

# Usporedba metoda ekstrakcije luteina iz hrane za nesilice

---

**Mikić, Ivona**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:182:125083>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-13**

*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ivona Mikić

**USPOREDBA METODA EKSTRAKCIJE LUTEINA IZ HRANE ZA NESILICE**

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2020.

## SAŽETAK

Lutein je jedan od najzastupljenijih karotenoida u prirodi i prehrani čovjeka. Budući da ga ne sintetizira čovjek, mora se unositi u organizam putem hrane zbog njegovog antioksidativnog djelovanja i prevencije poremećaja vida. Lutein se u velikim koncentracijama nalazi u jajima nesilica čija se kvaliteta zbog masovne proizvodnje danas znatno smanjila. Zbog toga se provode brojna istraživanja u kojima se povećanjem koncentracije luteina u krmnim smjesama za hranidbu nesilica nastoji dobiti funkcionalna namirnica s pozitivnim učinkom na zdravlje čovjeka. U radu je određivana koncentracija luteina u hrani za nesilice tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s UV detekcijom. Uzorci su za analizu pripremljeni pomoću dvije metode. Usporedbom rezultata dobivenih tim metodama, u odnosu na literaturne podatke bolji rezultati postignuti su metodom 2.

Ključne riječi: lutein, hrana za nesilice, jaja, funkcionalna hrana, HPLC

## **ABSTRACT**

Lutein is one of the most widespread carotenoids in the nature and in the daily nutrition. Due to the inability of humans to synthesize lutein, it must be ingested via foods. It has antioxidative activity and is important in the prevention of macular degeneration. Lutein is found in high concentrations in laying hen eggs, the quality of which has significantly decreased today due to mass production. Therefore, numerous studies are conducted in which, by increasing the concentration of lutein in feed mixtures for laying hens, an attempt is made to obtain a functional food with a positive effect on human health. The concentration of lutein in laying hens was determined by high-performance liquid chromatography with UV detection. Samples were prepared for analysis using two methods. By comparing the results obtained with these methods and with the literature data, better results were achieved with method 2.

Ključne riječi: lutein, laying hens food, eggs, HPLC

Ovaj rad izrađen je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Rad je dio istraživanja koja provod 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. Lutein .....  | 2  |
| 2.2. Krmne smjese .....  | 4  |
| 2.3. Funkcionalna hrana .....  | 4  |
| 2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....              | 5  |
| 2.5. Određivanje karotenoida u suhoj hrani .....                       | 6  |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....  | 8  |
| 3.1. Reagensi.....   | 8  |
| 3.2. Pribor .....  | 8  |
| 3.3. Instrumentacija.....  | 8  |
| 3.4. Uzorci.....   | 9  |
| 3.5. HPLC analiza .....  | 9  |
| 3.5.1. Priprema standardnih otopina luteina.....                       | 9  |
| 3.5.2. Priprema uzoraka hrane za nesilice za analizu pomoću HPLC ..... | 9  |
| 3.5.3. Uvjeti analize i priprema HPLC za analizu .....                 | 10 |
| 3.5.4. Kalibracija .....   | 11 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....  | 12 |
| 4.1. Kalibracija.....  | 12 |
| 4.2. Određivanje koncentracije luteina u hrani za nesilice .....       | 14 |
| 5. ZAKLJUČAK .....   | 20 |
| 6. POPIS LITERATURE .....  | 21 |

## 1. UVOD

Lutein je prirodni pigment skupine karotenoida, točnije ksantofila, topljivih u mastima. Za razliku od ostalih karotenoida, ksantofili imaju vrlo ograničenu sposobnost stvaranja vitamina A budući da imaju jednu ili više molekula kisika na ugljikovom lancu [1].

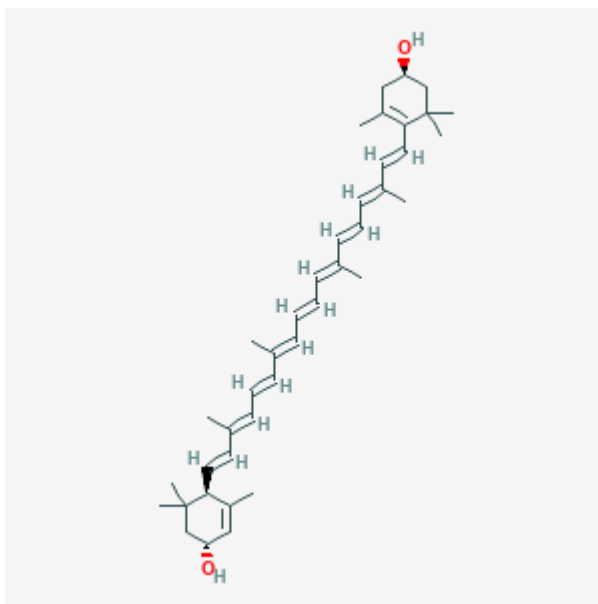
Ksantofil lutein ima dvije vrlo važne uloge; apsorpcija plavog dijela spektra koji oštećuje mrežnicu oka te antioksidativnu ulogu kojom se stabiliziraju reaktivne kisikove skupine (ROS). Istraživanja su pokazala da smanjeni unos luteina u ljudski organizam povećava vjerojatnost razvijanja poremećaja poput degenerativne promjene žute pjege i očne mrežnice [2]. Najučinkovitija prevencija jest povećani unos luteina u organizam. Lutein se može unositi u organizam putem dodataka prehrani ili češće „funkcionalnom hranom“. Funkcionalna hrana osim svoje nutritivne vrijednosti nosi i brojne zdravstvene prednosti kojima se smanjuje rizik od određenih bolesti ili ima ciljane blagotvorne učinke na zdravlje čovjeka.

U završnom radu opisan je lutein, njegova prisutnost u krmnim smjesama za nesilice te obogaćivanje tih smjesa luteinom. Nesilice unose lutein hranom te se on akumulira u žumanjku jajeta što u konačnici rezultira dobivanjem funkcionalne hrane [3]. U ovom su radu i uspoređene dvije metode za ekstrakciju luteina iz hrane za nesilice te je njegova količina određena HPLC – om.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Lutein

Lutein, karotenoid molekulske formule  $C_{40}H_{56}O_2$ , molarne mase 568,886 g/mol, na sobnoj je temperaturi tamna žuto smeđa tekućina netopljiva u vodi. Budući da je topljiv u mastima i krvi, lutein se može prenositi lipoproteinima i to onima visoke gustoće HDL (engl. *High Density Lipoprotein*, HDL). Lutein se odlikuje drugačijom orijentacijom u staničnoj membrani u usporedbi s drugim pigmentima iz skupine karotenoida što je posljedica njegove strukture s dvije hidroksilne skupine (Slika 1). Uz hidroksilne skupine prisutne su i karboksilne skupine koje povećavaju topljivost luteina u životinjskim tkivima [1].



