

Optimiranje metode ekstrakcije luteina iz realnih uzoraka

Prokopec, Doris

Master's thesis / Diplomski 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:182:469492>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Doris Prokopec

Optimiranje metode ekstrakcije luteina iz realnih uzoraka

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Doris Prokopec

Optimiranje metode ekstrakcije luteina iz realnih uzoraka

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****OPTIMIRANJE METODE EKSTRAKCIJE LUTEINA IZ REALNIH UZORAKA****Doris Prokopec****Rad je izrađen na** Odjelu za kemiju Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Mentorica:** doc. dr. sc. Olivera Galović**Sažetak:**

Lutein je pigment svijetložute boje koji pripada skupini ksantofila. Karakteriziraju ga hepatoprotektivna, neuroprotektivna aktivnost te protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. U radu je optimirana ekstrakcija luteina ispitivanjem utjecaja različitih ekstrakcijskih smjesa, utjecaj ultrazvuka, omjera suhe tvari (uzorka) i ekstrakcijske smjese, veličine čestica uzorka te vremena ekstrakcije na uspješnost ekstrakcije luteina iz uzorka. Veći sadržaj luteina određen je u usitnjenim uzorcima, boljom se pokazala direktna ultrazvučna ekstrakcija a od ispitivanih ekstrakcijskih smjesa, smjesa metanol:acetone=1:1. Najbolji omjer suhe tvari i uzorka bio je 1:20 kod metode 1 u kojoj je kao ekstrakcijska smjesa upotrebljena metanol: acetone = 1:1, dok je kod metode 4 u kojoj je heksan dodan kao krajnje otapalo bio 1:40 uz 1 sat stajanja uzorka na tamnom. Za analizu realnih uzoraka korištena je metoda 4 koja se pokazala kao najuspješnija. Ovom metodom određivan je sadržaj luteina u osam vrsta hrane za koke nesilice. Najveći sadržaj luteina određen je u hrani obogaćenoj luteinom, selenom, omega-3 masnim kiselinama i vitaminom E (75,314 mg/kg hrane). Dok je najniži sadržaj luteina određen u hrani dostupnoj na tržištu koja nije pomiješana sa žitaricama, 8,482 mg/ kg hrane.

Diplomski rad obuhvaća: 63 stranica, 29 slika, 17 tablica, 37 literaturnih pregleda.**Jezik izvornika:** Hrvatski**Ključne riječi:** lutein, hrana za koke nesilice, ekstrakcija, HPLC analiza**Rad prihvaćen:** 27.06.2022.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentorica i članica
3. izv.prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović, članica
4. izv.prof.dr.sc. Tomislav Balić, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

OPTIMIZATION OF LUTEIN EXTRACTION METHOD FROM REAL SAMPLES**Doris Prokopec**

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.

Abstract

Lutein is a light yellow pigment belonging to the xanthophyll group. It is characterized by hepatoprotective, neuroprotective, anti-inflammatory and antioxidant activity. This paper present the optimisation of lutein extraction by examining the influence of different extraction mixtures, the influence of ultrasound, ratio of dry matter (sample) and extraction mixture, sample particle size and extraction time on the success of lutein extraction from the complex sample. The highest lutein content was determined in grinded samples, the direct ultrasonic extraction proved to be better, and the extraction mixture of methanol:acetone= 1:1 showed best results. The best dry matter to sample ratio was 1:20 in Method 1 in which methanol: acetone= 1:1 was used as the extraction mixture, while in Method 4 it was 1:40 in which hexane was added as the final solvent with 1 hour of sample resting in the dark place. Method 4, which proved to be the most successful, was used to analyze the real samples. This method was used to determine the content of lutein in eight types of food for laying hens. The highest lutein content was determined in food samples enriched with lutein, selenium, omega-3 fatty acids and vitamin E (75.314 mg / kg of sample), while the lowest lutein content was determined in food available on the market that was not mixed with cereals, 8.482 mg / kg of sample.

Thesis includes: 63 pages, 29 figures, 17 tables, 37 references.

Original in: Croatian

Keywords: lutein, food for laying hens, extraction, HPLC analysis

Thesis accepted: 27.06.2022.

Reviewers:

1. Martina Šrajer Gajdošik, PhD., assistant prof., chairman
2. Olivera Galović, PhD., assistant prof., mentor and member
3. Martina Medvidović-Kosanović, PhD., associate prof., member
4. Tomislav Balić, PhD., associate prof., alternate member

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

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.

