

# Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju vitamina E iz realnih uzoraka

---

**Mikulec, Morena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:182:473087>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**

*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Preddiplomski studij kemije**

**Morena Mikulec**

**Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju vitamina E iz realnih uzoraka**

**Završni rad**

**Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović**

**Osijek, 2021. godina**

## SAŽETAK

Jaje je namirnica koja sadrži vitamine, mikro- i makroelemente koji su potrebni organizmu kako bi normalno funkcionirao. U sastav su uključeni retinol, kolin, tiamin, kobalamin, riboflavin, vitamini B5 i E, kolesterol, magnezij i ostali elementi koji se pronalaze u sastavu ljudskog tijela. Jedan od važnijih vitamina za ljudsko tijelo je vitamin E koji djeluje kao biokatalizator i antioksidans. Osim što štiti stanicu od štetnog djelovanja slobodnih radikala, vitamin E štiti i druge vitamine poput vitamina B i C. Jednostavna, brza i precizna metoda za ekstrakciju vitamina E ubrzava njegovo određivanje u različitim namirnicama.

Cilj ovog završnog rada je ispitati utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju vitamina E iz realnih uzoraka. Nakon ekstrakcije, koncentracija vitamina E u realnim uzorcima odredit će se pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

Ključne riječi: vitamin E, jaja, ekstrakcija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

## **ABSTRACT**

Eggs contain vitamins, micro and macro elements which are necessary for normal body functions. They contain retinol, choline, lutein, thiamine, cobalamin, riboflavin, vitamin B5, vitamin E, magnesium and other elements which can be found in the human body. Vitamin E is among the most important vitamins for the human body as it acts as a biocatalyst and an antioxidant. In addition, vitamin E protects the cell from the harmful effects of free radicals it also protects other vitamins such as vitamin B and C. A simple, fast and precise method for the extraction of vitamin E accelerates its determination in various foods.

The aim of this final paper is to examine the influence of extraction time on the extraction of vitamin E from real samples. After extraction, the concentration of vitamin E in real sample will be determined by using high-performance liquid chromatography.

Key words: vitamin E, eggs, extraction, high performance liquid chromatography

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	2
2.1. Vitamin E .....	2
2.1.1. $\alpha$ -tokoferol sukcinat .....	3
2.2. Metode određivanja vitamina E u hrani .....	6
2.2.1 Ekstrakcija.....	6
2.2.1.1. Soxhlet ekstrakcija .....	8
2.2.1.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	9
2.2.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	18
2.2.3. Kromatografija .....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. Reagensi .....	22
3.2. Instrumentacija.....	22
3.3. Realni uzorci .....	22
3.4. Postupak analize.....	22
3.4.1. Priprema realnih uzoraka za analizu vitamina E .....	22
3.4.2. Priprema 0,2 % BTH u metanolu .....	24
3.4.3. Priprema HPLC uređaja za određivanje sadržaja vitamina E.....	26
3.4.4. Analiza realnih uzoraka.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	28
4.1. Određivanje koncentracije vitamina E u jajima .....	28
5. ZAKLJUČAK .....	34
6. POPIS LITERATURE .....	35

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.

## 1. UVOD

Vitamin E je lipofilni vitamin koji je topljiv u masti. Osjetljiv je na svjetlost i toplinu, stoga je bitno voditi brigu o obradi namirnica koje ga sadrže kako bi se smanjio njegov gubitak. Preporuka je da se ulja i orašasti plodovi (koji sadrže veće količine vitamina E) čuvaju na mračnim i zatvorenim mjestima [1]. Preporučeni dnevni unos vitamina E za odraslog čovjeka iznosi 15 mg [2].

Istraživanja su pokazala kako vitamin E može djelovati kao biokatalizator i antioksidans. Ovaj vitamin reagira s reaktivnim kisikovim vrstama, poput hidroksidnih radikala te ih inaktivira prije nego što stignu oksidirati nezasićene membrane lipida i tako oštetiti strukturu stanice [3].

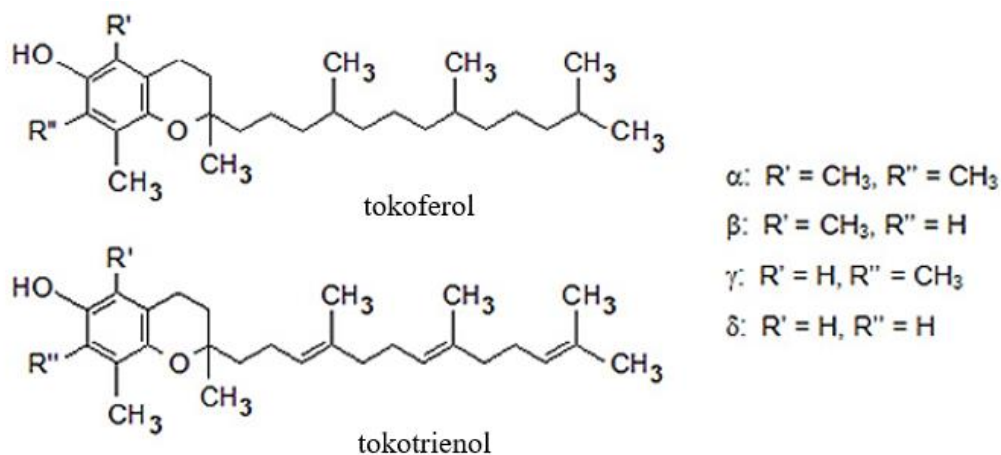
Najnovija istraživanja pokazuju kako visoka koncentracija vitamina E u plazmi ima utjecaj na kardiovaskularne bolesti i rak. Tumor je medicinski termin koji predstavlja nakupinu stanica koje se nekontrolirano dijele te otežavaju normalan rad ostalih stanica, a rak je naziv za zloćudne tumore [2]. Nedovoljan unos vitamina E može imati neželjene posljedice za ljudski organizam dok kod muškaraca može, primjerice, izazvati inhibiciju stvaranja spermija [3].

U radu je opisana struktura vitamin E i  $\alpha$ -tokoferol sukcinata (najučinkovitiji oblik vitamina E koji pokazuje najbolje antitumorsko djelovanje). Također su opisane metode određivanja vitamina E u hrani te su neke potkrijepljene primjerom. U ovom radu ispituje se utjecaj vremena ekstrakcije na količinu ekstrahiranog vitamina E tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC, eng. *High performance liquid chromatography*).

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Vitamin E

Vitamin E sačinjavaju spojevi od osam različitih oblika, a to su  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokoferoli i  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokotrienoli. Struktura vitamina E sadrži kromanolni prsten i bočni lanac koji je vezan za ugljikov atom na položaju 2. Na Slici 1 vidljive su strukture tokoferola i tokotrienola. Tokoferoli sadrže zasićeni bočni lanac, dok tokotrienoli sadrže nezasićeni bočni lanac s tri dvostruke veze na ugljikovim atomima koji se nalaze na položajima 11., 3. i 7. (dvostruka veza na 3. i 7. položaju nalaze se u trans-konfiguraciji). Na kromanolni prsten vežu se različite skupine (metilna skupina i vodik). Četiri oblika tokoferola i tokotrienola razlikuju s obzirom na broj i položaj skupina koje se vežu na prsten [4].



Slika 1: Struktura homologa vitamina E [4].

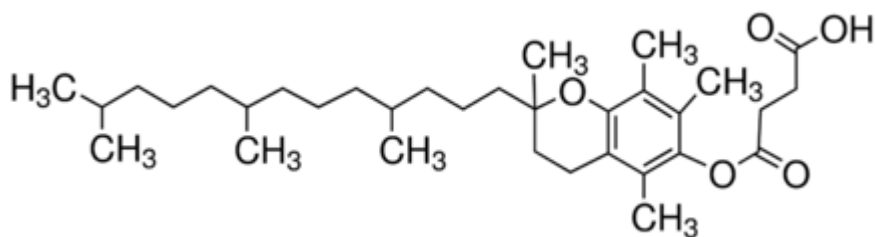
Najrasprostranjeniji oblik vitamina E je  $\alpha$ -tokoferol (ima sva tri ugljikova atoma u R-konfiguraciji). Sudjeluje u različitim procesima u stanicama i pokazuje najveće antioksidativno djelovanje te su rađena istraživanja u kojima se ispitaio njegov utjecaj na Alzheimerovu bolest, oksidativni stres i rak [5]. Glavno mjesto skladištenja vitamina E su adipozna tkiva (90 %), jetra i mišići dok se u stanicama nalazi u slobodnom i veznom obliku [1].



Postoje i esterski oblici tokoferola i tokotrienola, a neki od njih su acetat, nikotinat, sukcinat i fosfat. Osim tokoferola i tokotrienola u prirodi se mogu pronaći i tokomonoenoli te tokodienoli [4].

### 2.1.1. $\alpha$ -tokoferol sukcinat

Kao što je poznato rak se liječi kemoterapijom ili zračenjem, a upravo je  $\alpha$ -tokoferol sukcinat pokazao najbolje učinke prilikom liječenja raka u kombinaciji s različitim mikroelementima. Prema dostupnim istraživanjima  $\alpha$ -tokoferol sukcinat utječe na tumorska tkiva prostate i dojke. Po kemijskom sastavu to je ester vitamina E čija je struktura prikazana na Slici 2.

