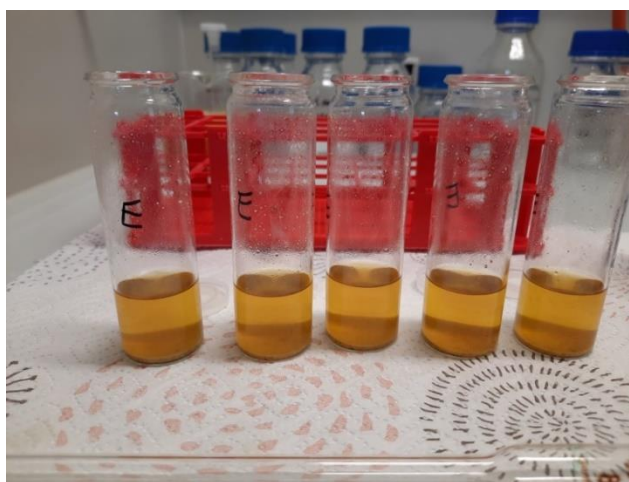


Slika 9. Pripremljene otopine za analizu

3.6. Analiza realnih uzoraka

3.6.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu

Za pripremu uzoraka za analizu korištena je ranije opisana metoda. [20] Na analitičkoj vagi se izvaže 5 g uzorka hrane za nesilice i prebaci u staklenu bočicu od 50 mL. U staklenu bočicu s uzorkom se doda 5 mL 0.2 %-tne otopine BHT u metanolu, 5 mL 40 %-tne otopine KOH u metanolu i 5 mL ultračiste vode. Bočica se zatvori plastičnim čepom i sadržaj se izmiješa na laboratorijskoj tresilici te zagrijava u vodenu kupelj 20 minuta na temperaturi od 50 °C. Nakon zagrijavanja sadržaj se hladi 30 minuta u mračnom prostoru. Potom se u staklenu bočicu pipetom doda 10 mL otopine heksan : etil-acetat = 85:15, sadržaj se izmiješa na laboratorijskoj tresilici i ostavi stajati u mraku 30 minuta kako bi se odijelili slojevi. Dio gornjeg organskog sloja se prebaci u staklenu bočicu i špatulom se doda bezvodni natrijev sulfat kako bi se uklonio višak vode. Tako odvojeni organski sloj se pomoću plastične štrcaljke i filtera čije su pore 0.45 µm profiltrira u drugu staklenu bočicu. Pipetom se 1 mL uzorka prenese u sljedeću staklenu bočicu i uparava pod sniženim tlakom 3 minute na rotacijskom uparivaču pri temperaturi od 55 °C. Nakon uparavanja, uzorku je potrebno dodati 1 mL čistog metanola i sadržaj promućkati. Mikropipetom se uzorak prebaci u vialicu i uzorak je spreman za analizu pomoću HPLC-a. Na slikama 10 – 14 prikazan je opisani postupak pripreme pripreme uzoraka za analizu.