Rad je dio istraživanja Internog projekta Odjela za kemiju pod nazivom Ekstrakcija luteina zelenim otapalima iz hrane za nesilice.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. KAROTENOIDI.....	2
2.1.1. Određivanje karotenoida.....	4
2.2. LUTEIN.....	5
2.2.1. Kemijska struktura luteina i zeaksantina	6
2.2.2. Bioraspoloživost luteina	7
2.2.3. Antioksidacijsko djelovanje.....	9
2.2.4. Lutein u hrani za koke nesilice	11
2.3. EKSTRAKCIJA	12
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	12
2.3.2. Kavitacija.....	13
2.3.3. Ultrazvučna sonda.....	15
2.3.4. Ultrazvučna kupelj.....	17
2.4. OTAPALA.....	18
2.4.1. Zelena otapala	19
2.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Kemikalije.....	23
3.2. Pribor i instrumentacija.....	23
3.3. Opis korištenih metoda	26
3.3.1. Standardna metoda.....	26
3.3.2. Metoda 1	28
3.3.2.1. Metoda 1 uz saponifikaciju.....	28
3.3.3. Metoda 2	29
3.3.3.1. Metoda 2 uz saponifikaciju.....	30
3.3.4. Metoda 3	30
3.3.4.1. Metoda 3 uz saponifikaciju.....	31
3.3.5. Metoda 4	31
3.3.5.1. Modificirana metoda 4.....	32
3.4. Odabir i provjera najuspješnije metode ekstrakcije	33
3.5. Analizirani uzorci	33

3.6. Parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	34
3.7. Prikaz dobivenih rezultata	35
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1. Usporedba rezultata dobivenih primjenom standardne metode i metode 1 na neusitnjene i usitnjene uzorke	36
4.2. Rezultati dobiveni metodom 2 i 3 sa i bez saponifikacije	38
4.2. Ispitivanje različitih otapala primjenom metode 1 i metode 1 uz saponifikaciju	40
4.4. Ispitivanje utjecaja omjera suhe tvari i ekstrakcijske smjese.....	41
4.5. Usporedba rezultata dobivenih metodom 4 i modificiranom metodom 4	42
4.6. Provjera prikladnosti metode 4 i modificirane metode 4.....	43
4.7. Analiza realnih uzoraka	45
5. ZAKLJUČAK.....	50
6. LITERATURA	51
7. ŽIVOTOPIS.....	55

1. UVOD

Lutein je pigment svijetlo žute boje koji pripada skupini ksantofila. U namirnicama se nalazi u slobodnom ili stabilnijim esterificiranim oblicima masnih kiselina zajedno sa svojim stereoizomerom zeaksantinom. Kemijski je to 3,3'-dihidroksi- β -karoten koji se javlja u tamnozelenom lisnatom povrću, biljkama, žumanjku jajeta i žitaricama. Ljudski organizam ga ne može sintetizirati stoga ga je potrebno unositi hranom i/ili dodacima prehrani, što je od velike važnosti za naš organizam budući da je lutein snažan antioksidans. Osim antioksidacijskog djelovanja, lutein karakterizira hepatoprotektivna, neuroprotektivna aktivnost te protuupalno djelovanje. Ima ključnu ulogu u zdravlju oka jer pomaže u prevenciji degeneracije makule povezane s dobi (AMD) i katarakte. Visoko konjugirani sustav dvostrukih veza čini ga osjetljivim na svjetlost, kisik i visoku temperaturu. Zbog toga su lutein i njegovi derivati nestabilni u uvjetima okoline, stoga je potrebna posebna pažljivost tijekom postupka pripremanja uzoraka, ekstrakcije i skladištenja. Visoka lipofilnost luteina određuje njegovu topljivost u ekstrakcijskom otapalu. Uglavnom se ekstrahira relativno polarnim otapalima, što ga razlikuje od karotenoida koji se ekstrahiraju nepolarnim otapalima. Hidroliza ili saponifikacija često se provode tijekom ekstrakcije kako bi se pojednostavio kromatografski profil. Saponifikacija se kemijski provodi pomoću lužina ili enzimski pomoću esteraza. Detekcija luteina najčešće se provodi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. KAROTENOIDI

Karotenoidi su najraširenija klasa izoprenoidnih pigmenata žute do crvene boje. Sintetiziraju ih fotosintetski i nefotosintetski organizmi poput bakterija i gljiva. Imaju značajnu ulogu u fiziologiji gotovo svih živih bića. Odgovorni su za boju cvjetova (npr. neven, krizantema) i plodova (npr. paprika, marelica, breskva, naranča, rajčica) te su kod životinja prisutni u egzoskeletu školjkaša, mišićima i koži riba, perju i kljunovima ptica. Budući da životinje (osim nekih vrsta lisnih uši) ne mogu sintetizirati karotenoide, potrebno ih je unositi hranom. Glavni izvori prirodnih karotenoida su tamnozeleno lisnato povrće, obojeno voće i jednostanične alge. Karotenoidi nas štite od raka pluća, glave, vrata i prostate, reguliraju stanične diferencijacije, stanični ciklus i apoptozu, pružaju nam fotozaštitu od UV zračenja, prekursori su vitamina A (retinola), stimuliraju hormonalne i imunološke reakcije. [1, 2]