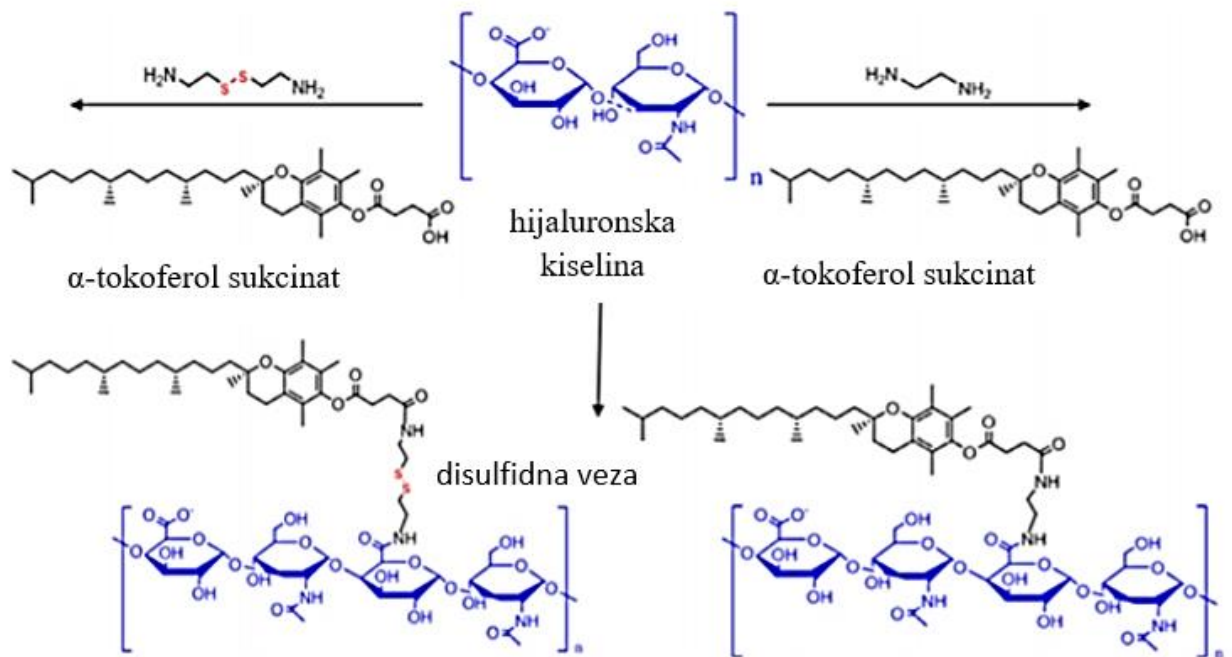


Slika 2: Struktura  $\alpha$ -tokoferol sukcinat [5].

Istraživanja su provedena na miševima koji su imali tumorska tkiva, no nisu svi miševi pokazali jednake rezultate iz čega se može zaključiti kako je učinak za svakog pojedinca nepredvidljiv. Objašnjenje ovakvog učinka nije u potpunosti istraženo, no uvođenjem dodatnog lijeka u liječenje pruža moguće rješenje problema. Jedno od objašnjenja naznačuje kako kombinacija  $\alpha$ -tokoferol sukcinata i kemoterapeutika neće istovremeno doći do tumorskog tkiva u predviđenom omjeru. Kako bi se eliminirala mogućnost kašnjenja jednog lijeka u liječenje se uvode nanostrukturirani nosači lipida [5]. Nanostrukturirani nosači lipida su sustav za isporuku lijekova koji sadrži čvrste lipide, tekući lipid i surfaktant u vodenom mediju, što rezultira izrazito dobrom topljivosti, visokom bioraspoloživosti te štite aktivne biomolekule od degeneracije i pružaju neprekidno oslobađanje lijeka [6]. Kombinacija nanostrukturiranih nosača lipida sa  $\alpha$ -tokoferol sukcinatom i kemoterapeutikom koji su uzeti u omjeru 1:4 pokazala je pozitivan učinak na antitumorsku aktivnost u *in vivo* modelima [5].

Glavni problem koji se javlja u liječenju kemoterapijom je blokada kemoterapeutika. Kada se govori o blokadi kemoterapeutika misli se na otpornost na više lijekova koja se može pojaviti uslijed prevelikog pumpanja lijeka iz stanice do kojeg dolazi zbog visoke koncentracije adenozin-trifosfata. Ako se u cijelu priču uključi  $\alpha$ -tokoferol sukcinata dobiva se smanjena blokada kemoterapeutika. Naime dokazano je inhibitorско djelovanje  $\alpha$ -tokoferol sukcinata na ATPazu tj. enzim koji je zaslužan za sintezu adenozin-trifosfata i pritom ne utječe na funkciju mitohondrija [7].

Prema dostupnom istraživanju  $\alpha$ -tokoferol sukcinat se kombinirao s polimernim micelama i hijaluronskom kiselinom. Kombinacija s polimernim micelama pokazala se učinkovitom za dostavu lijekova u tumorsko tkivo. Kombinacija s hijaluronskom kiselinom pokazala je kako hijaluronska kiselina može biti dobar ligand jer pokazuje visoku specifičnost vezanja i biorazgradivosti. Hijaluronska kiselina ima specifično svojstvo vezanja na CD44 receptor pri prevelikoj ekspresiji raka u stanicama. U ovom istraživanju hijaluronska kiselina je predstavnik hidrofilne komponente koja ima afinitet za blokiranje otpornosti na više lijekova, dok je  $\alpha$ -tokoferol sukcinat predstavnik hidrofobne komponente te zajedno čine polimer koji se može prilagoditi raku. Slika 3 prikazuje kako je između hijaluronske kiseline i  $\alpha$ -tokoferol sukcinata stavljen cisteamin koji djeluje kao bioreducibilna veza. Upravo se na takvu kombinaciju vezao paklitaksel (služi kao antikancerogena komponenta) te je u konačnici došlo do promjene u otpornosti na lijek. Slika 3 prikazuje sintezu kombinacije hijaluronska kiselina – etilendiamin –  $\alpha$ -tokoferol sukcinat koja služi kao kontrola kako bi se riješilo pitanje može li veza koja je osjetljiva na redoks povećati učinkovitost u liječenju raka te se dokazalo kako upravo takva kombinacija hijaluronske kiseline – cisteina –  $\alpha$ -tokoferol sukcinata – paklitaksela može utjecati na promjenu otpornosti na lijek [7].



Slika 3: Sintetski prikaz kombinacije hijaluronske kiseline – cisteina – α-tokoferol sukcinata i kombinacije hijaluronska kiselina – etilendiamin – α-tokoferol sukcinat [7].

Ako je prisutna visoka koncentracija glutationa koji je antioksidans, u tumorskom tkivu dolazi do pucanja disulfidne veze i tada kombinacija hijaluronske kiseline – cisteina - α-tokoferol sukcinata – paklitaksela može otpustiti paklitaksel koji ima antitumorsko djelovanje. Bitno je napomenuti kako sukcinat vitamini djeluju kao inhibitori p-glikoproteina te se tako u tumorskim stanicama mogu skupljati veće količine lijeka [7].

## 2.2. Metode određivanja vitamina E u hrani

Većina organskih spojeva u prirodi nalazi se u heterogenoj ili homogenoj smjesi s drugim spojevima te se ciljane tvari u čistom obliku dobiva nizom metoda. Metode pomoću kojih se dobiva ciljane tvari u čistom obliku su: ekstrakcija, prekristalizacija, sublimacija (pogodna za krutine), destilacija i kromatografske metode [8].

### 2.2.1 Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda izolacije i čišćenja ciljanje tvari iz krute ili tekuće smjese pomoću prikladnog otapala u kojemu je ta tvar topljiva ili ima veću topljivost od ostalih tvari koje su prisutne u uzorku. Otapalo koje je uzeto za ekstrakciju mora se što više razlikovati u gustoći od otopine u kojoj se nalazi tvar koju je potrebno izolirati. Poželjno je da otapalo bude što manje zapaljivo i otrovno te što jeftinije. Najčešće korištena otapala su: dietil-eter, benzen, kloroform, petroleter i diklormetan. Ekstrakcije se prema agregatnom stanju faza dijele na ekstrakciju čvrsto-tekuće i ekstrakciju tekuće-tekuće [8].

Ekstrakcija tekuće-tekuće naziva se i izmućkavanje jer su prisutne dvije tekuće faze (između kojih dolazi do razdjeljenja tvari) koje se međusobno ne miješaju. Slika 4 prikazuje lijevak za odjeljivanje u kojem se vrši ekstrakcija i u njemu se stvara velika dodirna površina između dvije tekuće faze. Dodirna površina se javlja zbog već spomenutog svojstva (faze se međusobno ne miješaju) te na taj način dolazi do brzog prijelaza tvari iz jednog otapala u drugo. Ekstrakcija pokazuje bolje rezultate ako se provodi više puta s manjom količinom otapala (preporučljivo da se ekstrakcija ponovi tri puta) i to potvrđuje *Nernstov zakon razdjeljenja* prikazan izrazom (1) koji pokazuje da je omjer koncentracija (množinskih ili masenih) tvari u dva otapala konstantan:

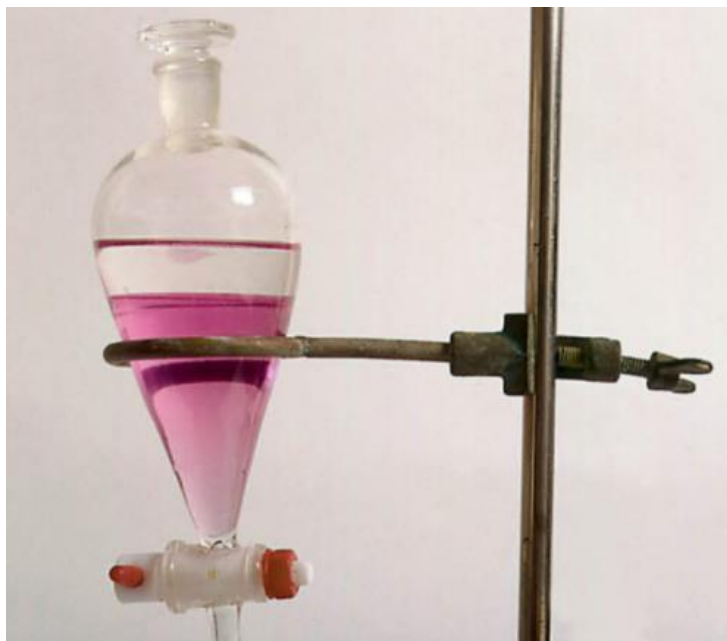
$$K = \frac{c_1}{c_2} \quad (1)$$

gdje je:

$K$  – koeficijent razdjeljenja (konstantan pri određenoj temperaturi),

$c_1$  – koncentracija tvari u otapalu kojim ekstrahiramo ( $mol\ dm^{-3}$ )

$c_2$  – koncentracija tvari u otapalu iz kojeg ekstrahiramo ( $mol\ dm^{-3}$ ) [8].



Slika 4: Prikaz ekstrakcije tekuće-tekuće (gornji sloj manja gustoća i donji sloj veća gustoća) [9].

Primjer ekstrakcije tekuće-tekuće je određivanje vitamina E iz majčinog mlijeka upotrebom ekstrakcije s heksanom. Ekstrakcija se vrši pomoću dvije metode: metoda ekstrakcije uz prethodno primijenjenu saponifikaciju i metoda izravne ekstrakcije.