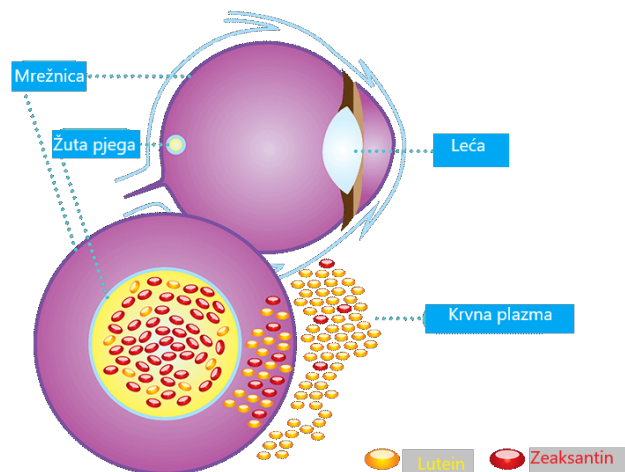
Slika 1. Prikaz strukture luteina [1].

Lutein je ksantofil. Specifičnost luteina u odnosu na druge karotenoide u ljudskom organizmu jest u njegovoj prisutnosti u očnom tkivu (Slika 2). Naime, lutein je u velikoj koncentraciji prisutan u žutoj pjegi [2].

Istraživanja su pokazala da lutein djeluje kao filter za plavo visokoenergijsko zračenje koje uzrokuje staračke degenerativne promjene žute pjege (engl. *Age-Related Macular Degeneration*, AMD). Žuta pjega se nalazi u centru oka na očnoj pozadini gdje je smještena najveća koncentracija fotoreceptora koji su odgovorni za oštrinu vida [2]. Uz žutu pjegu, glavni dijelovi oka su mrežnica i leća. AMD rezultira zamućenjem vida, ali ne uzrokuje



potpuni gubitak vida. Bolesti su podložnije osobe s genetskim predispozicijama, starije od 60 godina, pušači te bijela rasa [4]. Istraživanja su pokazala da su uzorci s visokom koncentracijom luteina, zeaksantina, karotena, kriptoksantina i likopena u serumu za 66 % manje podložni razvijanju ovog poremećaja vida u odnosu na one s niskom koncentracijom ovih pigmenata [5]. Na temelju toga zaključeno je da unos hrane bogate karotenoidima pokazuje pozitivan utjecaj na smanjenje rizika od razvijanja staračke degenerativne promjene žute pjege.



Slika 2. Građa oka (prilagođeno iz [6]).

Osim što smanjuje rizik od AMD-a, lutein ima antioksidativno djelovanje uklanjajući peroksidne radikale smanjujući rizik od raka jajnika, sluznice maternice ili dojke kod žena [7].

Pozitivan učinak luteina uočen je pri obavljanju kognitivnih funkcija poput govora, učenja i pamćenja [8].

U prirodi, lutein se može pronaći u zelenom povrću poput graška, kelja, brokule, špinata te citrusnom voću. Osim u voću i povrću, lutein se nalazi i u algama. Klorela je jednostanična zelena alga koja može biti kultivirana u bioreaktoru pa se može koristiti kao dodatak hrani za nesilice čime se poboljšavaju njihove karakteristike poput težine [9]. Iako je koncentracija luteina u zelenom povrću znatno veća nego u jajetu, apsorpcija luteina u organizam je puno lakša jer se u jajima nalazi uklopljen u mastima [10].

## 2.2. Krmne smjese

Krmne smjese za hranidbu nesilica sadrže najveći udio kukuruza (11-30 mg karotenoida po kilogramu smjese). Budući da nesilice ne mogu sintetizirati karotenoide od kojih potječe žuta boja žumanjka, ona se postiže unosom krmne smjese obogaćene sintetskim pigmentima. Žuti karotenoidi (lutein i zeaksantin), koji su odgovorni za žutu boju žumanjka, mogu se pronaći u kukuruzu, lucernu i kadifici. Lutein koji se koristi kao dodatak krmnim smjesama dobiva se ekstrakcijom istog iz meksičke kadifice (*Tagetes erecta, L.*). Ekstrakcijom se dobiva esterificirani lutein koji je stabilan te se zbog toga može koristiti kao aditiv. Dokazano je da se s povećanjem sadržaja luteina u smjesi analogno povećava i njegov sadržaj u monocitima i plazmi te da nedostatak luteina ima negativan utjecaj na imunološki sustav pilića koji se očituje u smanjenom timusu, jetri i boji kože [3].

## 2.3. Funkcionalna hrana

Kokošja jaja su primjer funkcionalne hrane koja sadrži brojne nutrijente, počevši od proteina i vitamina pa sve do spojeva koji imaju pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka poput karotenoida luteina i zeaksantina u žumanjku jajeta [11,12].

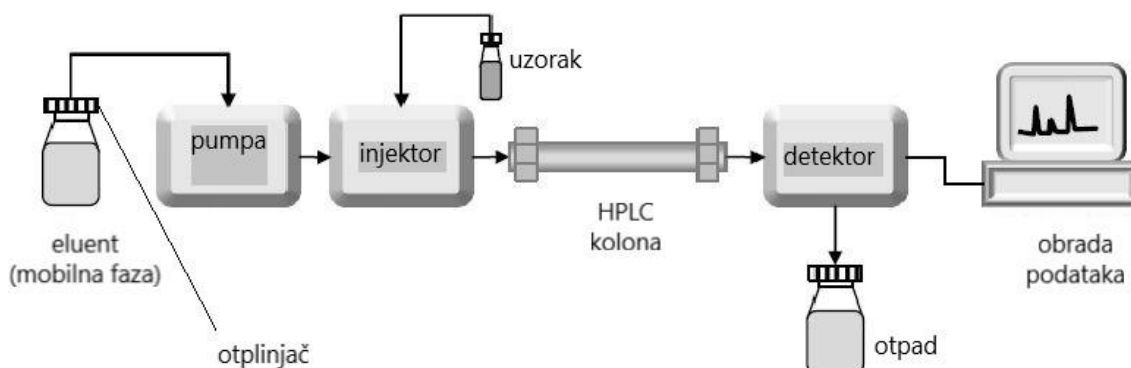
Istraživanja su pokazala da se koncentracija luteina u žumanjku jajeta može povećati obogaćivanjem hrane za nesilice luteinom. Leeson i Caston istraživali su utjecaj dodatka luteina u hranu za nesilice na koncentraciju luteina u jajima. U eksperimentu, nesilice su hranjene kukuruznom sojom kojoj je dodano 0, 125, 250, 375, 500, 625, 750 ili 1, 000 ppm luteina. Nakon 30 dana, jaja su podvrgnuta analizi. Analiza je pokazala da je koncentracija luteina u jajima porasla ( $P > 0.01$ ). Najprimjetniji porast koncentracije, zapažen je dodatkom 500 ppm luteina pri čemu se obojenje žumanjka povećalo bez negativnog utjecaja na zdravlje nesilica [13].