Ugljikovodični lanac karotenoida sastoji se od osam izoprenoidnih jedinica koje su spojene na način da su dvije središnje metilne skupine u 1,6-pozicijskom odnosu, a preostale neterminalne metilne skupine u 1,5-pozicijskom odnosu. Sintetizirani su vezom rep-rep od dvije molekule C₂₀ geranil difosfata. Sedam terminalnih skupina karotenoida su ψ , β , γ , ϵ , ϕ , χ i κ , nalaze se na krajevima glavnog polienskog lanca karotenoidne strukture. Obično, ψ krajevi čine terminalne prstenove β , γ i ϵ , dok β krajnje grupe formiraju ϕ , χ i κ prstenove. Dugi polienski lanac sadrži 3-15 konjugiranih dvostrukih veza, što određuje njihov apsorpcijski spektar. Sustav konjugiranih ugljik-ugljik veza čini karotenoide učinkovitim gasiteljima singletnog kisika što ih čini dobrim antioksidansima. Prošireni π elektronski sustav pomaže im stabilizirati nesparene elektrone nakon gašenja radikala. Također, ova struktura stvara lipofilnost koja uzrokuje da pigmenti usporavaju peroksidaciju lipida i stabiliziraju lipidno-proteinske strukture poput staničnih membrana. Njihova lipofilnost se povećava esterifikacijom, a smanjuje u prisutnosti proteina ili šećera. Samo nekoliko karotenoida uključujući likopen, β -karoten, astaksantin, kantaksantin i tri apokarotenoida: β -apo-8'-karotenal, citranaksantin i etil β -apo-8'-karotenoat sintetizirano je na industrijskoj razini. [1, 2, 3, 4]

Većina karotenoida su derivati C40 tetraterpenoidnog pigmenta fitoena, a biosintetizirani su kondenzacijom dviju molekula C20 geranilgeranil difosfata. [1] C30 i C50 karotenoidi sadrže šest i deset C5 izoprenoidnih jedinica, a sintetiziraju ih samo arheje i bakterije. C45 karotenoide također mogu sintetizirati samo bakterije, a sastoje se od devet izoprenoidnih jedinica. [2]

Do danas je identificirano 700 karotenoida u prirodi, a 50 od njih je prisutno u prehrani i ljudsko tijelo ih može apsorbirati i metabolizirati. Međutim, samo šest (β -karoten, β -kriptoksantin, α -karoten, likopen, lutein i zeaksantin) ih je prisutno u krvi ljudi iz različitih zemalja i povezani su sa zdravstvenim dobrobitima. [3]

Karotenoidi se dijele u dvije skupine:

1. Ugljikovodični karotenoidi koji se nazivaju karoteni i sadrže samo strukturu ugljikovodika. U njih ubrajamo likopen, α -karoten i β -karoten.
2. Oksigenirani derivati ugljikovodičnih karotenoida koji su poznati po nazivu ksantofili. Sadrže atom kisika koji se nalazi u funkcijskim skupinama alkohola (npr. lutein), ketona (npr. kantaksantin), kombinacije alkohola i ketona (npr. astaksantin) ili estera i alkohola (npr. fukoksantin). [1]

Osim podijele na karotene i ksantofile, karotenoidi se dalje mogu klasificirati na karotenoide provitamina A (npr. α -karoten, β -karoten i mutatokrom) i ne-provitamin A karotenoide koji se ne mogu pretvoriti u retinale (npr. likopen i lutein). [1]

2.1.1. Određivanje karotenoida

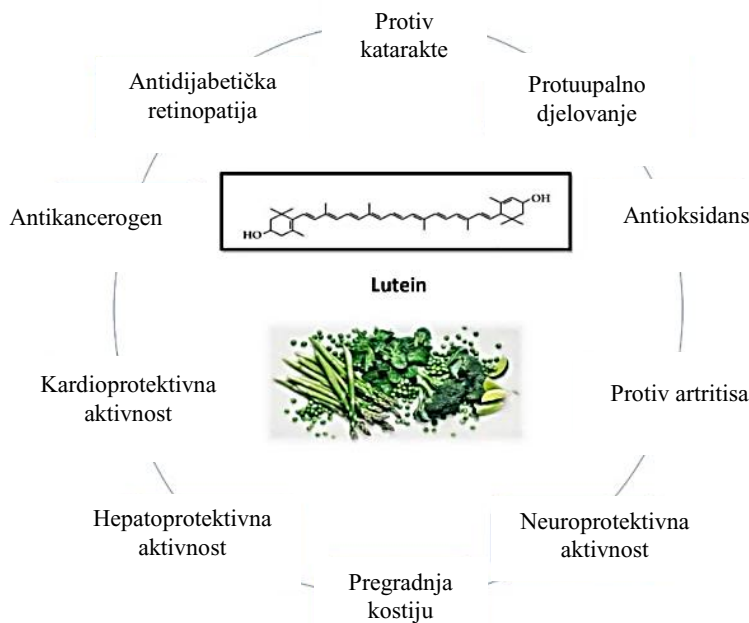
Zbog svoje hidrofobne prirode, karotenoidi se konvencionalno ekstrahiraju korištenjem organskih otapala. Najčešće su nepolarna otapala (heksan, petroleter, tetrahidrofuran) izvrstan izbor za ekstrakciju nepolarnih karotena ili esterificiranih ksantofila, dok su polarna otapala kao što su aceton, etanol i etilacetat prikladnija za ekstrakciju polarnih karotenoida. Različite metode koje se koriste za ekstrakciju karotenoida mogu se klasificirati u nekoliko različitih kategorija: Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave assisted extraction*), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. UAE, *ultrasound assisted extraction*), ubrzana ekstrakcija otapalom (eng. ASE, *accelerated solvent extraction*), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (eng. PLE, *pressurized liquid extraction*), ekstrakcija uz pomoć impulsnog električnog polja (eng. PEF, *pulsed electric field assisted extraction*), ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. SFE, *supercritical fluid extraction*), ekstrakcija potpomognuta enzimima (eng. EAE, *enzyme assisted extraction*). Navedene metode ekstrakcije razlikuju se po načinu dezintegracije stanice, te primijenjenoj temperaturi i tlaku. Na primjer, Soxhlet ekstrakcija koristi otapala pri temperaturi vrenja i tlaku okoline, dok ASE i SFE rade na niskoj temperaturi i visokom tlaku. Nasuprot tome, UAE, PEF i EAE koriste ultrazvučne valove, impulse visokog napona i celuloitičke enzime za dezintegraciju stanica, što olakšava oslobađanje intracelularnih karotenoida. [1] Grosso i suradnici uspoređivali su različite tradicionalne i napredne metode za učinkovitu ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz mora, uključujući karotenoide. [6] Mäki-Arvela i suradnici proučavali su metode ekstrakcije karotenoida iz algi, uz modeliranje kinetike ekstrakcije. Autori su raspravljali o dostupnosti karotenoida u mikroalgama, metodama predobrade uzoraka, saponifikaciji, antioksidacijskim i antimikrobnim svojstvima te daljnjoj obradi ekstrakta karotenoida iz algi. [7] Sowbhagya i Chitra proučavali su metode ekstrakcije karotenoida iz lucerne, čilija, nevena, jagoda potpomognute enzimima celulaze, hemicelulaze, pektinaze i glikozidaze. [8] Posljednjih godina značajna pozornost se pridaje ekstrakciji zelenim otapalima koja su ekološki sigurna i netoksična. Ekstrakcije u kojima se koriste prethodno navedena otapala nazivaju se „zelene ekstrakcije“. [1]