#### Metoda 1 – Ekstrakcija uz prethodno primijenjenu saponifikaciju

U mlijeko se dodaje standard  $\delta$ - tokoferol te se kasnije dodaje metanol koji sadržava pirogalol i na kraju vodena otopina KOH. Uzorci se promiješaju pomoću treskalice i stavljaju se u vodenu kupelj. Saponifikacija se vrši na  $70\ ^\circ C$  tijekom 30 minuta. Nakon prvih 15 minuta saponifikacije epruvete se vade iz vodene kupelji te se kratko promiješaju pomoću treskalice. Nakon saponifikacije uzorci u epruvetama su zakiseljeni do  $pH = 2$  sa  $6\ M\ HCl$  te stavljeni hladiti u led. Nakon hlađenja dodaje se heksan i vrše se tri serije miješanja u trajanju od 20 s uz držanje epruveta u ledu između svakog miješanja. Dobivena emulzija odjeljuje se centrifugiranjem na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Dobiveni organski (gornji) sloj prikupi se i upari pod strujom dušika na  $40\ ^\circ C$ . Ostatku nakon uparavanja dodaje

se smjesa metanol : propan-2-ol u omjeru 1 : 1 uz zagrijavanje na 30 °C. Opisanom metodom izmjerena je koncentracija standarda  $\delta$ - tokoferol koja iznosi  $99,6 \pm 4,0$  % njegove početne koncentracije [10].

#### Metoda 2 – Izravna ekstrakcija

U mlijeko se dodaje standard  $\delta$ - tokoferol te se potom dodaje metanol koji sadrži pirogalol. Pripremljeni uzorci se stavljaju u led na hlađenje 10 minuta. Nakon hlađenja u uzorke se dodaje heksan i vrši se ekstrakcija. Ekstrakcija, uparavanje i određivanje koncentracije  $\delta$ - tokoferola identično je postupku koji je opisan u Metodi 1. Opisana metoda rezultirala je izmjerenom koncentracijom standardna  $\delta$ - tokoferola koja iznosi  $60 \pm 15$  % njegove početne koncentracije [10].

U obje metode dodan je metanol koji sadrži pirogalol (1,2,3-trihidroksibenzen) koji štiti vitamin E od moguće razgradnje tijekom ekstrakcije i saponifikacije. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da se obje metode mogu koristiti za određivanje vitamina E u majčinom mlijeku iako rezultati pokazuju da je ekstrakcija nakon saponifikacije (Metoda 1) značajno poboljšala pouzdanost konačnih podataka [10].

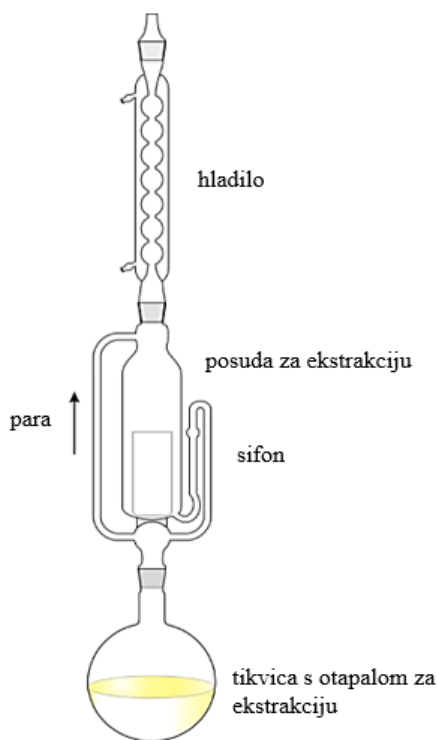
#### 2.2.1.1. Soxhlet ekstrakcija

Ekstrakcija čvrsto-tekuće je ekstrakcija u kojoj imamo tekuću fazu (otapalo) i čvrstu fazu iz koje se izdvaja analit. Može se provoditi pri sobnoj ili povišenoj temperaturi. Ukoliko se provodi pri povišenoj temperaturi provodi se pomoću kontinuirane i višekratne ekstrakcije. Slika 5 prikazuje Soxhlet aparaturu u kojoj se izvodi Soxhlet ekstrakcija [8].

Soxhlet ekstrakcija se prvenstveno primjenjivala za ekstrakciju lipida iz čvrstih uzoraka. Koristi se kada željeni spoj ima malu topljivost u otapalu, a nečistoće su netopljive u tom otapalu. Iako je metoda jednostavna kao i sama aparatura ona ima mnoge nedostatke kao što je dugo vrijeme ekstrakcije (čak do 24 sata) i potrebne su značajne količine otapala. Prilikom izvođenja ekstrakcije potreban je veliki oprez jer se kao otpala često koriste petroleter i dietil-eter koji su lako zapaljive tekućine [8].

Aparatura za Soxhlet ekstrakciju sastoji se od perkloratora, cilindra i sifonskog mehanizma. Perklorator je dio kojim protječe otopina, a sastoji se od grijača za vodu i

refluksa. Funkcija sifonskog mehanizma je pražnjenje cilindra koji se tijekom ekstrakcije puni. Ekstrakcija se izvodi tako da se od filter-papira napravi tuljac koji se napuni usitnjenim uzorkom, dobro zatvori vatom i stavi u unutarnji dio posude za ekstrakciju. Posuda za ekstrakciju spoji na tikvicu s otapalom. Prilikom zagrijavanja dolazi do isparavanja otapala, nastale pare bočna cijev odvodi do hladila gdje se kondenziraju. Kondenzirano otapalo (nastaju kapljice) ulazi u posudu za ekstrakciju u kojoj se nalazi tuljac pri čemu se analit ekstrahira iz uzorka. Posuda za ekstrakciju se puni i kada se sifon ispuni otapalom, otapalo se preljeva u tikvicu. Proces se odvija sve dok se analit iz uzorka nije potpuno ekstrahirao, tj. do obezbojenja što ukazuje na smanjenu koncentracije tvari u uzorku koja se ekstrahira odnosno na povećanje koncentracije ekstrahiranog analita u tikvici [8].

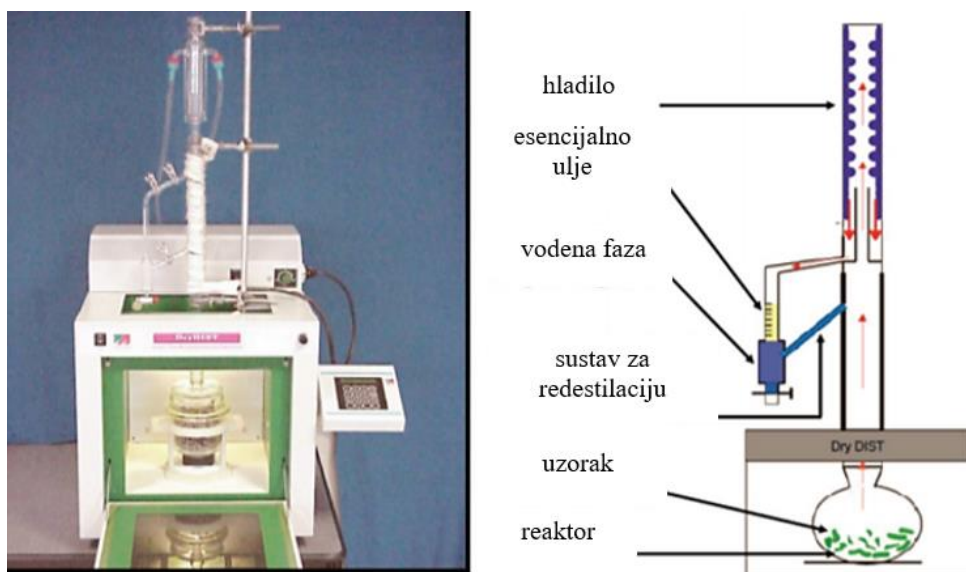


Slika 5: Aparatura po Soxhletu [11].

#### 2.2.1.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi valne duljine od 0,1 mm do 300 mm odnosno frekvencije od 1 GHz do 300 GHz. Elektromagnetski valovi su sačinjeni od magnetskog i električnog polja koja međusobno osciliraju. Emitiraju ih svi topli objekti, a njihova frekvencija ovisi o temperaturi izvora [12].

Slika 6 prikazuje uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima koja se danas često koristi zbog kraćeg vremena ekstrakcije i smanjene količine otapala. Poželjno je provoditi ekstrakciju više puta s manjom količinom otapala te se na taj način povećava koncentracija ekstrahirane tvari u ekstraktu. Upotrebom mikrovalova dolazi do zagrijavanja otapala s uzorkom što rezultira uspješnom ekstrakcijom. Mikrovalovi djeluju na uzorak koji potom apsorbira dio elektromagnetske energije i transformira ju u toplinu [13].



Slika 6: Uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima [14].

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima zasniva se na djelovanju mikrovalova na uzorak prilikom čega dolazi do transformacije elektromagnetske energije u toplinu. Transformacija se odvija prolazeći ionsku kondukciju i rotaciju dipola. Ionska kondukcija je proces prijenosa energije uslijed gibanja kationa i aniona. Dolazi do premještanja kationa i aniona s jednog mjesta na drugo mjesto ovisno o ionskom gradijentu. Kationi se gibaju prema negativno nabijenom mjestu dok se anioni gibaju prema pozitivno nabijenom mjestu. Otpor topline ionskoj kondukciji i sudari među molekulama posljedica su mijenjanja smjera gibanja kationa i aniona. Promjena magnetskog polja prouzroči trenje koje pospješuje zagrijavanje otopine [15].

Rotacija dipola je prisutna u uzorku koji sadrži polarne molekule koje imaju električni dipolni moment. Kako bi došlo do rotacije dipola neophodna je frekvencija od 10 do 100 MHz iako je kod tekućina primijećen bolji učinak zagrijavanja kod nižih frekvencija.



Smanjenjem električnog polja povećava se entropija sustava (mjera neuređenosti s kojom je energija pohranjena u nekom fizikalnom sustavu) što uzrokuje oslobađanje topline [13].

Prilikom ekstrakcije potrebno je voditi brigu o prikladnom otapalu kako bi se postigli optimalni uvjeti ekstrakcije [16].

Velikim djelom na ekstrakciju utječe i sastav uzorka. Ako je u uzorku prisutna voda (polarna molekula koja ima visoki dipolni moment) doći će do jakog apsorbiranja mikrovalova i samim time do bolje ekstrakcije. Ako je uzorak suha tvar potrebno ga je prije ekstrakcije rehidrirati vodom [17].