Kralik i suradnici proveli su istraživanje s nesilicama koje su podijelili u dvije skupine. Prva skupina nesilica hranjena je krmnom smjesom koja nije bila obogaćena ekstraktom nevena kao izvora pigmenta luteina. Druga, pak skupina konzumirala je smjesu u kojoj je dodano 3 g/kg ekstrakta nevenovog cvijeta. Tijekom eksperimenta analizirala su se fizikalno - kemijska svojstva jaja te koncentracija luteina u žumanjku. Analiza svojstava jaja nakon provedenog eksperimenta pokazala je razliku u koncentraciji luteina između dvije ispitivane skupine. Naime, skupina kojoj je dodan ekstrakt nevenovog cvijeta imala je 9,91 puta veću

koncentraciju luteina u žumanjku jajeta nego skupina koja nije bila obogaćena luteinom. Rezultati pokazuju da dodatkom 3 g/kg ekstrakta nevenovog cvijeta dolazi do porasta količine luteina u žumanjku ( $7.14 \pm 0.12$  mg/100 g). Međutim, istraživanje je pokazalo da je dodatkom luteina u krmne smjese došlo do smanjenja kvalitete ljuske jajeta. To se može objasniti činjenicom da lutein i zeaksantin inhibiraju estrogenu aktivnost mnogih tkiva što je vjerojatno i ovdje slučaj [14].

#### 2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) je unaprijeđena vrsta tekućinske kromatografije u koloni. Umjesto otapala koje pod utjecajem gravitacije može kapati ono je pod tlakom do 400 atm što je čini puno bržom. Također, HPLC omogućava upotrebu vrlo malih čestica što omogućava puno veću površinu za interakcije stacionarne i mobilne faze čime se postiže učinkovitije razdvajanje komponenata smjese [15,16]. Glavni dijelovi HPLC-a su mobilna faza, otplinjač, pumpa, injektor za unošenje uzorka, kolona i detektor (Slika 3).



Slika 3. Shema uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (prilagođeno iz [17]).

Mobilna faza je tekuća i može joj se mijenjati polarnost i pH te sastav u cilju optimiranja separacije. Ona je kompatibilna s detektorom, otapa uzorak i kemijski je inertna. Stacionarnu fazu čine punila vrlo finih zrna, a tip interakcija koje će se odvijati ovisi o kemijskim svojstvima površine punjenja. S obzirom na polarnost, može biti normalna faza (*normal phase*) ili obrnuta faza (*reversed phase*). Kod normalne faze HPLC – a, kolona je ispunjena

česticama silicijeva dioksida, a otapalo je nepolarno. Polarne komponente smjese prolaskom kroz ovu kolonu, zadržat će se dulje u koloni nego nepolarne komponente. Samim time, nepolarne komponente smjese brže će proći kroz kolonu. Reverzna faza HPLC – a razlikuje se po tome što je silicijev dioksid modificiran na način da veže ugljikovodične lance na svoju površinu te se koristi polarno otapalo. Između polarnih molekula smjese i polarnog otapala dolazi do snažnog privlačenja dok kod polarnih molekula i stacionarne faze to nije slučaj. Na taj će način polarne molekule veći dio vremena provesti kretajući se otapalom. Nepolarne molekule smjese, teže stvaranju interakcija s ugljikovodicima zbog van der Waalsovih sila. Pri prolasku kroz kolonu, one manji dio vremena provode u otapalu nego u slučaju polarnih molekula. Dakle, u reverzibilnoj fazi, polarne molekule putuju brže kroz kolonu [15, 16].

Razdvajanje može biti izokratsko i gradijentno. Izokratsko razdvajanje odvija se pomoću samo jednog otapala (ili konstantne smjese otapala) i pH je isti. Ako jedno otapalo ne omogućava brzo razdvajanje svih komponenti smjese, tada se koristi gradijentno razdvajanje promjenjive pH vrijednosti [16].

Retencijsko vrijeme je vrijeme koje je potrebno čestici spoja da prođe kroz kolonu i dođe do detektora. Mjerenje vremena započinje od trenutka kada je uzorak injektiran do trenutka kada detektor pokaže maksimalnu visinu pika. Površina tog pika srazmjerna je količini analita [15].

HPLC se često primjenjuje u istraživanjima zbog svoje osjetljivosti, prilagodljivosti te mogućnosti primjene u analizi neisparljivih i termički osjetljivih spojeva.

## 2.5. Određivanje karotenoida u suhoj hrani

Prehrana bogata vitaminima i mineralima važna je za održavanje zdravlja čovjeka. Jedna od najvažnijih komponenti zdrave prehrane jesu karotenoidi koji su najzastupljeniji u voću i povrću. Do sada je u prirodi identificirano 700 pripadnika karotenoida, a otprilike 50 % njih može biti apsorbirano i prerađeno u ljudskom organizmu. Ipak, istraživanja su dokazala prisutnost samo šest vrsta karotenoida u krvi čovjeka;  $\beta$ - karoten,  $\beta$ - kriptoksantin,  $\alpha$  - karoten, likopen, lutein i zeaksantin. Karotenoidi su pigmenti topljivi u mastima i odgovorni su za žutu, narančastu i crvenu boju povrća (kukuruz, mrkva, rajčica, itd.), za crvenu boju ribe (losos) kao i rakova (jastog, rak, škamp) te žutu boju žumanjka jajeta [18,19].

Voće i povrće bogati su karotenoidima te prema brojnim istraživanjima pokazuju potencijal za ekstrakciju karotenoida iz njih. Glavni izvor  $\alpha$ - i  $\beta$ - karotenoida je žuto-narančasto voće i povrće,  $\alpha$  – kriptoksantin sadrži narančasto voće, rajčica je bogata likopenom, a zeleno povrće je glavni izvor luteina [18].

Apsorpcija hidroksi i keto karotenoida zabilježena je kod riba. Astaksantin i kantaksantin pripadaju toj skupini karotenoida pa ih ribe kao takve lako apsorbiraju. Crvena boja rakova, škampa, jastoga kao i crvena boja mesa lososa potječe od ovih karotenoida. Primjerice, losos ih apsorbira i taloži u mišićima tijekom perioda sazrijevanja, a potom ih putem VHDL- a (engl. *Very High Density Lipoproteins*) i HDL- a (engl. *High Density Lipoproteins*) prenosi jajnicima do potomaka. Time se postiže prijenos karotenoida s majke ribe na njezina jajašca što je važno za njihov daljnji razvitak. Povećanjem koncentracije astaksantina i kantaksantina u hranidbi rakova rezultiralo je njihovim boljim rastom i preživljavanjem [19].

Lutein je žuti pigment koji se često dodaje krmnim smjesama za prehranu peradi čime se poboljšava intenzitet boje žumanjka jajeta. Dodaje se smjesama u kombinaciji s crvenim i narančastim ksantofilima budući da sam može prouzročiti zelenkastu boju žumanjka. Nakupljanje luteina u žumanjku posljedica je hidrolize diestera luteina iz hrane u lutein koji se potom apsorbira kroz stijenku crijeva u krvotok.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Reagensi

- n-heksan, HPLC grade (Carlo Erba, Francuska)
- aceton, pro analysi (Gram-mol, Hrvatska)
- etanol, absolute anhydrous (Carlo Erba, Francuska)
- toluene (Carlo Erba, Francuska)
- kalijev hidroksid (Gram-mol, Hrvatska)
- natrijev sulfat (Gram-mol, Hrvatska)
- 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol, 99% (Acros Organics, Njemačka)
- metanol, HPLC grade (J. T. Baker, Poljska)
- etilacetat (Fisher Scientific, UK)
- tetrahydrofuran, HPLC grade (Fisher Scientific, UK)

#### 3.2. Pribor

- Pipeta, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL
- Mikropipeta, 100-1000  $\mu$ L
- Staklena epruveta, 50 mL
- Staklena čaša, 500 mL
- HPLC Vialice, 1,5 mL
- Kapalica
- Odmjerna tikvica 100 mL, 500 mL

#### 3.3. Instrumentacija

- analitička vaga (KERN, Njemačka)
- Laboratorijska treskalica za epruvete (IKA, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj

- Magnetska mješalica s grijačem ( IKA, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf visoke razlučivosti (Shimadzu, Japan)

### 3.4. Uzorci

Analizirana je hrana za nesilice bez dodataka funkcionalnih sastojaka.