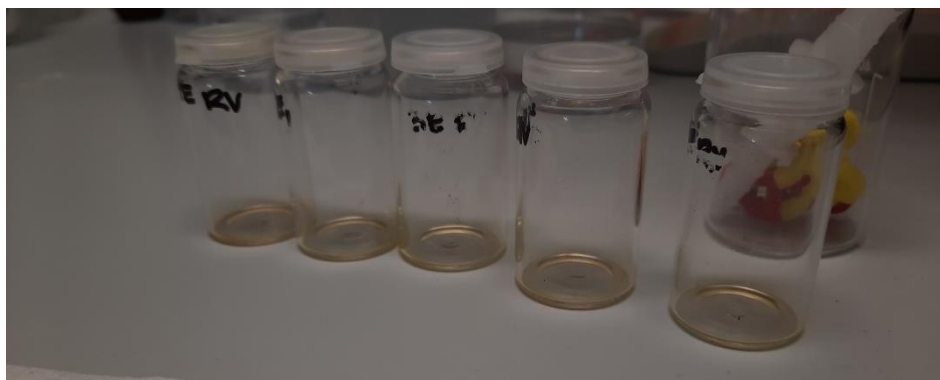
Slika 10. Uzorci nakon zagrijavanja



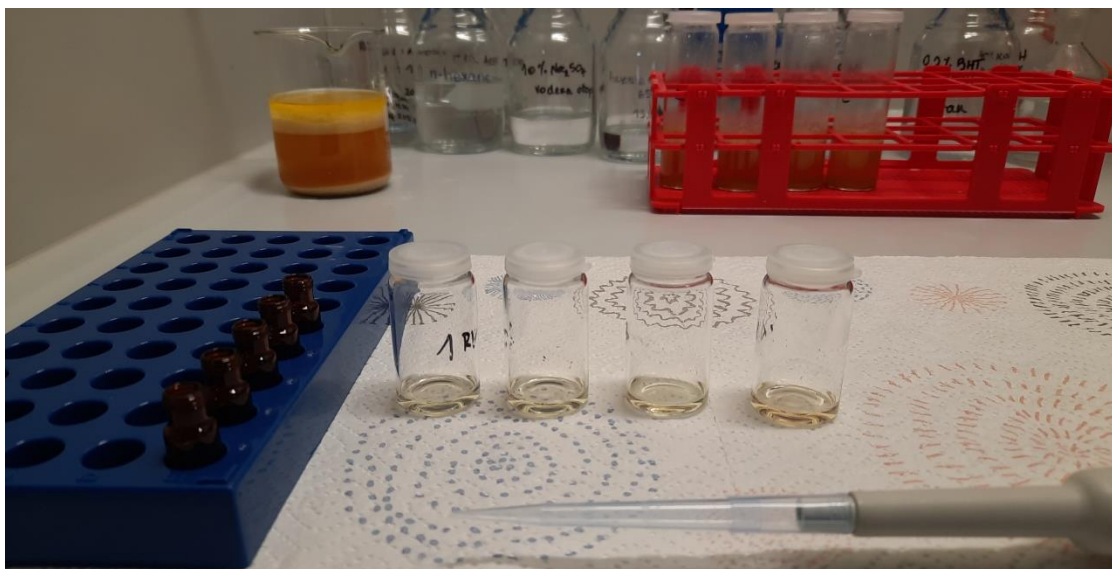
Slika 11. Uzorci nakon dodatka otopine heksan : etil-acetat



Slika 12. Priprema uzoraka za filtraciju



Slika 13. Uzorci nakon uparavanja na rotacijskom uparivaču



Slika 14. Prenosanje uzoraka u vialice za HPLC

3.6.2. Priprema HPLC-a

Prije same analize, HPLC uređaj je ispran čistim metanolom. Nakon toga se uređaj ispire mobilnom fazom koja se sastoji od otopine propan-2-ola i metanola u omjeru 45:55. Analiza uzoraka provodi se tek kada se bazna linija stabilizira i tlak postane konstantan.

U analizi je korištena kolona Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m), Shimadzu.

Paramteri analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti:

- protok: 0.7 mL/min
- mobilna faza: izopropanol : metanol = 45:55
- t (pećnica) = 40 °C
- vrijeme analize: 10 minuta
- detektor: UV/VIS, λ = 295 nm
- injektiran volumen: 20 μ L

Vrijeme zadržavanja vitamina E iznosi 4.3 min.

3.7. Optimirani parametri ekstrakcije

Ispitat će se utjecaj veličine čestica ispitivanog uzorka hrane za nesilice određujući i uspoređujući sadržaj vitamina E u neusitnjenim i usitnjenim uzorcima. Uzorci hrane će se usitniti korištenjem mlina za kućnu upotrebu i potom prosijavanjem.

Osim veličine čestica ispitat će se i utjecaj omjera suhe tvari (uzorka) i ekstrakcijske smjese i to omjeri 1:5, 1:10, 1:25 i 1:50.

Utjecaj sastava ekstrakcijske smjese ispitat će se i usporediti s rezultatima dobivenima već opisanom metodom, a ispitat će se ekstrakcijske smjese u kojima je heksan : etil-acetat = 85:15 zamijenjen čistim heksanom, smjesom metanol : THF = 9:1 i smjesom heksan : etil-acetat = 65:35.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Uspoređujući rezultate dobivene određivanjem sadržaja vitamina E ranije opisanom metodom u usitnjenim i neusitnjenim uzorcima hrane za nesilice (Tablice 2. i 3.), veći sadržaj vitamina E određen je u usitnjenim uzorcima i to za 97,32 mg/kg uzorka, odnosno za 33,78 %. U daljnjim analizama koristit će se usitnjeni uzorci hrane za nesilice. U prikazanim tablicama crvenom bojom su označeni rezultati koji nisu statistički obrađeni zbog značajnog odstupanja.