U novije vrijeme se sve više koristi mikrovalna ekstrakcija, a u Tablici 1 navedena su dva primjera mikrovalne ekstrakcije.

Tablica 1. Primjeri mikrovalne ekstrakcije [14].

Materijal	Metode	Snaga i frekvencija	Temperatura	Vrijeme metode	Rezultati
ulje rižinih mekinja	standardna ekstrakcija	/	40 °C	15 minuta	Primjer 1
	mikrovalna ekstrakcija	500 W	40 °C, 60 °C, 80 °C, 100 °C i 120 °C	15 minuta	
suncokretovo ulje	mikrovalna ekstrakcija	2450 MHz	25 °C - 100 °C	2, 4, 6, 8 i 10 sati	Primjer 2

Primjer 1:

Tablica 3 prikazuje ukupnu količinu vitamina E koja je dobivena standardnom ekstrakcijom svježih mekinja riže izopropanolom (87,46 µg / g) i heksanom (52,64 µg / g) pri temperaturi 40 °C. Rezultati dobiveni izvođenjem ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ne pokazuju odstupanja od rezultata koji su dobiveni standardnom ekstrakcijom.. Kada se gledaju rezultati promjena udjela pojedinih komponenata vitamina E s vremenom, može se zaključiti kako se izvođenjem ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (heksan se koristi kao otapalo) pri višim temperaturama ostvaruju bolji

rezultati ekstrakcije  $\alpha$ -tokotrienola. Kada se kao otapalo koristi izopropanol, povišenjem temperature pospješuje se ekstrakcija  $\alpha$ -tokotrienola i  $\gamma$ -tokoferola što je vidljivo u Tablici 2. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima kao i standardna ekstrakcija nemaju značajan utjecaj na promjenu u strukturi ekstrahiranih spojeva [14, 18].

Tablica 2. Ukupna količina vitamina E i pojedinih komponenti vitamina E [18].

Temperatura (°C)	Otapalo	Vitamin E ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\alpha$ - tokoferol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\alpha$ - tokotrienol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\gamma$ -tokoferol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\gamma$ - tokotrienol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
40	izopropanol	95,41 $\pm$ 2,38	43,89 $\pm$ 2,23	8,19 $\pm$ 0,19	5,37 $\pm$ 0,16	37,96 $\pm$ 1,21
60	izopropanol	97,46 $\pm$ 1,76	43,83 $\pm$ 2,30	8,27 $\pm$ 0,66	5,44 $\pm$ 0,09	39,93 $\pm$ 0,50
80	izopropanol	124,56 $\pm$ 13,26	59,16 $\pm$ 12,67	15,31 $\pm$ 1,72	6,33 $\pm$ 0,07	43,76 $\pm$ 1,47
100	izopropanol	137,80 $\pm$ 15,47	64,69 $\pm$ 9,26	22,74 $\pm$ 0,99	6,90 $\pm$ 0,98	43,48 $\pm$ 5,34
120	izopropanol	152,31 $\pm$ 11,35	47,79 $\pm$ 3,83	54,50 $\pm$ 4,17	7,29 $\pm$ 0,50	42,73 $\pm$ 3,68
40	heksan	56,22 $\pm$ 28,15	26,54 $\pm$ 15,23	9,07 $\pm$ 3,11	3,25 $\pm$ 1,11	17,36 $\pm$ 8,74
60	heksan	81,49 $\pm$ 7,62	34,86 $\pm$ 6,28	12,90 $\pm$ 1,25	4,42 $\pm$ 0,17	29,31 $\pm$ 0,67
80	heksan	66,40 $\pm$ 10,67	26,04 $\pm$ 4,45	14,90 $\pm$ 2,18	3,44 $\pm$ 0,75	22,01 $\pm$ 3,62
100	heksan	98,19 $\pm$ 14,80	27,49 $\pm$ 7,20	45,99 $\pm$ 5,44	3,71 $\pm$ 1,03	21,00 $\pm$ 4,64
120	heksan	248,50 $\pm$ 78,11	35,49 $\pm$ 3,62	183,76 $\pm$ 72,70	4,77 $\pm$ 0,41	24,49 $\pm$ 3,10

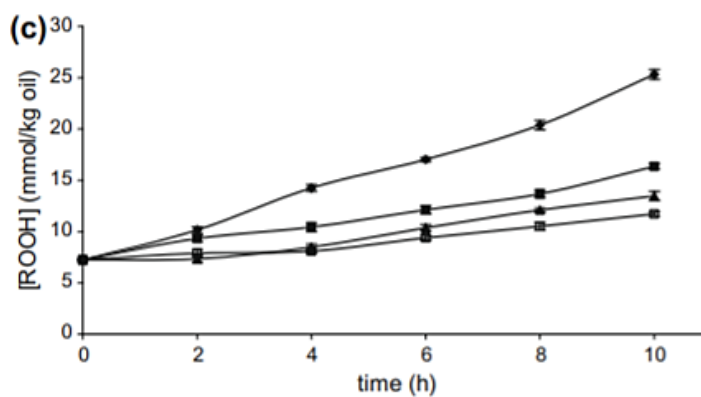
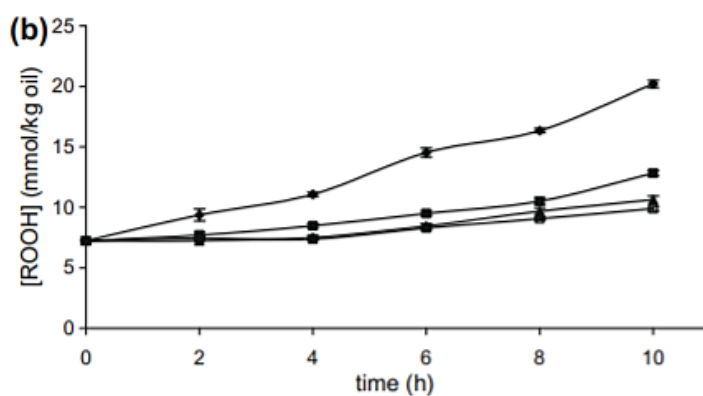
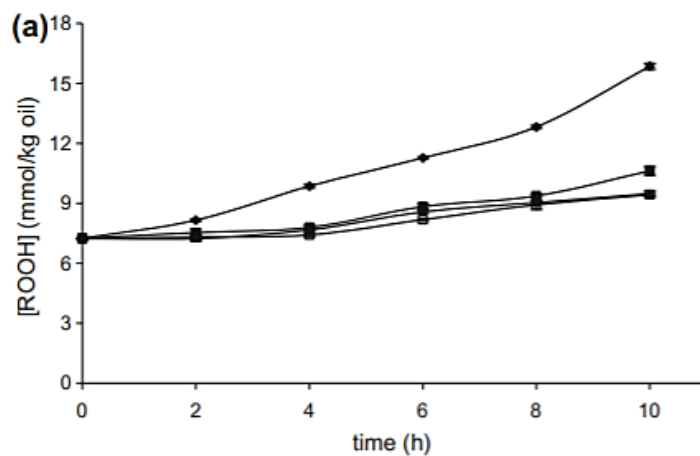
Tablica 3. Ukupna količina vitamina E i pojedinih komponenti vitamina E određenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (ME) i standardnom ekstrakcijom (SE) pri temperaturi 40 °C [18].

Otapalo	Metoda	Vitamin E ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\alpha$ - tokoferol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\alpha$ - tokotrienol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\gamma$ -tokoferol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\gamma$ - tokotrienol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
izopropanol	ME	95,41 $\pm$ 2,38	43,89 $\pm$ 2,23	8,19 $\pm$ 0,19	5,37 $\pm$ 0,16	37,96 $\pm$ 1,21
izopropanol	ME	56,22 $\pm$ 28,15	26,54 $\pm$ 15,23	9,07 $\pm$ 3,11	3,25 $\pm$ 1,11	17,36 $\pm$ 8,74
heksan	SE	87,46 $\pm$ 7,41	32,50 $\pm$ 5,03	8,48 $\pm$ 0,45	5,94 $\pm$ 0,13	40,54 $\pm$ 1,89
heksan	SE	52,64 $\pm$ 9,08	20,73 $\pm$ 7,30	8,31 $\pm$ 0,99	3,93 $\pm$ 0,64	19,68 $\pm$ 3,30

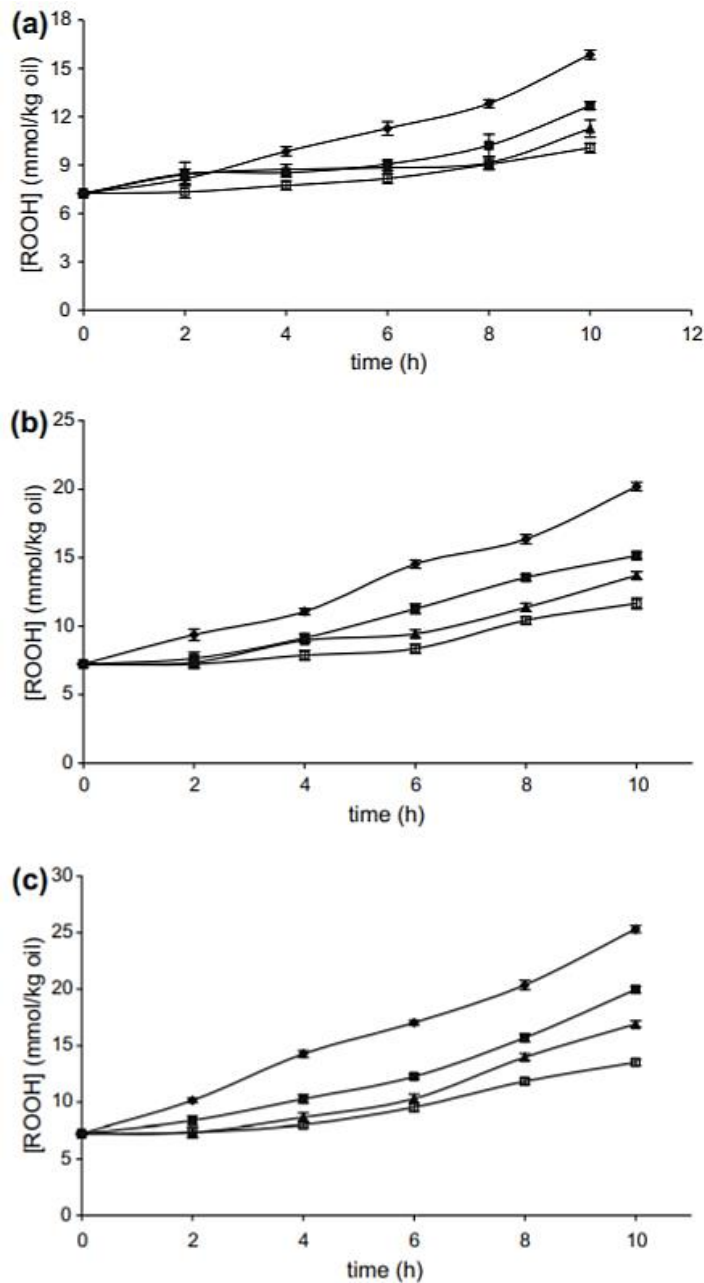
#### Primjer 2:

Istražen je antioksidativni učinak karnozinske kiseline i sezamola na suncokretovo ulje djelovanjem mikrovalova i promjenom temperature (40 °C, 60 °C i 80 °C) u različitim vremenskim periodima (2, 4, 6, 8 i 10 sati). Korištenjem spektrofotometrije određene su koncentracije konjugiranog dien hidroperoksida i p-anisidina (služe kao mjera oksidacije) primjenom mikrovalova na suncokretovo ulje u koje se dodao odnosno nije dodao antioksidans [14, 19].