2.2. LUTEIN

Lutein je najzastupljeniji karotenoid, odnosno ksantofil u biljkama, prisutan je u gotovo svim vrstama voća i povrća. Glavna je komponenta kremaste boje pšeničnog brašna i mnogih drugih proizvoda. Ljudi ga ne mogu sintetizirati, stoga ga je potrebno unositi konzumiranjem voća, povrća i/ili dodataka prehrani. Biosintetiziraju ga isključivo biljke, alge, bakterije i neke gljive. [9, 10, 11]

Lutein i njegov stereoizomer zeaksantin su dicikličke, dihidroksi molekule izvedene iz α i β -karotena. Oba imaju istu molekulsku formulu ($C_{40}H_{56}O_2$) i molekulsku masu ($M_r = 568,9$ g/mol). Zbog različitih struktura razlikuju se po boji, lutein je svijetložut dok zeaksantin ima tamniju žutu nijansu. Maksimalna spektrometrijska apsorpcija luteina je između 453 i 481 nm. Topljiviji je u etanolu od ostalih karotena, dok je u vodi najvećim dijelom netopljiv. Podložan je izravnoj razgradnji toplinom i svjetlom te neizravnoj razgradnji slobodnim radikalima nastalim oksidacijom lipida. Za razliku od β -karotena i likopena koji se uglavnom prenose lipoproteinima niske gustoće (eng. LDL, *low-density lipoprotein*), lutein se uglavnom transportira lipoproteinima visoke gustoće (eng. HDL, *high-density lipoprotein*) zbog njegovog relativno većeg polariteta. [2, 5, 9, 12]

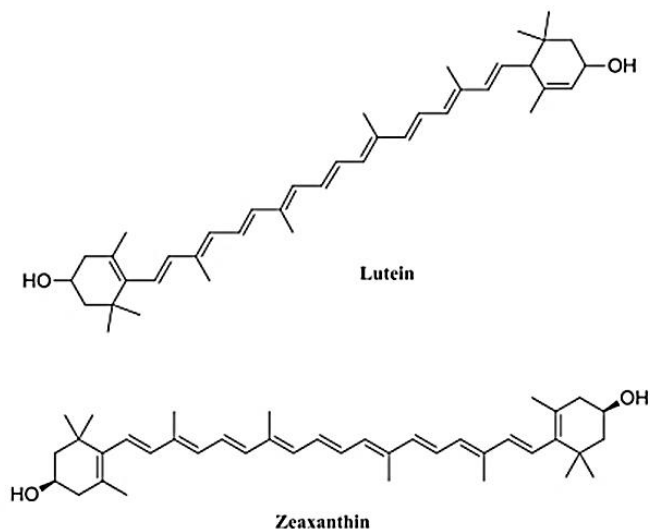
Iako nije prekursor vitamina A, mnoge zdravstvene dobrobiti povezane su s visokim unosom ove fitokemikalije hranom. Lutein i zeaksantin mogu pomoći u prevenciji degeneracije makule povezane s dobi (eng. AMD, *age-related macular degeneration*) i katarakte. Osim što imaju ključnu ulogu u zdravlju oka, važnu su i za prevenciju ili smanjenje intenziteta kardiovaskularnih bolesti (KVB), moždanog udara, raka i neurodegenerativnih poremećaja. Lutein karakterizira hepatoprotektivna, neuroprotektivna aktivnost te protuupalno i antioksidacijsko djelovanje (*Slika 1.*). [4, 5, 11, 12]