Tablica 2. Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja vitamina E u uzorcima koji nisu usitnjeni

uzorak	rezultat (mg/L)	mg/kg uzorka
1	40,658	203,29
2	40,942	204,71
3	40,896	204,48
4	36,938	184,69
srednja vrijednost	39,859	199,293
SD	1,951	9,755
RSD (%)	4,895	4,895
interval pouzdanosti (±)	1,912	9,560

Tablica 3. Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja vitamina E u uzorcima koji su usitnjeni

uzorak	rezultat (mg/L)	mg/kg uzorka
1	51,197	255,985
2	56,595	282,975
3	53,501	267,505
4	44,629	223,145
5	51,997	259,985
srednja vrijednost	53,323	266,613
SD	2,382	11,908
RSD (%)	4,466	4,466
interval pouzdanosti (±)	2,334	11,670

Uspoređivan je omjer suhe tvari i ekstrakcijske smjese, a skupni rezultati su prikazani u tablici 4. Rezultati za pojedinačne omjere 1:5, 1:10, 1:25 i 1:50 prikazani su u tablicama 3, 5, 6 i 7.

Tablica 4. Usporedba rezultata dobivenih određivanjem sadržaja vitamina E pri različitim omjerima suhe tvari i ekstrakcijske smjese.

omjer suha tvar:ekstrakc.smjesa	rezultat (mg/L)	mg/kg uzorka
1 : 5	53,323	266,613
1 : 10	29,356	293,560
1 : 25	13,173	329,319
1 : 50	6,461	323,050

Iz rezultata je vidljivo da je najveći sadržaj vitamina E dobiven pri omjeru 1:25, no sadržaj vitamina E koji je dobiven pri omjeru 1:50 manji je za samo 1,9 %.

Tablica 5. Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja vitamina E u uzorcima pri omjeru suhe tvari i ekstrakcijske smjese 1 : 10

uzorak	rezultat (mg/L)	mg/kg uzorka
1	29,073	290,73
2	29,792	297,92
3	28,655	286,55
4	30,135	301,35
5	29,125	291,25
srednja vrijednost	29,356	293,560
SD	0,596	5,962
RSD (%)	2,031	2,031
interval pouzdanosti (±)	0,523	5,226

Tablica 6. Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja vitamina E u uzorcima pri omjeru suhe tvari i ekstrakcijske smjese 1 : 25

uzorak	rezultat (mg/L)	mg/kg uzorka
1	13,331	333,275
2	12,166	304,15
3	14,589	364,725
4	12,605	315,125
5	73,092	1827,3
srednja vrijednost	13,173	329,319
SD	1,059	26,484
RSD (%)	8,042	8,042
interval pouzdanosti (±)	1,038	25,954

Tablica 7. Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja vitamina E u uzorcima pri omjeru suhe tvari i ekstrakcijske smjese 1 : 50

uzorak	rezultat (mg/L)	mg/kg uzorka
1	8,856	442,800
2	6,778	338,900
3	5,711	285,550
4	6,894	344,700
srednja vrijednost	6,461	323,050
SD	0,652	32,605
RSD (%)	10,093	10,093
interval pouzdanosti (±)	0,738	36,896

Ispitan je i utjecaj različitih ekstrakcijskih smjesa na određivanje sadržaja vitamina E u uzorcima. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Utjecaj različitih ekstrakcijskih smjesa na određeni sadržaj vitamina E u uzorcima

ekstrakcijska smjesa	omjer	rezultat (mg/L)	mg/kg uzorka
heksan:etilacetat=85:15	1 : 5	53,323	266,613
heksan	1 : 5	31,511	157,553
heksan:etilacetat=85:15	1 : 25	13,173	329,319
metanol:aceton = 9:1	1 : 25	13,767	344,163
heksan:etilacetat=85:15	1 : 50	6,461	323,050
heksan:etilacetat=65:35	1 : 50	7,183	359,150

Iz rezultata prikazanih u tablici 8 vidljivo je da su u odnosu na korištenu ekstrakcijsku smjesu, najbolji rezultati dobiveni korištenjem ekstrakcijske smjese heksan : etil – acetat = 65:35 koji su u odnosu na rezultate dobivene ekstrakcijskom smjesom heksan : etil acetat = 85:15 bolji za 11,17 %, odnosno 36,1 mg/kg uzorka.

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu istražen je utjecaj promjene različitih parametara već korištene metode ekstrakcije na količinu ekstrahiranog vitamina E iz realnih uzoraka. Svrha optimiranja metode je ekstrahiranje što veće količine vitamina E iz uzoraka. Kao uzorak je korištena hrana za nesilice. Ispitan je utjecaj veličine čestica hrane za nesilice, različitih omjera suhe tvari i ekstrakcijske smjese te promjene sastava ekstrakcijske smjese. Uzorci hrane za nesilice su analizirani metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

Primjenom već korištene metode čiji su parametri: omjer suhe tvari i ekstrakcijske smjese = 1:5 uz ekstrakcijsku smjesu sastava 0.2 %-tne otopine BHT u metanolu, 40%-tne otopine kalijeva hidroksida u metanolu, ultračista voda te otopina heksana i etil-acetata u omjeru 85:15, iz neusitnjenih uzoraka je ekstrahirano 199,293 mg vitamina E po kilogramu uzorka, dok je iz usitnjenih uzoraka ekstrahirano 266,613 mg vitamina E po kilogramu uzorka. Zbog boljih rezultata dobivenih ekstrakcijom usitnjenih uzoraka, za sve daljnje analize korišteni su usitnjeni uzorci.