### 3.5. HPLC analiza

#### 3.5.1. Priprema standardnih otopina luteina

Pripremljeno je pet standardnih otopina luteina koje su kasnije upotrijebljene za kalibraciju. Standardne otopine su pripremljene razrjeđivanjem osnovne otopine koncentracije 1,25 mg/25mL. Otopine su pripremljene prema Tablici 1.

Tablica 1. Priprema standardnih otopina luteina.

| <b>Vosnovna otopina (mL)</b> | <b>Vukupni (mL)</b> | <b>standard (mg/L)</b> |
|------------------------------|---------------------|------------------------|
| 0,025                        | 5                   | 0,25                   |
| 0,050                        | 5                   | 0,50                   |
| 0,125                        | 5                   | 1,25                   |
| 0,250                        | 5                   | 2,50                   |
| 0,500                        | 5                   | 5,00                   |

#### 3.5.2. Priprema uzoraka hrane za nesilice za analizu pomoću HPLC

Uzorci hrane za nesilice za analizu su pripremljeni prema dvije metode:

##### Metoda 1

Odvagati 1 g uzorka hrane za nesilice i prenijeti ga u odmjernu tikvicu od 100 mL. U tikvicu dodati 30 mL ekstrakcijske smjese heksan:aceton:etanol:toluen = 10:7:6:7 i 1 mL 0,2 % otopine BHT u metanolu. Ovako pripremljenu smjesu lagano miješati 1 minutu, nakon čega se doda još 2 mL destilirane vode i 2 mL 40 % metanolne otopine KOH. Smjesa se zagrijava 20 minuta na 56 °C. Nakon zagrijavanja, smjesu ostaviti u mraku 1 sat kako bi se ohladila. Kada se smjesa ohladila, dodati 30 mL n-heksana i lagano miješati 1 minutu, potom dodati 10 % otopinu Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i snažno promiješati te ostaviti na sobnoj temperaturi 1 sat da se slojevi odijele. Kada su se slojevi odijelili, uzeti 1 mL heksanskog (gornjeg) sloja i prenijeti u HPLC

vialicu te zagrijavati sadržaj vialice dok sav heksan ne otpari. U vialicu potom dodati 1 mL smjese heksan:etilacetat = 65:35 i dobro promiješati. Uzorak je spreman za analizu [20].

## Metoda 2

Odvagati 1 g uzorka hrane za nesilice, prenijeti ga u staklenu epruvetu od 50 mL, dodati 20 mL ekstrakcijske smjese metanol:aceton = 1:1. Smjesu promiješati prvo pomoću laboratorijske tresilice a zatim ostaviti 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Nakon miješanja, epruvetu ostaviti u mraku dok se slojevi ne odijele. Kada su se slojevi odijelili, smjesu metanola:acetona = 1:1 profiltrirati kroz filter 0,45 µm. 1 mL filtrate prenijeti u HPLC vialicu i lagano zagrijavati dok otapala ne ispare. U vialicu potom dodati 1 mL smjese heksan:etilacetat = 65:35 i dobro promiješati. Uzorak je spreman za analizu.

Kako bi odredili utjecaj volumena ekstrakcijske smjese na koncentraciju luteina prema metodi 2 uzorci za analizu su pripremljeni prema Tablici 2.

Tablica 2. Priprema uzoraka za određivanje utjecaja volumena ekstrakcijske smjese.

| <b>uzorak</b>              | <b>1</b> |     | <b>2</b> |    | <b>3</b> |    | <b>4</b> |    |
|----------------------------|----------|-----|----------|----|----------|----|----------|----|
| <b>m (uzorka hrane)/ g</b> | 1 g      |     | 1 g      |    | 1 g      |    | 1 g      |    |
| <b>V (0,2% BHT)/mL</b>     | 0        | 1   | 0        | 1  | 0        | 1  | 0        | 1  |
| <b>V(metanol)/mL</b>       | 2,5      | 1,5 | 5        | 4  | 10       | 9  | 20       | 19 |
| <b>V(aceton)/mL</b>        | 2,5      | 2,5 | 5        | 5  | 10       | 10 | 20       | 20 |
| <b>V (ukupni)/mL</b>       | 5        | 5   | 10       | 10 | 20       | 20 | 40       | 40 |

### 3.5.3. Uvjeti analize i priprema HPLC za analizu

Uvjeti analize:

- Protok: 1 mL/min
- Temperatura pećnice: sobna temperatura
- Vrijeme trajanja analize: 10 min
- Valna duljina: 450 nm
- Injektirani volumen: 20 µL
- Mobilna faza: metanol:tetrahidrofuran = 9:1



Pri mjerenju je korištena kolona Shim\_pack GIST, 4,6x250 nm, 5 $\mu$ m, C18 (Shimadzu, Japan).

Vrijeme zadržavanja luteina je 4,08 minuta.

Prije pokretanja metode kojom će se mjeriti koncentracija luteina, HPLC sustav je potrebno pripremiti za mjerenje. Priprema se sastoji u ispiranju cijelog sustava metanolom a potom se sustav ispiru mobilnom fazom sve dok se postigne stabilan tlak i ravna bazna linija.