Slika 1. Biološke funkcije luteina. [11]

2.2.1. Kemijska struktura luteina i zeaksantina

Struktura luteina sastoji se od 40 ugljikovih atoma (tetraterpenoida) s izmjenom jednostrukih i dvostrukih veza povezanih s metilnom skupinom na svakoj strani. Lutein i zeaksantin se razlikuju od ostalih karotenoida zbog prisutnosti hidroksilnih skupina na svakoj strani molekule. Hidroksilna skupina je uključena u njihovu kemijsku reaktivnost sa singletnim kisikom te im određuje biološku funkciju, –OH skupine oba se nalaze na 3 i 3' ugljiku i razlikuju se samo po položaju jedne dvostruke veze u krajnjem prstenu. Lutein ima jedan β -prsten, dok zeaksantin ima dva β -prstena (**Slika 2.**). Glavne masne kiseline koje su supstituirane na hidroksilnim skupinama luteina su palmitinska i linolna kiselina. Budući da lutein sadrži dvije hidroksilne skupine, nastali esteri mogu biti mono- ili di-esteri. Homogeni di-esteri nastaju esterifikacijom iste masne kiseline s obje strane molekule, dok se esterifikacijom dviju različitih masnih kiselina stvara hetero di-ester. Tri glavna di-estera su dilinoleoilutein, linoleoilpalmitoilutein i dipalmitoilutein. Acilacija luteina dovodi do stvaranja regioizomera. [5, 9]



Slika 2. Kemijske strukture luteina i zeksantina. [5]

2.2.2 Bioraspoloživost luteina

Bioraspoloživost se odnosi na onaj dio konzumirane hranjive tvari ili bioaktivnog spoja koji se oslobađa iz matriksa hrane, apsorbira i transportira u tijelu. Lutein i zeaksantin su biodostupni iz različitih izvora hrane, što nakon konzumacije daje učinkovite biološke aktivnosti. Općenito, na bioraspoloživost karotenoida utječu brojni čimbenici uključujući matricu hrane (ostali sastojci koji se nalaze u uzorku osim analita), uvjeti obrade i sadržaj masti. Uvjeti obrade (poput zagrijavanja i prženja) koji utječu na bioraspoloživost luteina treba optimirati kako bi se smanjili gubitci ovog bioaktivnog spoja. Osim toga, dovoljna količina masti u obroku od velike je važnosti za povećanje bioraspoloživosti. U biljkama lutein može biti prisutan u slobodnom obliku ili u obliku estera s masnim kiselinama. Bowen i suradnici otkrili su da je lutein biodostupniji u obliku estera te da je otapanje važnije za biodostupnost od prisutnosti ili odsutnosti esterificiranih masnih kiselina. U slobodnom obliku nalazi se u zelenom lisnatom povrću poput špinata, kupusa i brokule, dok se u obliku estera nalazi u mangu, naranči, papaji, crvenoj ili zelenoj paprici i kukuruzu. [4,5]

Sadržaj luteina u prirodnim izvorima ovisi o vrsti, sorti, stupnju zrelosti, dijelu ploda kao i o načinu prerade topline, čuvanju ili skladištenju. [5, 10] Scheunemann i suradnici primijetili su da su razine karotenoida u serumu povezane s forsiranim ekspiracijskim volumenom u jednoj sekundi (FEV1) i prisilnim vitalnim kapacitetom (FVC) kao pokazateljima plućne funkcije.[13] Najveći sadržaj luteina nalazi se u tikvici, bundevi, krumpiru, grašku, grahu, mahunama i brokoli (**Tablica 1.**). [5]

Tablica 1. Sadržaj luteina/ zeaksantina u različitim prehrambenim proizvodima. [5]

Izvor hrane	Lutein/zeaksantin (µg/ 100 g)
Sirovi kelj	40,000
Kuhani kelj	16,000
Sirovi špinat	11,000
Kuhani špinat	7,000
Kuhana raštika	8,100
Brokula	2,500
Zelena salata	2,500
Tikvica	2,100
Kukuruz	1,800
Prokulice	1,500
Grašak	1,400
Peršin	800
Zeleni grah	600
Bamija	400
Salata kristalka	350
Kupus	300
Mrkva	300
Mandarina	250