Promjenom sastava ekstrakcijske smjese gdje je heksan:etil-acetat = 85:15 zamijenjen čistim heksanom, smjesom methanol:aceton = 9:1 i heksan:etil-acetat = 65:35, najbolji rezultati dobiveni su uz korištenje ekstrakcijske smjese u čijem je sastavu heksan:etil-acetat = 65:35 (359,15 mg po kilogramu uzorka).

Optimirana metoda ekstrakcije koja daje najbolje rezultate ekstrakcije vitamina E iz realnih uzoraka uzoraka: omjer suhe tvari i ekstrakcijske smjese 1:50 uz sastav ekstrakcijske smjese: 0.2 %-tne otopine BHT u metanolu, 40%-tne otopine kalijeva hidroksida u metanolu, ultračista voda te otopina heksana i etil-acetata u omjeru 65:35.

6. LITERATURA

- [1] V. Alibabić, I. Mujić, Pravilna prehrana i zdravlje, Veleučilište u Rijeci, Rijeka, 2016.
- [2] T. Navarra, The Encyclopedia of Vitamins, Minerals and Supplements, Second Edition, Facts On File, New York, 2004.
- [3] H. Y. Peh, W. S. Tan, W. Liao, W. S. Wong, Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol, *Pharmacology & therapeutics*, 162(2016), 152–169
- [4] T. Miyazawa, G. C. Burdeos, M. Itaya, K. Nakagawa, T. Miyazawa, Vitamin E: Regulatory Redox Interactions, *IUBMB life*, 71(4) (2019), 430–441
- [5] World Health Organization, Vitamin and mineral requirements in human nutrition, Second edition, World Health Organization, Geneva, 2005.
- [6] A. Abraham, A. J. Kattoor, T. Saldeen, J. L. Mehta, Vitamin E and its anticancer effects, *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(17) (2019), 2831–2838
- [7] G. Y. Lee, S. N. Han, The Role of Vitamin E in Immunity, *Nutrients*, 10(11) (2018), 1-18
- [8] D. J. Mustacich, R. S. Bruno, M. G. Traber, Vitamin E, *Vitamins and hormones*, 76(2007), 1–21
- [9] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/92/Alpha-Tocopherol_Structural_Formulae_V.1.svg/560px-Alpha-Tocopherol_Structural_Formulae_V.1.svg.png (5. srpnja 2022.)
- [10] J. M. Zingg, Vitamin E: an overview of major research directions, *Molecular aspects of medicine*, 28(5-6) (2007), 400–422
- [11] A. Saremi, R. Arora, Vitamin E and cardiovascular disease, *American journal of therapeutics*, 17(3) (2010), 56–65
- [12] Z. Kroner, *Vitamins and Minerals*, Greenwood, Santa Barbara, 2011.
- [13] P. Muñoz, S. Munné-Bosch, Vitamin E in Plants: Biosynthesis, Transport, and Function, *Trends in plant science*, 24(11) (2019), 1040–1051
- [14] <https://colorsofindia.media/wp-content/uploads/2022/05/GettyImages-Vitamin-E-1200.jpg> (5. srpnja 2022.)

- [15] F. Blum, High performance liquid chromatography, British journal of hospital medicine, 75(2) (2014), 18–21
- [16] D. Džambić, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Završni rad, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek, 2019.
- [17] <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQA4c4ONYbwZBIbZrVMHtlZ6POLvIveek3jmGakeaq2xJ5apWVjzQHEi3PVtauF1RokFYeo&usqp=CAU> (5. srpnja 2022.)
- [18] P. K. Sahu, N. R. Ramisetty, T. Cecchi, S. Swain, C. S. Patro, J. Panda, An overview of experimental designs in HPLC method development and validation, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 147(2018), 590–611
- [19] R. M. Engberg, M. Hammershøj, N. F. Johansen, M. S. Abousekken, S. Steinfeldt, B. B. Jensen, Fermented feed for laying hens: effects on egg production, egg quality, plumage condition and composition and activity of the intestinal microflora, British poultry science, 50(2) (2009), 228–239
- [20] R. Dončić, Određivanje sadržaja vitamina E u hrani za nesilice, Završni rad, Odjel za kemiju, 2021.