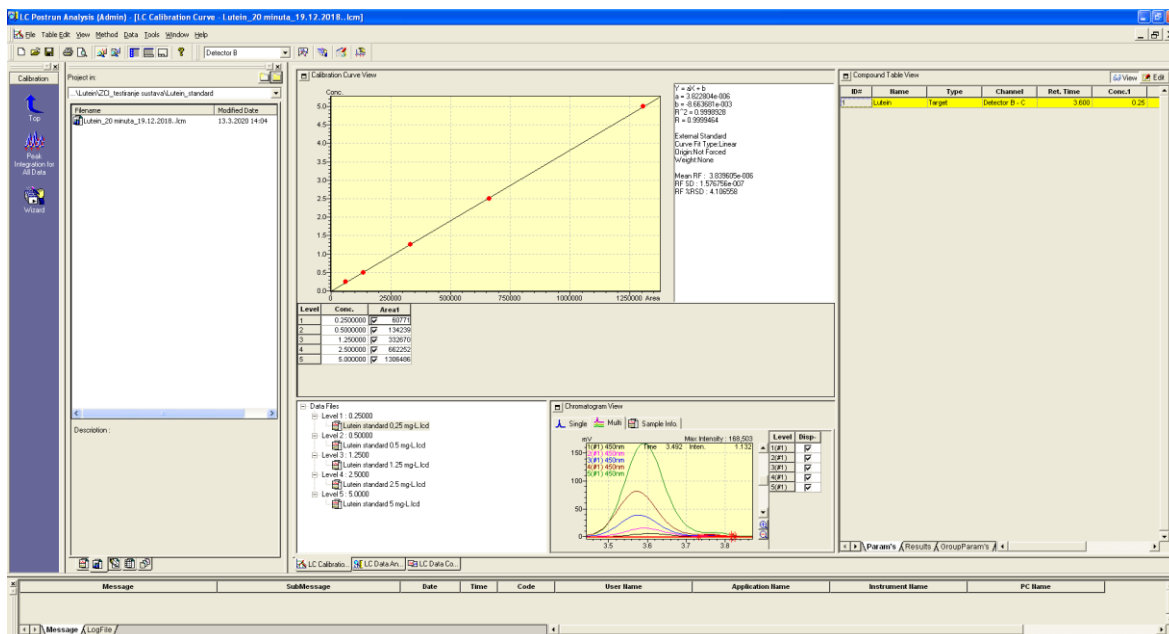
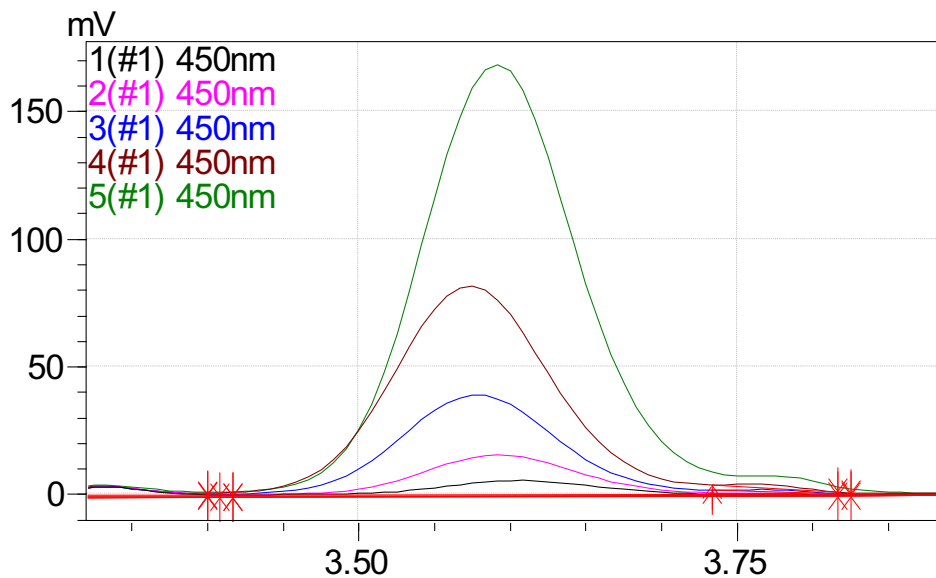
#### 3.5.4. Kalibracija

Kalibracija se provodi prije mjerenja realnih uzoraka kako bi se smanjila sistemska pogreška, a provodi se mjerenjem veličina čije vrijednosti su poznate [21, 22]. Standardnim otopinama koje su pripremljene prema Tablici 1. izmjeri se apsorbancija na valnoj duljini 450 nm i pomoću programa koji se koristi za upravljanje HPLC-om (Lab Solutions) konstruira se kalibracijski pravac koristeći površinu pika luteina svakog standarda.

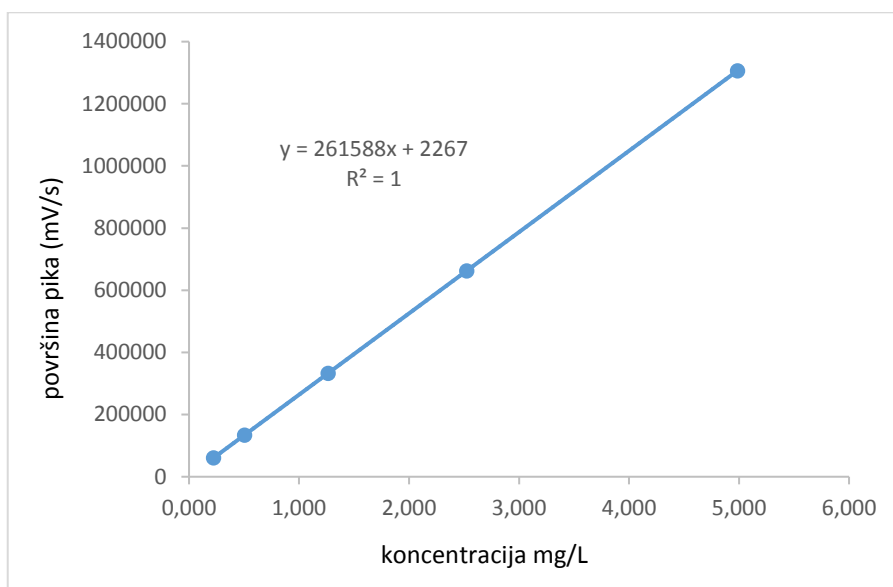
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Kalibracija

Standardnim otopinama luteina izmjerena je apsorbancija, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 3 i na Slikama 4 i 5.



Slika 4. Prikaz kromatograma serije standardnih otopina luteina u programu Lab Solutions (—0,25 mg/L,—0,5 mg/L,—1,25 mg/L,—2,5 mg/L,—5 mg/L).



Slika 5. Prikaz kalibracijskog pravca.

Tablica 3. Vrijednosti dobivene mjerenjem apsorbancije standardnih otopina luteina.

| standard (mg/L) | površinapika (mV/s) | visinapika (mV) | mg/L (ppm) |
|-----------------|---------------------|-----------------|------------|
| 0,25            | 60771               | 6422            | 0,224      |
| 0,50            | 134239              | 16236           | 0,505      |
| 1,25            | 332670              | 39668           | 1,263      |
| 2,50            | 662252              | 82071           | 2,523      |
| 5,00            | 1306486             | 16869           | 4,986      |

Dobiveni koeficijent determinacije iznosi  $R^2 = 0,9999$  što prema Chadockovoj ljestvici (Tablica 4) ukazuje na čvrstu vezu regresijskog pravca i izmjerenih vrijednosti pa možemo zaključiti da je odabrana metoda odgovarajuća za analizu koncentracije luteina

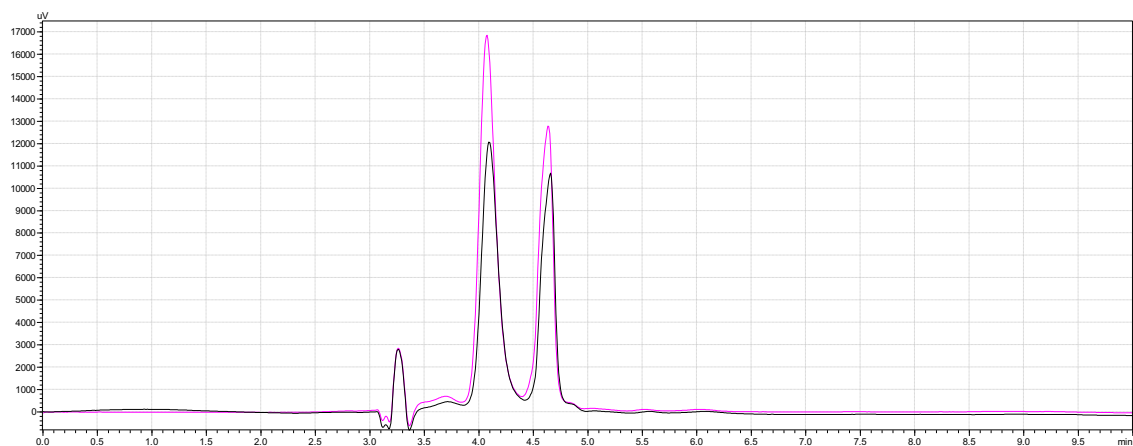
Tablica 4. Chadockova ljestvica.