Prvim mjerenjem dobiveni su konačni rezultati primjenom mikrovalova koji pokazuju kako je karnozinska kiselina djelotvorniji antioksidans za suncokretovo ulje. Prati se stvaranje konjugiranog diena hiperoksida oksidacijom suncokretovog ulja primjenom mikrovalova uz dodatak karnozinske kiseline (Slika 7) i sezamola (Slika 8) dodane u koncentracijama od 0,005 g na 100 g, 0,01 g na 100 g i 0,02 g na 100 g pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C i uz vremensko praćenje svaka 2, 4, 6, 8 i 10 sati. Dobiveni rezultati pokazuju kako se koncentracija hidroperoksida smanjuje povećavanjem dodatka koncentracije karnozinske kiseline ili sezamola u suncokretovo ulje (najbolje se uočava na temperaturi od 80 °C). Također je primijećena bolja aktivnost karnozinske kiseline od sezamola za sve tri gore navedene temperature [14, 19].



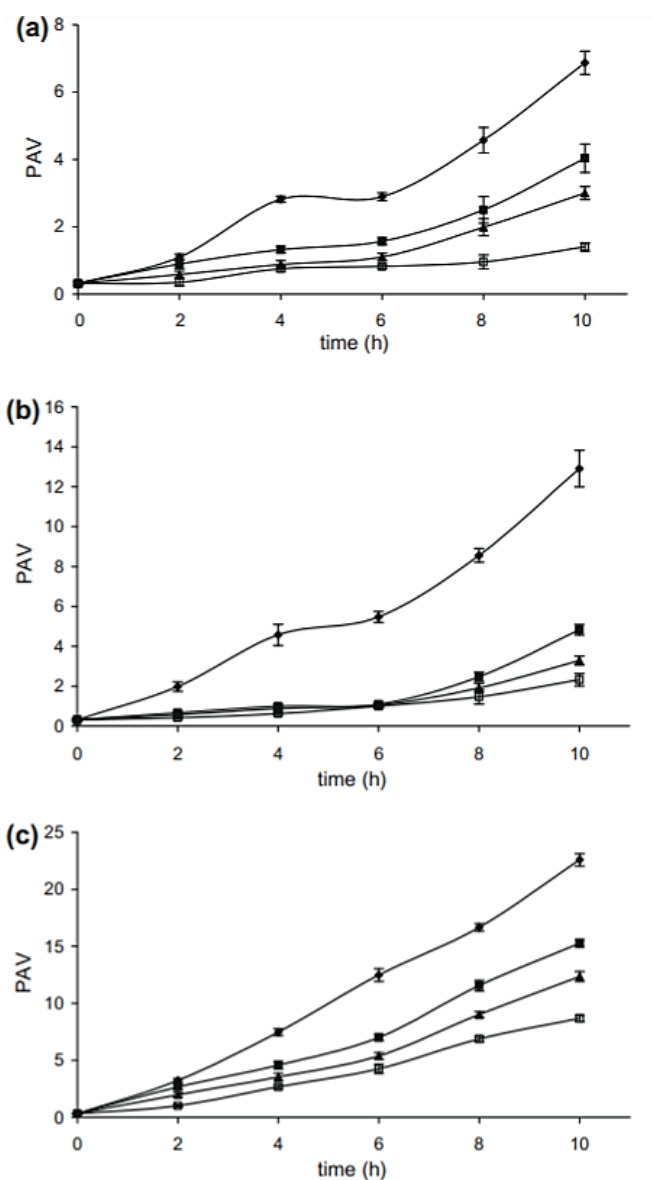
Slika 7: Koncentracije nastalih konjugiranih diena hidroperoksida u uzorku dodatkom karnozinske kiseline [19].



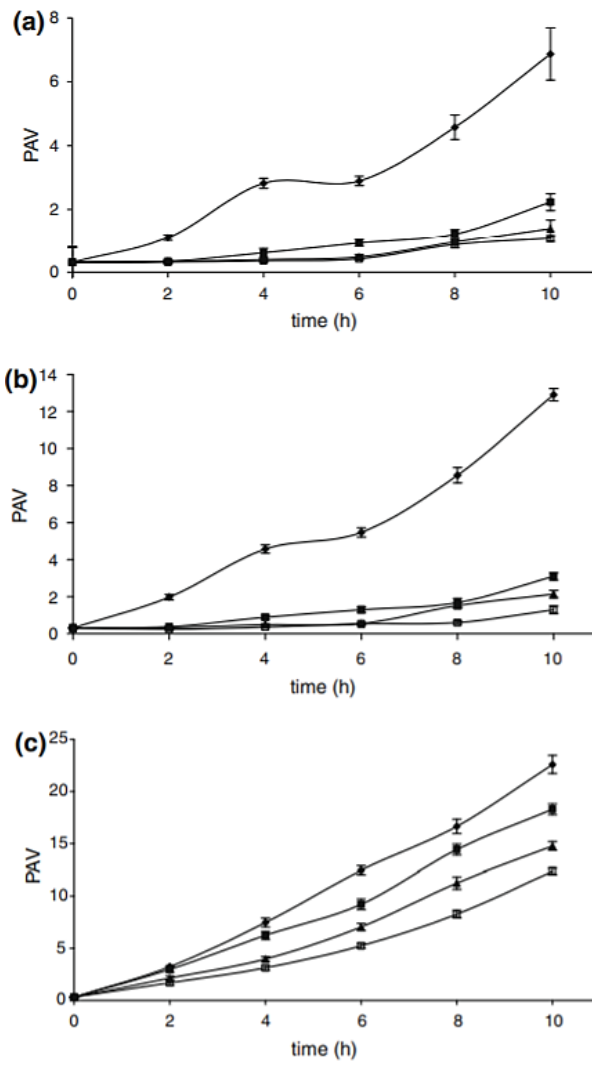
Slika 8: Koncentracije nastalih konjugiranih diena hidroperoksida u uzorku dodatkom sezamola [19].

Drugim mjerenjem dobiveni su rezultati za reaktivnost tvari koja je dobivena oksidacijom tijekom mikrovalnog grijanja suncokretovog ulja na temperaturama od 40 °C, 60 °C i 80 °C također uz prisutnost karnozinske kiseline i sezamola. Tablica 4 prikazuje rezultate dobivene linearnom regresijskom analizom iz koji se može zaključiti kako su i karnozinska kiselina i sezamol podjednako uspješni u sprječavanju nastanka reaktivne tvari

(p-anisidin), a najbolji učinak je primijećen kod koncentracije 0,02 g na 100 g uzorka pri temperaturi od 80 °C. Kako se povećavala temperatura tako je uočen gubitak karnozinske kiseline i sezamola iako se koncentracija karnozinske kiseline znatno brže smanjuje nego koncentracija sezamola [14, 19].



Slika 9: Vrijednost p-anisidina nastalog oksidacijom uz dodatak karnozinske kiseline [19].



Slika 10: Vrijednost p-anisidina nastalog oksidacijom uz dodatak sezamola [19].

Tablica 4. Rezultati brzine oksidacije dobiveni linearnom regresijskom analizom [19].

T (°C)	40	60	80
Koncentracija antioksidans	R <sup>2</sup>		
0,005 g / 100 g karnozinske kiseline	0,9261	0,9346	0,9886
0,01 g / 100 g karnozinske kiseline	0,9205	0,8467	0,9345
0,02 g / 100 g karnozinske kiseline	0,8674	0,8563	0,9516
0,005 g / 100 g sezamola	0,8915	0,9601	0,9626
0,01 g / 100 g sezamola	0,8400	0,9156	0,8820
0,02 g / 100 g sezamola	0,8830	0,8358	0,8817

### 2.2.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

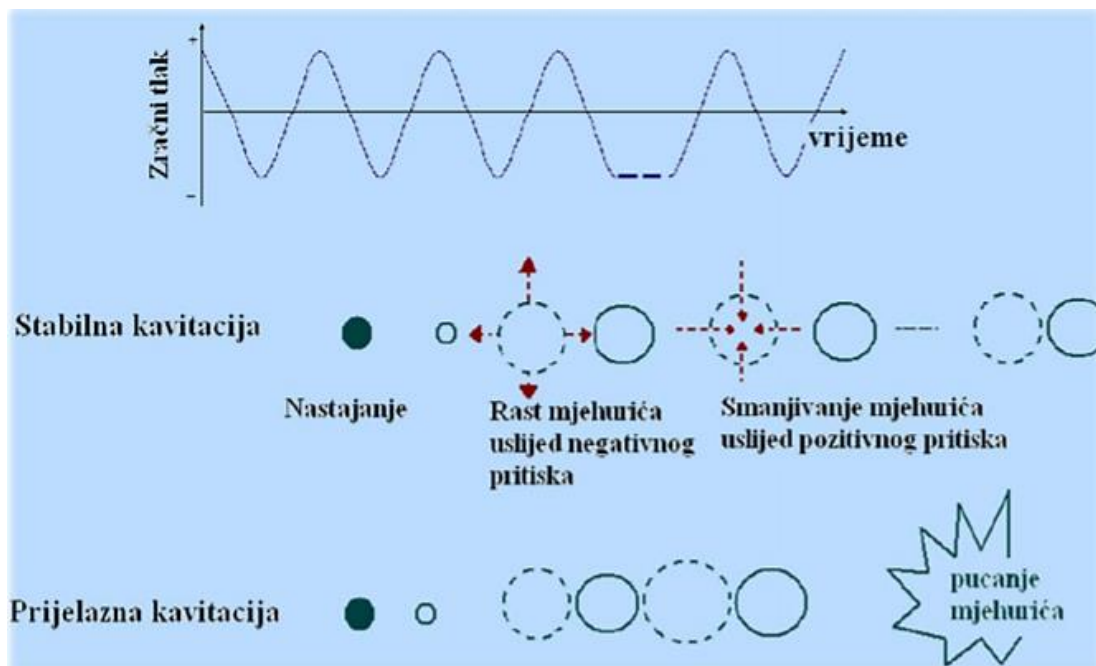
Ultrazvuk je zvučni val kojem je frekvencija viša od 20 kHz. Kemičare ponajviše zanima učinak ultrazvuka u tekućem mediju. U tekućem mediju prisutan je fenomen kavitacije koji nastaje procesima koji stvaraju, povećavaju i smanjuju mjehuriće plina koji su otopljeni u tekućem mediju. Kavitacija u tekućem mediju može ubrzati kemijsku reakciju pospješujući miješanje reaktanata, poticati različite kemijske reakcije stvarajući slobodne kemijske radikale, potaknuti reakciju polimerizacije kao i depolimerizacije, olakšati ekstrakciju tvari kao što su enzimi iz stanica te ukloniti viruse iz zaraženog tkiva [20].