2.2.3 Antioksidacijsko djelovanje

Lutein i zeaksantin učinkovito uklanjaju reaktivne kisikove vrste (eng. ROS, *reactive oxygen species*), osobito singlet kisika i peroksilne radikale. Tijekom gašenja singletnog kisika, molekula luteina u osnovnom stanju prima energiju od singletnog kisika i prelazi u pobuđeno tripletno stanje. Energija luteina u tripletnom stanju lako se raspršuje u okruženje. Prijenos energije od singletnog kisika do luteina vrlo je učinkovit jer su energetske razine tripletnog kisika i luteina te drugih strukturno povezanih karotenoida blizu. Osim toga, lutein i karotenoidi su najučinkovitiji „čistači“ peroksilnih radikala koji nastaju reakcijama peroksidacije lipida u staničnim membranama. Djelovanje luteina protiv peroksidacije pripisuje se njegovom visoko konjugiranom sustavu dvostrukih veza. Smatra se da antioksidacijsko djelovanje *in vitro* ovisi o prirodi vrste oksidirajućih radikala, a manje o strukturi karotenoida. [5] Miki i suradnici dokazali su da lutein ima snažniji učinak gašenja singletnog kisika od astaksantina, te jači učinak uklanjanja slobodnih radikala od β -karotena. Također je utvrđeno da je lutein snažni antioksidans protiv superoksidnog radikala u fotokemiluminiscencijskom testu. [14] Sundelin i Nilsson proučavali su antioksidacijsko djelovanje luteina, zeaksantina i ostalih karotenoida pomoću kulture stanice retine i oksidacijskog markera lipofuscina. Izvijestili su o značajno smanjenom stvaranju lipofuscina nakon tretiranja stanica antioksidacijskim tvarima uključujući lutein i zeaksantin. [15] Seddon i suradnici utvrdili su da lutein i zeaksantin štite lipidne membrane od napada slobodnih radikala te usporavaju oksidaciju lipida izazvanu UV zrakama.

Lutein i zeaksantin se nakupljaju u makularnoj regiji mrežnice i zajednički se nazivaju makularnim pigmentom (MP). Makularna degeneracija povezana sa starošću (AMD) javlja se zbog niske razine MP-a u mrežnici oka. Zbog svojih antioksidacijskih svojstava i filtriranja ultraljubičaste svjetlosti, lutein i zeaksantin mogu zaštititi mrežnicu i smanjiti rizik od razvoja AMD-a. Niska razina luteina i zeaksantina (s godinama) može uzrokovati AMD kod ljudi, što uzrokuje nepovratnu sljepoću. [4] Procjenjuje se da je zahvaćeno 1,6 % stanovništva u dobnoj skupini od 50-65 godina, dok se u dobnoj skupini iznad 75 godina broj oboljelih povećava na 30 %. [5] Richer i suradnici ustanovili su da se nakon 12 mjeseci uzimanja 10 mg luteina oštrina vida kod pacijenata s AMD poboljšala za 5,4 odnosno 3,5 slova na Snellenovom grafikonu.

Osim što smanjuje rizik od AMD, lutein također poboljšava imunološku funkciju, potiskuje rast tumora dojke, povećava proliferaciju limfocita, štiti kožu od oštećenja uzrokovanih ultraljubičastim svjetlom. Smatra se da su mnoge od ovih bolesti povezane s oksidacijskim stresom koji se javlja zbog povećanog broja slobodnih radikala, pa učinak luteina na smanjenje rizika od navedenih bolesti proizlazi iz njegovog antioksidacijskog djelovanja. [5]

Sumantran i suradnici ispitali su učinke luteina i all-trans retinoične kiseline (eng. ATRA, *all trans retinoid acid*) na apoptozu i kemoosjetljivost u primarnim ljudskim epitelnim stanicama dojke, SV40 transformiranim stanicama dojke i MCF-7 stanicama ljudskog karcinoma dojke. Lutein i ATRA su selektivno inducirali apoptozu u transformiranim stanicama te su štitili normalne stanice od apoptoze izazvane agensima poput cisplatina i etopozida. Različiti učinci luteina na apoptotičke puteve u normalnim i transformiranim epitelnim stanicama dojke mogu imati važne implikacije za kemoprevenciju i kemoterapiju. [16]

Sesso i suradnici identificirali su 499 slučajeva pacijenata s kardiovaskularnim bolestima te su pratili koncentraciju nekoliko karotenoida u plazmi tijekom dvije godine. Ustanovili su da su više koncentracije luteina i zeaksantina u plazmi smanjile rizik od kardiovaskularnih bolesti. [18]

Kim i suradnici izvjestili su da lutein u jetri smanjuje upalu i oksidacijski stres (OS), te da ima zaštitne učinke na steatozu jetre. Osim toga, nekoliko studija pokazalo je neuroprotektivnu aktivnost luteina protiv ishemijskog oštećenja mrežnice. Otkrili su da lutein štiti neurone od oštećenja 1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridinom (eng. MPTP, *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine*) i 3-nitropropionskom kiselinom (3-NP) u modelima Parkinsonove i Huntingtonove bolesti. Manayi i suradnici izvjestili su o stvaranju reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta u očima koje predstavljaju opasnost za razvoj katarakte. Lutein koji ima visoko antioksidacijsko djelovanje od velike je važnosti u tom pogledu. Vjeruje se da luteinskom djelovanju protiv katarakte pridonose eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina koje mogu biti prisutne u njegovoj strukturi. [11, 18]