| Koeficijent determinacije | Tumačenje            |
|---------------------------|----------------------|
| 0,00                      | Odsutnost veze       |
| 0,00-0,25                 | Slaba veza           |
| 0,25-0,64                 | Veza srednje jakosti |
| 0,64-1,00                 | Čvrsta veza          |
| 1                         | Potpuna veza         |

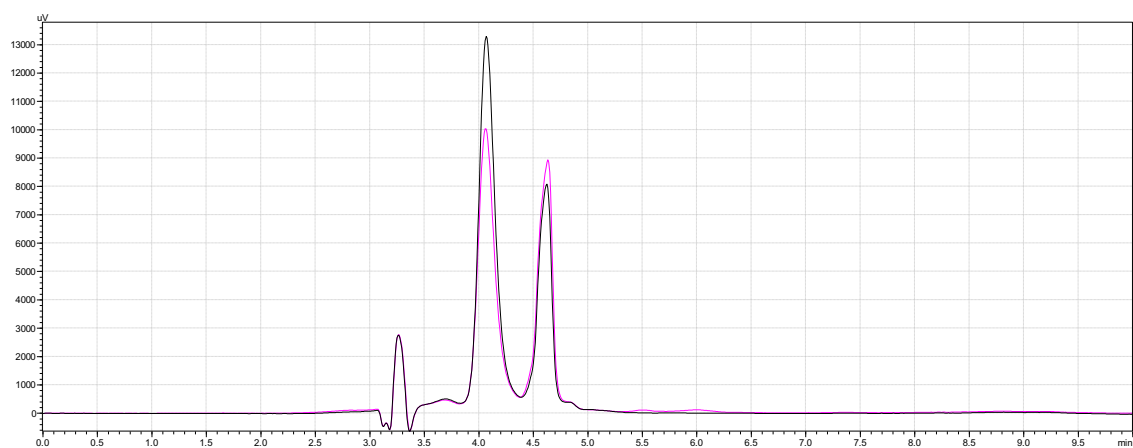
## 4.2. Određivanje koncentracije luteina u hrani za nesilice

Uzorci hrane za nesilice pripremljeni su prema ranije opisanim metodama.

U Tablici 5 i na Slikama 6 i 7 prikazani su rezultati analize dobiveni mjerenjem uzoraka pripremljenih prema metodi 1. Uspoređeni su rezultati dobiveni ekstrakcijom uz dodatak 0,2% otopine BHT i bez dodatka 0,2 % BHT. Pripremljena su dva paralelna uzorka.



Slika 6. Kromatogram Uzorak 1 (—), Uzorak 1+BHT (—) pripremljeni prema metodi 1.



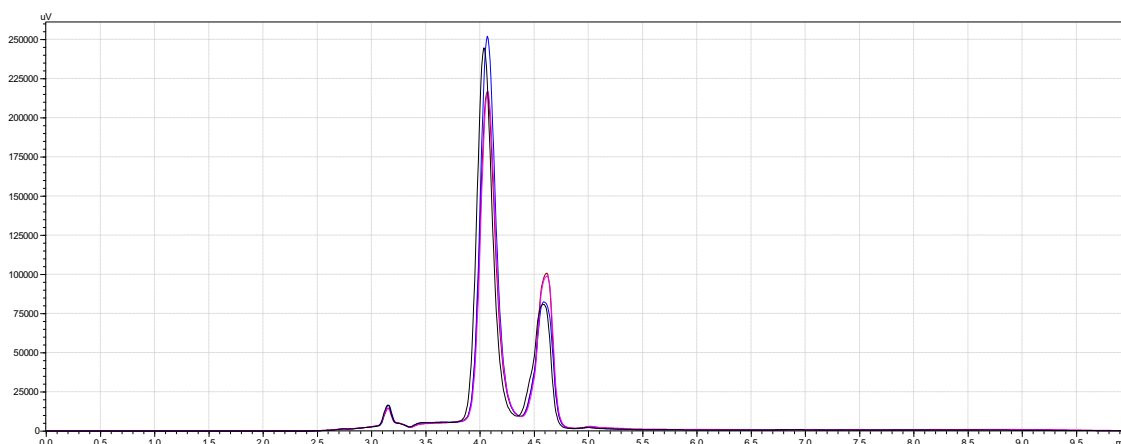
Slika 7. Kromatogram Uzorak 2 (—), Uzorak 2+BHT (—) pripremljeni prema metodi 1.

Tablica 5. Rezultati dobiveni analizom uzoraka hrane za nesilice metodom 1.

| uzorak                    | mg/L            |              |
|---------------------------|-----------------|--------------|
|                           | bez dodatka BHT | 0,2% BHT     |
| 1                         | 0,600           | 0,767        |
| 2                         | 0,494           | 0,610        |
| <b>srednja vrijednost</b> | <b>0,547</b>    | <b>0,689</b> |

Iz rezultata je vidljivo da se veće vrijednosti koncentracije luteina dobivaju u uzorcima s dodatkom 0,2 % otopine BHT.

Uzorci za određivanje koncentracije luteina u hrani za nesilice prema metodi 2 pripremljeni su na ranije opisan način. U Tablici 6 i Slici 8 prikazani su rezultati analize dobiveni od uzoraka pripremljenih prema metodi 2. Pripremljena su dva paralelna uzorka.



Slika 8. Usporedba kromatograma dobivenih analizom hrane za nesilice pripremljenih metodom 2.