Tekući medij sastoji se od molekula koje su međusobno zbijene zbog prisutnosti privlačnih sila. Kada se ultrazvukom djeluje na tekući medij, kao longitudinalnim valom,



stvara se izmjenični tlak i ekspanzijski vrtlog. Ekspanzijski vrtlog dovodi do niskog tlaka i kada tlak postane dovoljno nizak (da savlada privlačne sile koje su prisutne u tekućem mediju) formiraju se mali mjehurići. Upravo to formiranje mjehurića naziva se kavitacija. Na Slici 11 prikazana je stabilna i prijelazna kavitacija tj. prikazan je rast i raspad mjehurića. Zbog djelovanja ultrazvuka veličina mjehurića se mijenja. Mjehurić se povećava tijekom kontinuiranih ciklusa ekspanzije i kompresije te se na taj način poboljšava difuzija plina što rezultira rastom mjehurića nakon svakog ciklusa. Mjehurići koji su nastali kavitacijom rastu dok ne dosegnu određenu veličinu nakon koje će se raspasti dok će se kompresijske pare kondenzirati [21].

Raspadanjem mjehurića molekule su prisiljene na sve snažnije međusobno sudaranje što uzrokuje ekstremno visoku temperaturu (5000 K) [22] i visoki tlak (104 –105 kPa), a taj se fenomen naziva prijelazna kavitacija.



Slika 11: Stabilna i prijelazna kavitacija [20].

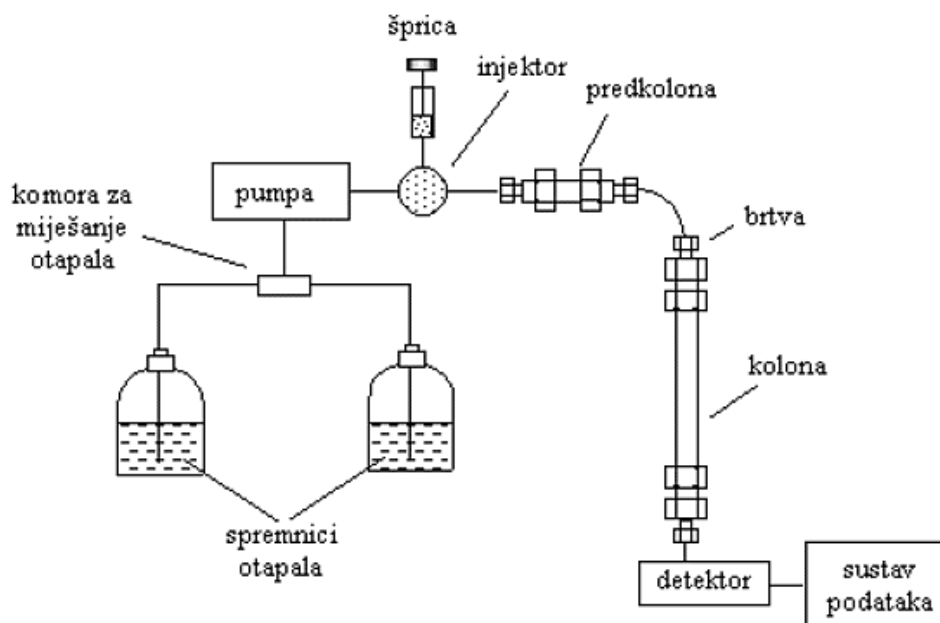
### 2.2.3. Kromatografija

Kromatografija je metoda pomoću koje se razdvajaju homogene smjese. Temelji se na selektivnoj adsorpciji. U kromatografiji razlikujemo stacionarnu fazu i mobilnu fazu. Kromatografija se odvija kada se uspostavi dinamička ravnoteža nekog spoja između stacionarne i mobilne faze. Razlikuje se razdjelna i adsorpcijska kromatografija [8]. U razdjelnu kromatografiju ubraja se plinska kromatografija kod koje je stacionarna faza mikroskopski sloj tekućine ili polimera na inertnoj krutoj podlozi, a mobilna faza je plin (inertan plin kao što je helij ili dušik) [23]. U adsorpcijsku kromatografiju ubrajaju se kromatografija na stupcu, tankoslojna kromatografija i kromatografija na papiru. Kod ove vrste kromatografije stacionarna faza je kruta, a mobilna je tekuća [8].

Tankoslojna kromatografija (TLC, eng. *Thin layer chromatography*) se temelji na adsorpcijskim procesima gdje je adrobens silikagel [8] (površina je potpuno hidrolizirana i sadrži silanol skupinu [24]) ili aluminijev oksid [8]. Zbog velike brzine određivanja slovi kao jedna od najčešće primijenjenih metoda odvajanja komponenti iz smjese. Služi u preparativne svrhe, za praćenje reakcije (nestanak reaktanta i nastanak produkta) i kao metoda kojom se određuje optimalno otapalo za kromatografiju na stupcu [8].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, eng. *High performance liquid chromatography*) čini 75% sveukupno provedenih analiza i primjenjuje se kao kromatografija obrnutih faza (stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza je polarna) [25] i normalnih faza (stacionarna faza je polarna, a mobilna faza je nepolarna). Slika 12 prikazuje osnovne dijelove HPLC uređaja.

Otapalo (mobilna faza) nalazi se u spremnicima za otapalo. Funkcija pumpe je stvaranje visokog tlaka koji će osigurati sigurno protjecanje otapala kroz kolonu. Visok tlak je potreban kako bi otapalo moglo proći kroz unutrašnjost kolone koja je sačinjena od vrlo sitnih čestica. Tijekom prolaska otapala kroz sustav u otapalo se pomoću šprice uvodi uzorak. Uzorak nošen otapalom prolazi kroz kolonu čija je funkcija odvojiti komponente uzorka. Odvojene komponente dolaze do detektora koji prepoznaje svaku komponentu koja izađe iz kolone. Detektor je spojen na računalo koje sakuplja električne signale što rezultira pojavom kromatograma na zaslonu računala [26].



Slika 12: Shematski prikaz uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti [25].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Reagensi

- metanol (Carlo Erba, Italija)
- isopropanol (Fisher Scientific, UK)
- (BHT) 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (Acros Organics, Njemačka)

#### 3.2. Instrumentacija

- vaga (KERN, Njemačka)
- vortex (IKA, Njemačka)
- tekućinski kromatograf visoke razlučenosti (Shimadzu, Japan)
- kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) (Shimadzu, Japan)

#### 3.3. Realni uzorci

Uzorci koji su analizirani su uzorci različitih proizvođača jaja koja su dostupna na hrvatskom tržištu. Koncentracija vitamina E u jajima nije navedena na pakiranju tako da nam nije poznata. Analizirano je ukupno 5 skupina jaja. U prve 4 skupine analizirano je 5 uzoraka jaja dok je u 5. skupini analizirano 10 uzoraka jaja.

#### 3.4. Postupak analize

##### 3.4.1. Priprema realnih uzoraka za analizu vitamina E

Realni uzorci pripremljeni su i analizirani prema ranije opisanoj metodi [27]. Za određivanje sadržaja vitamina E u žumanjcima jaja potrebno je odijeliti žumanjak od bjelanjka i žumanjak posušiti pomoću papirnatoг ubrusa te ga prenijeti u čistu i suhu posudu (Slika 13). Uzorak žumanjka (5 g) važe se na analitičkoj vagi (Slika 14) u kivetu volumena 50 mL. U kivetu se dodaje 14,5 mL metanola i 0,5 mL 0,2 % metanolne otopine 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) (Slika 16). Sadržaj kivete se 30 sekundi miješa pomoću laboratorijske treskalice (Slika 17) i pohrani na tamnom mjestu (Slika 18) do analize.

Za analizu se uzima supernatant koji se prije analize filtrira kroz filter za špricu 0,45  $\mu\text{m}$ . Profiltrirani supernatant se prenese u vijalice i stavlja u automatski uzorkivač HPLC uređaja.



Slika 13: Odjeljivanje i sušenje žumanjka.



Slika 14: Analitička vaga pomoću koje su se vagali uzorci žumanjka.