2.2.4 Lutein u hrani za koke nesilice

Žumanjak kokošjeg jajeta smatra se boljim izvorom luteina i zeaksantina u usporedbi s voćem i povrćem, zbog visokog udjela masti koje povećavaju njegovu bioraspoloživost. Razina luteina u jajima povezana je s hranom s kojom se hrane koke nesilice, budući da ga koke nesilice unose hranom jer ga ne mogu sintetizirati. Sadržaj luteina i zeaksantina u kokošjem jajetu iznosi 292 ± 117 $\mu\text{g}/\text{žumanjku}$, odnosno 213 ± 85 $\mu\text{g}/\text{žumanjku}$ i ovisi o vrsti hrane kojom se hrane koke nesilice. Brojne vrste pšenice kao što su einkorn (jednozrna) i durum pšenica te kukuruz imaju potencijal za razvoj funkcionalne hrane s visokim sadržajem luteina. Sadržaj luteina u visokoluteinskim vrstama pšenice kreće se od 5,4 do 7,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ pšenice, a u kukuruзу oko 21,9 $\mu\text{g}/\text{g}$ kukuruza. Utvrđeno je da lutein, zeaksantin i drugi karotenoidi imaju različitu koncentraciju u različitim vrstama kukuruza. Među pet vrsta kukuruza, uključujući bijeli, žuti, visoko-karotenoidni, plavi i crveni kukuruz, sadržaj luteina je najveći u žutom kukuruзу (406 $\mu\text{g}/100$ g), a najmanji u plavom i bijelom kukuruзу (5,2 odnosno 5,7 $\mu\text{g}/100$ g). [19, 20, 21]

Kako bi se pojednostavila i regulirala upotreba aditiva u prehrani koka nesilica, uvedeni su propisi o hrani. Europska Unija, Kanada, Sjedinjene Američke Države i druge zemlje dopuštaju korištenje sintetskih ksantofila kao dodataka hrani. Odobreno je osam karotenoida koji se mogu upotrijebiti kao aditivi: kapsantin, β -kriptoksantin, lutein, zeaksantin, β -apo-8'-karotenal, etil ester β -apo-8'-karotenske kiseline, kantaksantin i citranaksantin. [4]

Wang i suradnici uočili su povećani sadržaj luteina u mrežnici i drugim tkivima kada su koke konzumirale hranu koja sadrži velike količine luteina. Međutim, suplementacija zeaksantinom i β -karotenom smanjila je sadržaj luteina u mrežnici, plazmi i drugim tkivima, što ukazuje na mogući antagonizam među karotenoidima. [22] Adabi i suradnici utvrdili su da 250 mg luteina/kg hrane povećava sadržaj luteina u žumanjku, dok 500 ili 750 mg luteina/kg hrane nije dodatno povećalo njegov sadržaj u žumanjku. Ova studija pokazala je da linearni odnos između razine luteina u hrani i njegovog taloženja u jajima može biti ograničen iznad određenog sadržaja luteina u hrani. [23]

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je kemijski postupak odjeljivanja tvari iz smjese djelovanjem ekstrakcijske smjese odnosno otapala. Temelji se na različitoj topljivosti tvari, odnosno raspodjeli otopljene tvari između dva različita otapala koja se međusobno ne miješaju. U laboratorijima se primjenjuje za pročišćavanje uzoraka. [24] Upotreba otapala za ekstrakciju, način pripreme uzorka, trajanje ekstrakcije, omjer uzorka i otapala za ekstrakciju i temperatura utječu na sastav i koncentraciju aktivnih spojeva u ekstraktu. Uvjeti ekstrakcije imaju ključnu ulogu u određivanju ukupne učinkovitosti ekstrakta. Općenito, preporuča se izvođenje ekstrakcije na nižoj temperaturi kako ne bi došlo do značajnog gubitka aktivne tvari ekstrakta. [25] Konvencionalne tehnike ekstrakcije kruto-tekuće su dugotrajne i koriste velike količine štetnih organskih otapala. Iz tih razloga u posljednja dva desetljeća povećao se interes za razvoj ekoloških prihvatljivijih („zelenijih“) tehnologija ekstrakcije. Zeleniji postupak ekstrakcije uključuje smanjenje potrošnje organskih otapala, energije, troškova i vremena ekstrakcije. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. UAE, *ultrasound assisted extraction*) ključna je u postizanju cilja održivog koncepta zelene kemije. [26]

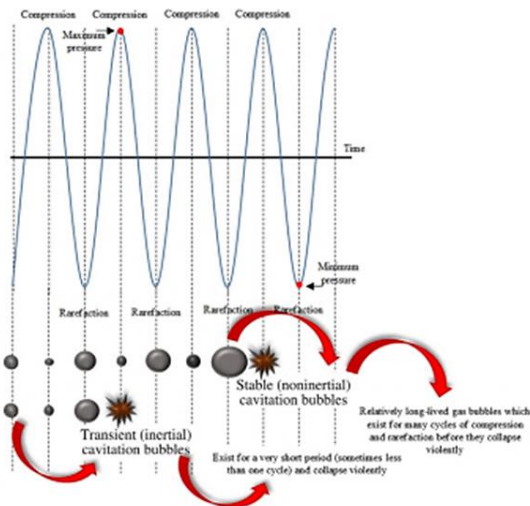
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvuk je izvor energije koji se razlikuje od čujnih zvukova po frekvencijskim rasponima. Glavni fizikalni parametri koji ga karakteriziraju su snaga, frekvencija i valna duljina. Iz ovih parametara može se izračunati ultrazvučni intenzitet koji je neophodan za klasifikaciju primjene ultrazvuka. Ultrazvuk se može podijeliti u dvije skupine: dijagnostički ultrazvuk i ultrazvuk snage. Dijagnostički ultrazvuk je ultrazvuk niskog intenziteta i visoke frekvencije u rasponu od 100 kHz do 1 MHz ($I = 1 \text{ W/cm}^2$), te se primjenjuje u nedestruktivnoj analizi za osiguravanje kvalitete i kontrolu procesa. Za razliku od njega, ultrazvuk snage je ultrazvuk visokog intenziteta i niske frekvencije u rasponu od 16 -100 kHz ($I = 10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$), te se primjenjuje u ekstrakciji i obradi uzoraka. [26] Uzorak ili biljna masa izložena je ultrazvučnim valovima visokog intenziteta (20 kHz -100 MHz) pri čemu dolazi do stvaranja kavitacije, odnosno sitnih mjehurića oko stanice.