Uzorak 1(—), Uzorak 1+BHT (—), Uzorak 2(—), Uzorak 2+BHT (—)

Tablica 6. Rezultati dobiveni analizom uzoraka hrane za nesilice pripremljenih metodom 2.

| uzorak                    | mg/L luteina    |              |
|---------------------------|-----------------|--------------|
|                           | bez dodatka BHT | 0,2% BHT     |
| 1                         | 10,236          | 9,517        |
| 2                         | 10,539          | 9,548        |
| <b>srednja vrijednost</b> | <b>10,388</b>   | <b>9,533</b> |

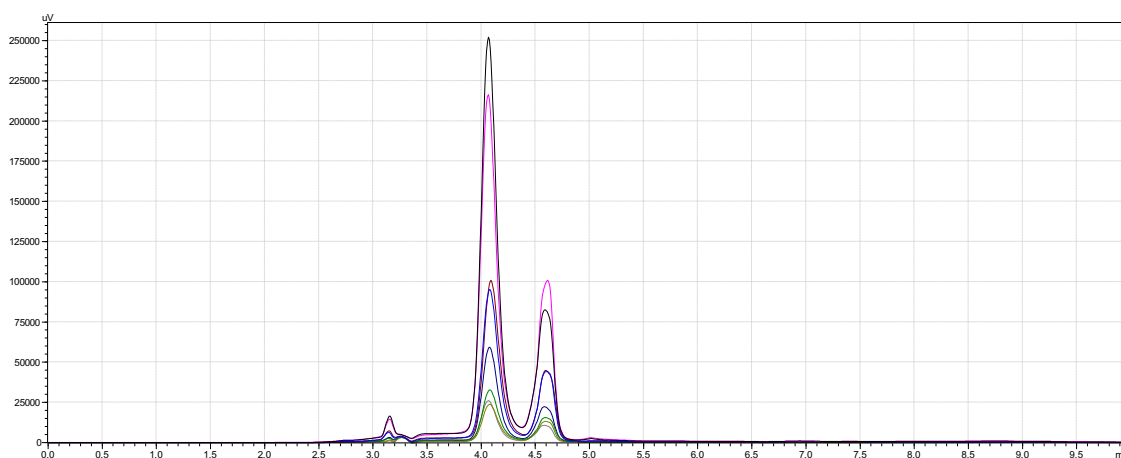
Koncentracija luteina u uzorcima hrane za nesilice nešto je veća u uzorcima bez dodatka 0,2% BHT.

Usporedba rezultata dobivenih metodom 1 i metodom 2 prikazana je u Tablici 7. Rezultati metode su izračunati s obzirom na volumene ekstrakcijskih smjesa obje metode. Rezultati dobiveni metodom 1 su nešto manji u odnosu na rezultate dobivene metodom 2 s tim da se rezultati s dodatkom 0,2 % otopine BHT razlikuju za manju vrijednost u odnosu na uzorke bez dodatka BHT.

Tablica 7. Usporedba rezultata dobivenih ekstrakcijom luteina metodom 1 i metodom 2.

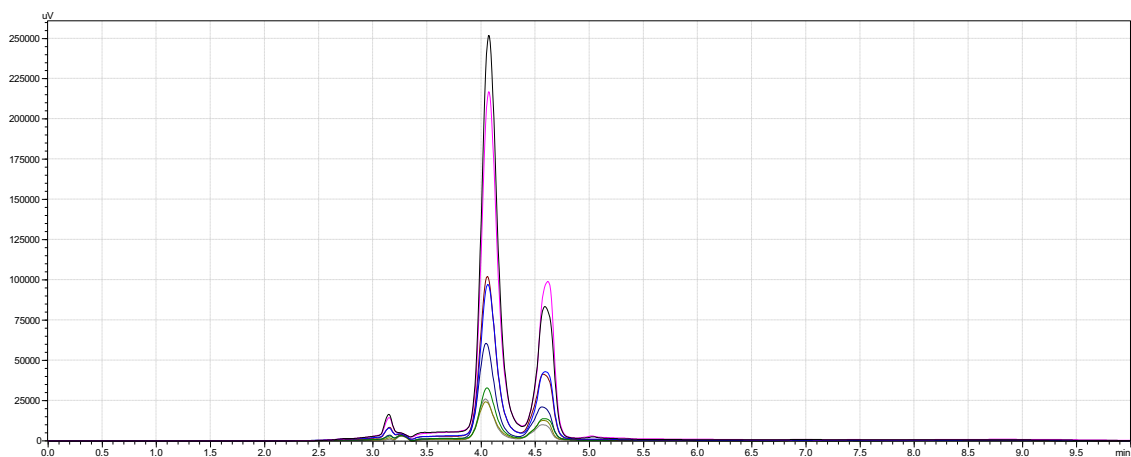
| metoda         | mg/L luteina    |              |
|----------------|-----------------|--------------|
|                | bez dodatka BHT | 0,2% BHT     |
| <b>1</b>       | 0,547           | 0,689        |
| <b>2</b>       | 0,812           | 0,744        |
| <b>razlika</b> | <b>0,265</b>    | <b>0,055</b> |

Stabilnost uzorka provjerena je mjerenjem koncentracije istih uzoraka u razmaku od tri dana. Korišteni su uzorci pripremljeni prema metodi 2, a između analiza uzorci su čuvani u hladnjaku na temperaturi 4 °C. Rezultati analize prikazani su u Tablici 8 i na Slikama 9, 10 i 11.



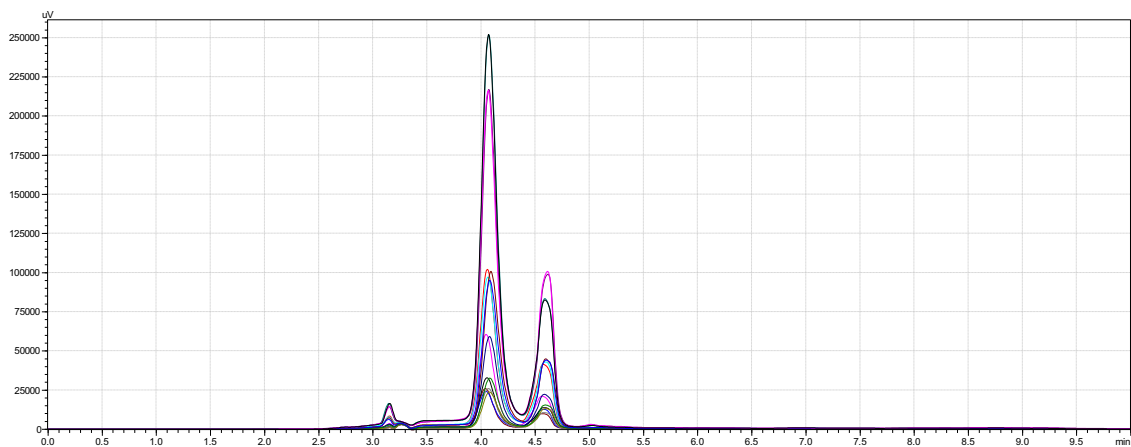
Slici 9. Kromatogram uzoraka za provjeru stabilnosti uzoraka luteina pripremljeni prema metodi 2 (1. dan).

1(—), 1+BHT (—), 2(—), 2+BHT (—), 3(—), 3+BHT (—), 4(—), 4+BHT (—)



Slika 10. Kromatogram uzoraka za provjeru stabilnosti uzoraka luteina pripremljeni prema metodi 2 (3. dan).

1(—), 1+BHT (—), 2(—), 2+BHT (—), 3(—), 3+BHT (—), 4(—), 4+BHT (—)



Slika 11. Kromatogrami svih uzoraka korištenih u ispitivanju stabilnosti uzoraka.