### 3.4.2. Priprema 0,2 % BHT u metanolu

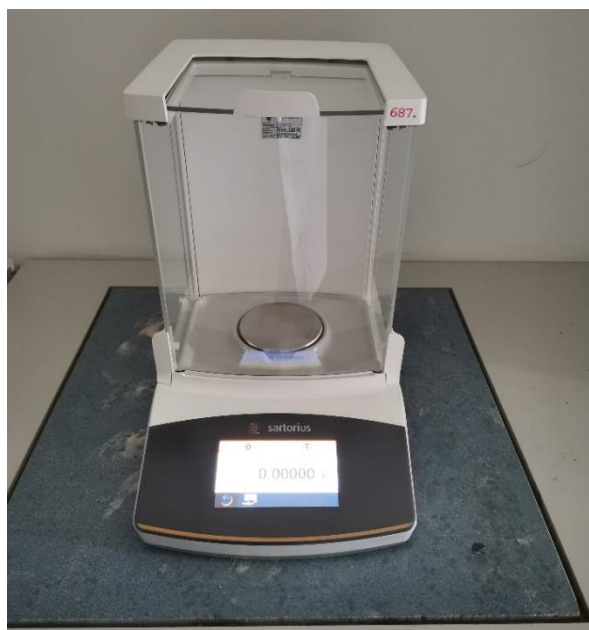
$$W (\text{BHT u metanolu}) = 0,2 \% = 0,002$$

$$Mr (\text{BHT}) = 220,35 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

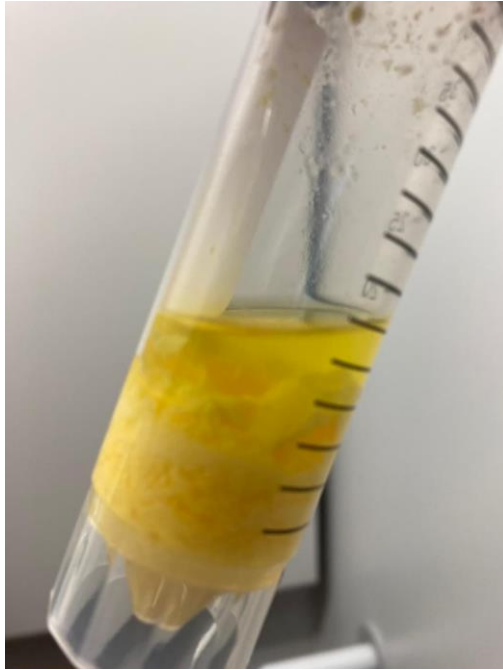
$$V (\text{BHT u metanolu}) = 100 \text{ mL}$$

$$m (\text{BHT}) = 1,05 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 \text{ mL} \cdot 0,002 = 0,21 \text{ g}$$

Vagom (Slika 15) odvažemo 0,21000 g BHT i prenesemo u odmjernu tikvicu volumena 100 mL. Tikvicu do pola napunimo metanolom i otopinu promiješamo. Zatim nadopunimo tikvicu metanolom točno do oznake. Tikvicu začepimo i otopinu ponovo dobro promiješamo.



Slika 15: Analitička vaga za vaganje BHT.



Slika 16: Uzorci žumanjka nakon dodavanja metanola i BHT.



Slika 17: Miješanje sadržaja kivete laboratorijskom treskalicom.



Slika 18: Uzorak spreman za pohranu na tamno mjesto.

### 3.4.3. Priprema HPLC uređaja za određivanje sadržaja vitamina E

Prije analize pripremljenih uzoraka i određivanja sadržaja vitamina E u žumanjcima jaja, HPLC sustav se ispire metanolom a potom mobilnom fazom. Ispiranje mobilnom fazom traje sve dok tlak u uređaju ne postane stabilan, a bazna linija ravna.

Kalibracija i provjera metode napravljeni su prije ranijih mjerenja. Koeficijent determinacije dobiven za korišteni kalibracijski dijagram iznosi  $R^2 = 0,9994$  što potvrđuje dobro slaganje regresijskog pravca i izmjerenih vrijednosti koncentracija pripremljenih standardnih otopina.

Uvjeti metode:

- Mobilna faza: isopropanol:metanol = 45:55
- Protok (*flow rate*): 1 mL/min
- Temperatura: sobna temperatura
- Vrijeme analize: 10 min
- Valna duljina: 295 nm (UV-VIS detektor)
- Injektiran volumen: 20  $\mu$ L



- Kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), Shimadzu
- Vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme): 4,7 minuta

#### 3.4.4. Analiza realnih uzoraka

Supernatant uzoraka pripremljenih na ranije opisan način uziman je za analizu prvo nakon 3 sata a potom nakon 16 sati za sve skupine, dok su za 5. skupinu uzorci za analizu uzimani nakon 1, 2, 3 i 16 sati.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Određivanje koncentracije vitamina E u jajima

Ukupno je analizirano 5 skupina jaja. Kod prve 4 skupine uzorci za analizu uzimani su nakon 3 odnosno 16 sati. Dok su za 5. skupinu uzorci za analizu uzimani nakon 1, 2, 3 i 16 sati.

Rezultati dobiveni HPLC analizom prikazani kao mg vitamina E / 100 g žumanjaka i opisani su srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom (SD), relativnom standardnom devijacijom (RSD) i intervalom pouzdanosti. Srednja vrijednost se još naziva aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) određuje se na način da se zbroje vrijednosti numeričke vrijednosti ( $x_i$ ) i podijele njihovim brojem ( $N$ ), prema izrazu (2):

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (2)$$

Standardna devijacija ili standardna pogreška (SD) je prosječno srednje kvadratno odstupanje numeričkih vrijednosti ( $x_i$ ) od njihove aritmetičke sredine ( $\bar{x}$ ) koje se računa prema izrazu (3):

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (3)$$

Relativna standardna devijacija ili relativna standardna pogreška (RSD) je omjer standardne devijacije (SD) i aritmetičke sredine ( $\bar{x}$ ) pomnožen sa 100 %, prema izrazu (4):

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

Interval pouzdanosti predstavlja interval oko aritmetičke sredine niza mjerenja unutar kojih se može očekivati prava vrijednost.

Rezultati za prvu skupinu prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati HPLC analize prve skupine jaja.

Uzorak	mg/100 g žumanjka		smanjenje (mg)	smanjenje (%)
	3 h	16 h		
1	5,818	5,206	0,613	10,529
2	6,164	5,556	0,608	9,866
3	6,876	6,012	0,864	12,564
4	6,121	5,218	0,902	14,743
5	6,166	5,610	0,557	9,029
<b>srednja vrijednost</b>	<b>6,229</b>	<b>5,520</b>	<b>0,709</b>	<b>11,346</b>
<b>SD</b>	0,390	0,332		
<b>RSD (%)</b>	6,256	6,018		
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	0,342	0,291		

Iz rezultata vidimo da je nakon 16 sati ekstrakcije došlo do smanjenja koncentracije vitamina E u odnosu na vrijednosti dobivene nakon 3 sata ekstrakcije i to 0,709 mg odnosno 11,35 %.

U Tablici 6 prikazani su rezultati za drugu skupinu uzoraka.

Tablica 6. Rezultati HPLC analize druge skupine jaja.

Uzorak	mg/100 g žumanjka		smanjenje (mg)	smanjenje (%)
	3 h	16 h		
1	1,953	1,697	0,256	13,113
2	1,949	1,707	0,242	12,435
3	1,864	1,682	0,181	9,733
4	1,833	1,642	0,191	10,421
5	1,742	1,523	0,219	12,565
<b>srednja vrijednost</b>	<b>1,868</b>	<b>1,650</b>	<b>0,218</b>	<b>11,653</b>
<b>SD</b>	0,088	0,075		
<b>RSD (%)</b>	4,705	4,552		
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	0,077	0,066		

Uspoređujući s prvom skupinom, koncentracija vitamina E u ovoj skupini jaja je znatno manja pa je manje i smanjenje u mg manje dok je postotak smanjenja gotovo jednak.

U Tablici 7 prikazani su rezultati za treću skupinu uzoraka.

Tablica 7. Rezultati HPLC analize treće skupine jaja.

Uzorak	mg/100 g žumanjka		smanjenje (mg)	smanjenje (%)
	3 h	16 h		
1	4,565	3,908	0,657	14,387
2	3,801	2,407	1,394	36,678
3	3,733	3,164	0,569	15,244
4	3,715	2,353	1,362	36,666
5	3,413	2,217	1,196	35,052
<b>srednja vrijednost</b>	<b>3,845</b>	<b>2,810</b>	<b>1,036</b>	<b>27,606</b>
<b>SD</b>	0,429	0,717		
<b>RSD (%)</b>	11,155	25,509		
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	0,376	0,628		

Uspoređujući s prvom i drugom skupinom, koncentracija vitamina E u ovoj skupini jaja se znatno razlikuje, a postotak smanjenja je 2,3 puta veći u odnosu na prvu i drugu skupinu.

U Tablici 8 prikazani su rezultati za četvrtu skupinu uzoraka.

Tablica 8. Rezultati HPLC analize četvrte skupine jaja.

Uzorak	mg/100 g žumanjka		smanjenje (mg)	smanjenje (%)
	3 h	16 h		
1	3,458	2,893	0,564	16,319
2	3,347	1,721	1,626	48,591
3	3,413	2,740	0,672	19,703
4	3,765	2,850	0,915	24,298
5	3,442	2,772	0,670	19,457
<b>srednja vrijednost</b>	<b>3,485</b>	<b>2,595</b>	<b>0,889</b>	<b>25,674</b>
<b>SD</b>	0,162	0,493		
<b>RSD (%)</b>	4,650	18,983		
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	0,142	0,432		

Uspoređujući s trećom skupinom, koncentracija vitamina E u ovoj skupini jaja je gotovo jednaka, jednako je i smanjenje u *mg* kao i postotak smanjenja. U usporedbi s prvom skupinom, koncentracija vitamina E znatno je manja pa je manje i smanjenje u *mg* dok je postotak smanjenja znatno veći u odnosu na prvu i drugu skupinu ali sličan je postotku dobivenom kod treće skupine jaja.

U Tablici 9 prikazani su rezultati za petu skupinu uzoraka.

Tablica 9. Koncentracija vitamina E u uzorcima 5. skupine nakon 1, 2, 3 i 16 sati ekstrakcije.