Tablica 8. Ispitivanje stabilnosti uzoraka luteina.

|                | uzorak       |              |              |              |              |              |              |              |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                | 1            | 1 + BHT      | 2            | 2 + BHT      | 3            | 3 + BHT      | 4            | 4 + BHT      |
| <b>1. dan</b>  | 10,539       | 9,548        | 4,338        | 4,390        | 1,454        | 2,498        | 1,081        | 1,137        |
| <b>3. dan</b>  | 10,514       | 9,643        | 4,482        | 4,420        | 1,547        | 2,553        | 1,102        | 1,130        |
| <b>razlika</b> | <b>0,025</b> | <b>0,095</b> | <b>0,144</b> | <b>0,030</b> | <b>0,093</b> | <b>0,055</b> | <b>0,021</b> | <b>0,007</b> |

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da se koncentracija luteina u uzorcima u razmaku od tri dana nije značajno promijenila što znači da se uzorci mogu pripremiti ranije i analizirati kasnije.

Uzorci za određivanje utjecaja volumena ekstrakcijske smjese pripremljeni su na ranije opisan način, a prikazan u Tablici 8. Rezultati koji su izraženi u 5 mL reakcijske smjese izračunati su na osnovu rezultata dobivenih mjerenjem uzoraka pripremljenih u 5 mL reakcijske smjese (uzorak 1, 1+BHT). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati analize uzoraka za određivanje utjecaja volumena ekstrakcijske smjese.

|                             | uzorak |         |       |         |       |         |       |         |
|-----------------------------|--------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
|                             | 1      | 1 + BHT | 2     | 2 + BHT | 3     | 3 + BHT | 4     | 4 + BHT |
| V (ekstrakcijske smjese)/mL | 5      |         | 10    |         | 20    |         | 40    |         |
| mg/L luteina                | 10,526 | 9,596   | 4,410 | 4,405   | 1,501 | 2,525   | 1,092 | 1,138   |
| V (ekstrakcijske smjese)/mL | 5      |         | 5     |         | 5     |         | 5     |         |
| mg/L luteina                | 10,526 | 9,596   | 5,263 | 4,798   | 2,632 | 2,392   | 1,316 | 1,200   |
| razlika                     | 0      | 0       | 0,853 | 0,393   | 1,131 | 0,133   | 0,224 | 0,067   |

Vidimo da se većina rezultata ne razlikuje značajnije osim kod uzorka 2 i 3 bez dodatka 0,2% BHT. Vjerojatan uzrok tome je homogenost analizirane smjese jer je hrana za nesilice smjesa više sastojaka koji se miješaju u velikim količinama pa je homogenost hrane često upitna.

Količina luteina u 1 kg hrane za nesilice izračunata je na osnovu rezultata HPLC analize, a rezultati su prikazani u Tablici 10.

Tablica 10. Masa luteina u 1 kg hrane za nesilice.

|          | uzorak  | mg/L   | mg (luteina)/kg hrane |
|----------|---------|--------|-----------------------|
| metoda 1 | bez BHT | 0,547  | 35,019                |
|          | + BHT   | 0,689  | 44,110                |
| metoda 2 | bez BHT | 10,388 | 51,940                |
|          | + BHT   | 9,533  | 47,665                |

Uspoređujući masu luteina (ksantofila) u analiziranoj hrani za nesilice s literaturnim podacima u kojima se navodi da komercijalna hrana za tov pilića sadrži do 50 mg ksantofila/1 kg smjese [23]. Vidimo da se metodom 2 dobiju vrijednosti bliže literaturnim



podacima. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da uzrok tome može biti sama metoda ali vjerojatniji uzrok razlike između rezultata je nehomogenost smjese koja se analizirala.

## 5. ZAKLJUČAK

U radu su uspoređene dvije metode za ekstrakciju luteina u hrani za nesilice. Nakon postupka ekstrakcije, koncentracije luteina određene su pomoću HPLC s UV detekcijom. Metoda 2 se pokazala kao učinkovitija za ekstrakciju luteina iz hrane za nesilice, rezultirajući nešto većim izmjerenim koncentracijama. Također, utvrđeno je da dodatak 0,2% BHT nije imao značajan utjecaj na rezultate mjerenja. Rezultati dobiveni usporedbom mjerenja koncentracije luteina u uzorku na dan pripreme i 3. dan nisu pokazali značajnu razliku iz čega se može zaključiti da se ekstrakcija i sama HPLC analiza ne moraju provesti isti dan.

Provedeno istraživanje je preliminarno, a dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost proširenja daljnjeg istraživanja.

## 6. POPIS LITERATURE

- [1] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lutein#section=13C-NMR-Spectra>  
(datum pristupa: 12.07.2020.)
- [2] S. Beatty, M. Boulton, D. Henson, H.H. Kob, I.J. Murray, *British Journal of Ophthalmology* 83 (1999), 867-877
- [3] G. Kerep, Z. Škrtić, G. Kralik, Z. Kralik, I. Križek, M. Grčević, *Lutein u hranidbi kokoši* 54 (2012), 195 – 203
- [4] [https://nei.nih.gov/health/maculardegen/armd\\_facts](https://nei.nih.gov/health/maculardegen/armd_facts) (datum pristupa: 12.07.2020.)
- [5] Eye Disease Case–Control Study Group, *Jama Ophthalmology*, 111 (1993), 104-109.
- [6] <https://lifestreamgroup.com/ultimate-vision-p-148.html> (datum pristupa: 12.07.2020.)
- [7] <https://www.zdravstveni.com/ostalo/biljni-pripravci/lutein/> (datum pristupa: 12.07.2020.)
- [8] E.J. Johnson, K. McDonald, S.M. Caldarella, H.Y. Chung, A.M. Troen, D.M. Snodderly, *Nutritional neuroscience*, 11 (2008), 75-83.
- [9] J.Y. Jeon, K.E. Kim, H.J. Im, S.T. Oh, S.U.. Lim, H.S. Kwon, C.W. Kang, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 32 (2012) 13-17.
- [10] I. Jang, Y. Ko, S. Kang, S. Kim, M. Song, K. Cho, S. Sohn, *The Journal of Poultry Science*, 51 (2014), 58-65.
- [11] T. Yamamoto, L.R. Juneja, H. Hatta, M.J. Kim, *Hen eggs, their basic and applied science*, CRC Press, Florida, 1997.
- [12] W. Steinberg, M.A. Grashorn, A.M. Klunter, J. Schierle, *Archiv fur Geflugelkunde*, 64 (2000), 180-187.
- [13] S. Leeson, L. Caston, Enrichment of Eggs with Lutein. *Poultry Science*, 83 (2004), 1709–1712
- [14] G. Kralik, Z. Kralik, M. Grčević, D. Hanžek, P. Margeta, O. Galović, *Poljoprivreda* 26 (2020), 56-63
- [15] <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html> (datum pristupa: 15.07.2020.)
- [16] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 2010.
- [17] <https://laboratoryinfo.com/hplc/> (datum pristupa: 15.07.2020.)
- [18] R.K. Saini, S.H. Nile, S.W. Park, *Food Research International* 76 (2015), 735–75

- [19] O. J. Torrissen, R. Christians, *Journal of Applied Ichthyology*. 11 (1995), 225-230
- [20] S. Leeson, L. Caston, H. Namkung, *Can. J. Anim. Sci.* 87 (2007), 365-372
- [21] E. Generalić, "Kalibracija (2018) KTF-Split
- [22] <https://glossary.periodni.com> (datum pristupa: 24. 07. 2020.)
- [23] R.K.Selvaraj, E.A. Koutsos, C.C. Calvert, K.C. Klasing, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90 (2006), 70-80