Uzorak	mg/100 g žumanjka			
	1 h	2 h	3 h	16 h
1	4,410	4,003	3,801	3,683
2	5,053	5,173	4,938	3,977
3	3,077	3,236	2,857	2,733
4	3,612	3,677	2,787	2,549
5	5,228	5,255	5,269	2,624
6	2,851	3,503	3,275	2,045
7	3,741	3,766	3,530	2,169
8	2,597	2,735	2,617	2,218
9	2,754	2,341	2,353	1,808
10	5,011	4,718	4,708	4,007
<b>srednja vrijednost</b>	<b>3,833</b>	<b>3,841</b>	<b>3,614</b>	<b>2,781</b>
<b>SD</b>	1,024	0,975	1,038	0,817
<b>RSD (%)</b>	26,712	25,382	28,711	29,375
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	0,635	0,604	0,643	0,506

Tablice 9 i 10 prikazuju koncentracije vitamina E u uzorcima u mg/100 g žumanjka, dok je u Tablici 11 prikazan postotak smanjenja odnosno povećanja koncentracije vitamina E. Mjerenja su provedena nakon 1, 2, 3 i 16 sati ekstrakcije. Rezultati prikazani u Tablici 10 i 11 dobiveni su u odnosu na koncentraciju vitamina E izmjerenu nakon 1 sata ekstrakcije. Iz rezultata prikazanih u Tablici 10 vidljivo je da se koncentracija smanjila prosječno za jednaki iznos nakon 2 i 3 sata dok se nakon 16 sati ekstrakcije koncentracija u odnosu na koncentraciju nakon 1 sata smanjila u svim uzorcima za prosječno 1,120 mg. Iz tablice je vidljivo i da se koncentracija u samo 3 uzorka smanjila nakon 2 sata ekstrakcije dok se u ostalim uzorcima povećala. Nakon 3 sata, u većem broju uzoraka došlo je do smanjenja koncentracije a samo kod 3 uzorka koncentracija vitamina E dodatno se povećala. Nakon 16 sati, u svim uzorcima je došlo do smanjenja koncentracije vitamina E. U Tablici 11 prikazano je smanjenje odnosno povećanje koncentracije vitamina E u uzorcima 5. skupine izraženi u %. Nakon 2 odnosno 3 sata koncentracija je smanjena oko 10 % dok se nakon 16 sati koncentracija smanjila oko 27 %.

Tablica 10. Promjena koncentracije vitamina E u uzorcima 5. skupine jaja izražena u mg/100 g žumanjka.

Uzorak	nakon 2 h		nakon 3 h		nakon 16 h	
	smanjenje (mg)	povećanje (mg)	smanjenje (mg)	povećanje (mg)	smanjenje (mg)	povećanje (mg)
1	0,407		0,608		0,726	
2		0,120	0,114		1,075	
3		0,159	0,219		0,344	
4		0,065	0,825		1,063	
5		0,027		0,041	2,603	
6		0,651		0,423	0,807	
7		0,025	0,211		1,571	
8		0,138		0,020	0,379	
9	0,413		0,401		0,946	
10	0,293		0,302		1,004	
<b>srednja vrijednost</b>	<b>0,371</b>	<b>0,169</b>	<b>0,342</b>	<b>0,162</b>	<b>1,120</b>	<b>0</b>

Tablica 11. Promjena koncentracije vitamina E u uzorcima 5 skupine jaja izražena u %.

Uzorak	nakon 2 h		nakon 3 h		nakon 16 h	
	smanjenje (%)	povećanje (%)	smanjenje (%)	povećanje (%)	smanjenje (%)	povećanje (%)
1	9,228		13,797		16,467	
2		2,377	2,259		21,284	
3		5,173	7,125		11,176	
4		1,804	22,845		29,429	
5		0,517		0,793	49,799	
6		22,844		14,850	28,289	
7		0,666	5,627		42,009	
8		5,319		0,786	14,605	
9	14,993		14,568		34,336	
10	5,844		6,029		20,030	
<b>srednja vrijednost</b>	<b>10,021</b>	<b>5,529</b>	<b>10,321</b>	<b>5,476</b>	<b>26,742</b>	<b>0</b>

Podaci prikazani u Tablicama 9., 10. i 11. za vrijeme ekstrakcije 1 i 2 sata nisu ponovljeni pa ih treba ponoviti, no ukazuju na mogućnost dodatnog smanjenja vremena ekstrakcije.

U Tablici 12 prikazani su rezultati za uzorke 5. skupine nakon 3 i 16 sati ekstrakcije.

Tablica 12. Usporedba koncentracija uzoraka 5. skupine nakon 3 i 16 sati ekstrakcije.

Uzorak	mg/100 g žumanjka		smanjenje (mg)	smanjenje (%)
	3 h	16 h		
1	3,801	3,683	0,118	3,097
2	4,938	3,977	0,961	19,465
3	2,857	2,733	0,125	4,362
4	2,787	2,549	0,238	8,534
5	5,269	2,624	2,645	50,194
6	3,275	2,045	1,230	37,561
7	3,530	2,169	1,361	38,551
8	2,617	2,218	0,400	15,271
9	2,353	1,808	0,544	23,140
10	4,708	4,007	0,702	14,899
<b>srednja vrijednost</b>	<b>3,614</b>	<b>2,781</b>	<b>0,832</b>	<b>21,507</b>
<b>SD</b>	1,038	0,817		
<b>RSD (%)</b>	28,711	29,375		
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	0,643	0,506		

Smanjenje koncentracije vitamina E nakon 16 sati iznosi 0,832 mg odnosno 21,57 % što se poklapa sa smanjenjima za isto vrijeme ekstrakcije u uzorcima 3. i 4. skupine.

Usporedba koncentracija vitamina E u uzorcima svih skupina nakon 3 i 16 sati ekstrakcije te smanjenje koncentracije nakon 16 sati prikazani su u mg/100 g žumanjaka i % u Tablici 13.

Vidljivo je da je kod prve dvije skupine smanjenje oko 11 % dok je kod ostalih skupina smanjenje između 21 i 28 %.

Tablica 13. Usporedba koncentracija vitamina E u uzorcima jaja po skupinama.

Skupina	mg/100 g žumanjka		smanjenje (mg)	smanjenje (%)
	3 h	16 h		
1	6,229	5,520	0,709	11,346
2	1,868	1,650	0,218	11,653
3	3,845	2,810	1,036	27,606
4	3,485	2,595	0,889	25,674
5	3,614	2,781	0,832	21,507

## 5. ZAKLJUČAK

U radu je, prema ranije korištenoj metodi, određivana koncentracija vitamina E u žumanjcima jaja. U ranijim analizama primijećeno je da se vrijeme ekstrakcije može skratiti, pa je cilj ovog rada bio utvrditi vrijeme potrebno za ekstrakciju vitamina E. Rezultati dobiveni kraćim vremenom ekstrakcije uspoređeni su s rezultatima dobivenim nakon vremena ekstrakcije opisanog u metodi.

Koncentracije vitamina E određivane su u 5 skupina jaja različitih proizvođača. Uspoređivane su koncentracije vitamina E nakon 3 i 16 sati ekstrakcije. Kod prve dvije skupine koncentracija vitamina E nakon 16 sati ekstrakcije smanjila se za 11,5 % u odnosu na koncentraciju nakon 3 sata ekstrakcije, dok se kod 3., 4. i 5. skupine koncentracija vitamina E smanjila između 21,5 % i 27,6%.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da se vrijeme ekstrakcije vitamina E iz žumanjaka jaja prema korištenoj metodi može skratiti sa 16 sati na 3 sata.



## 6. POPIS LITERATURE

- [1] <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/vitamin-e/metabolizam/> (9.5.2021.)
- [2] M. L. Colombo, An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol – Perspectives, *Molecules* 15(4) (2010), 2103 – 2113.
- [3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [4] <https://pubs.rsc.org/en/content/chapterhtml/2019/bk9781788012409-00001?isbn=978-1-78801-240-9&sercode=bk> (19.4.2021.)
- [5] Tucker J.M & Townsend D.M., Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59 (2005), 380 – 387.
- [6] <https://www.hielscher.com/hr/ultrasonic-formulation-of-nanostructured-lipid-drug-carriers.htm> (29.5.2021.)
- [7] L. Hou, C. Tian, D. Chen, Y. Yuan, Y. Yan & et al., Investigation on vitamin e succinate based intelligent hyaluronic acid micelles for overcoming drug resistance and enhancing anticancer efficacy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 140 (2019), 105071.
- [8] D. Gašo-Sokač, V. Bušić: *Praktikum iz organske kemije 1*, Osijek, 2014.
- [9] <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/15afa417-8f7c-4dbc-af00-0559bf7546e9/kemija-1/m01/j05/index.html> (24.5.2021.)
- [10] O. Korchazhkina, E. Jones, M. Czauderna, S. A. Spencer, J. Lpwalczyk, HPLC with UV detection for measurement of vitamin E in human milk, *Acta Chromatographica* 16 (2006), 48 - 57.
- [11] <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Soxhletov+ekstraktor> (24.5.2021.)
- [12] <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=69508> (15.7.2021.)
- [13] E. Destandau, T. Michel, C. El fakir, *Microwave - assisted Extraction A: Natural Product Extraction: Principles and Applications* (Rostagno M.A., Prado, J.M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, 2013.
- [14] M. Blekić, A. Režek Jambrak, F. Chemat, Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian journal of food science and technology*, 3 (2011), 32 - 47.

- [15] K. Ganzler, I. Szinai, A. Salgo, Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique, *Journal of Chromatography A.*, 520 (1990), 257 - 262.
- [16] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research, *Pharmacognosy Reviews*, 1 (2007), 7 - 18.
- [17] L. Wong, C. L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006), 300 - 312.
- [18] I. G. Zigoneanu, L. Williams, Z. Xu, C. M. Sabliov, Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method, *Bioresource Technology*, 99(11) (2008), 4910 - 4918.
- [19] N. Erkan, G. Ayranci, E. Ayranci, A kinetic study of oxidation development in sunflower oil under microwave heating: Effect of natural antioxidants, *Food Research International*, 42(8) (2009), 1171 - 1177.
- [20] A. Režek Jambrak, Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke, *Prehrambeno biotehnoški fakultet, Disertacija, Zagreb, 2008.*
- [21] A. Patist, D. Bates, *Industrial Applications of High Power Ultrasonic*, H. Feng, G. Barbosa-Canovas, J. Weiss (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing.*, Springer, New York (2011), 2007.
- [22] K. S. Suslick, Y. Didenko, M. M. Fang, T. Hyeon, K. J. Kolbeck, W. B. McNamara, ... M. Wong, Acoustic cavitation and its chemical consequences, *Philosophical Transaction of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 357(1751) (1999), 335 - 353.
- [23] <https://www.kobis.hr/prodajni-program/kromatografija/plinska-kromatografija/> (15.7.2021.)
- [24] [https://www.biotech.uniri.hr/files/Malatesti-Filosevic\\_Praktikum-organske-kemije.pdf](https://www.biotech.uniri.hr/files/Malatesti-Filosevic_Praktikum-organske-kemije.pdf) (16.7.2021.)
- [25] [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (28.5.2021.)
- [26] [https://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US) (16.7.2021.)

[27] Kralik Z., Kralik G., Grčević M., Kralik I., Ganter V. Brazilian Journal of Poultry Science, 20(1) (2018), 119 – 126.