Tijekom postupka ekstrakcije mjehurići se urušavaju pri čemu nastaju udarni valovi koji dezintegriraju staničnu stjenku i oslobađaju njezin unutarstanični sadržaj, čime se poboljšava oslobađanje ciljanih spojeva. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom jednostavna je za rukovanje, relativno jeftina, povećava prijenos mase i kinetiku, prikladna je za širok raspon otapala za industrijsku primjenu. Na učinkovitost UAE utječu temperatura otapala, tlak, učestalost ultrazvučnih valova/energije i vrijeme djelovanja ultrazvukom. [25]

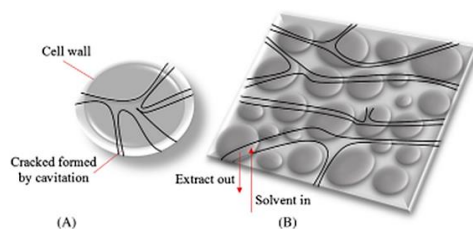
2.3.2. Kavitacija

Glavna pokretačka snaga za ekstrakcijske učinke ultrazvučne obrade je akustična kavitacija. Širenjem ultrazvuka kroz medij inducira se niz kompresija i razrjeđivanja u molekulama medija. Takve naizmjenične promjene tlaka uzrokuju stvaranje i u konačnici urušavanje mjehurića u tekućem mediju. Mjehurići koji nastaju djelovanjem ultrazvuka mogu promijeniti svoju veličinu tijekom ciklusa razrjeđivanja i kompresije (*Slika 3.*). Nastali mjehurići rastu tijekom nekoliko ciklusa kako bi dosegli „kritičnu“ veličinu, a potom se silovito urušavaju i oslobađaju velike količine energije. Kolaps mikromjehurića stvara ekstremne lokalne uvjete, temperaturu od oko 5000 K i tlak od 50-100 atm, a takva područja s visokom temperaturom i tlakom nazivaju se vrućim točkama, koje značajno povećavaju kemijsku reaktivnost u mediju. [26]



Slika 3. Akustična kavitacija. [26]

Nastali kavitacijski mjehurići mogu se podijeliti u dvije skupine: prolazna (inercijska) i stabilna (neinercijalna) kavitacija. Stabilnom kavitacijom nastaju relativno dugovječni mjehurići plina i postoje u mnogim ciklusima kompresije i razrjeđivanja. Dok prolaznom kavitacijom nastaju kavitacijski mjehurići kratkog vijeka, ponekad im je vijek trajanja kraći od jednog ciklusa. Promjene temperature i tlaka koje nastaju zbog urušavanja kavitacijskih mjehurića uzrokuju smicanje, stanjivanje staničnih membrana i stanični poremećaj, što rezultira pojačanim prodiranjem otapala u stanicu te pojačanim prijenosom mase ciljanih spojeva u otapalo (*Slika 4.*). Osim toga, urušavanje dovodi do stvaranja turbulencija na mikroskopskoj razini, velikih brzina međučestičnih sudara i agitacije u mikroporoznim česticama matrice, što ubrzava difuziju. [26, 27]



Slika 4. Mehanizam narušavanja stanične stjenke:

- (A) - narušavanje stanične stjenke zbog kavitacije
- (B) – difuzija otapala u staničnu strukturu. [27]

Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitaciju ovisi o njegovim karakteristikama (intenzitet i učestalost), svojstvima medija (površinska napetost i viskoznost) i uvjetima okoline (tlak i temperatura). [27] Ultrazvučna frekvencija određuje veličinu mikromjehurića i otpor prijenosa mase. Kada se frekvencija ultrazvuka poveća, intenzitet kavitacije u tekućini se smanjuje. Osim toga, pri visokim frekvencijama ciklus kompresije-razrjeđivanja može biti prekratak da bi nastala odgovarajuća veličina mikromjehurića. Zbog toga je trajanje faze razrjeđivanja obrnuto proporcionalno frekvenciji ultrazvuka.

Kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom vrijednost ultrazvučnog intenziteta snažno utječe na sonokemijske učinke i učinkovitost ekstrakcije. Intenzitet ultrazvuka povezan je s amplitudom akustičnog vala. Povećanje amplitude rezultira snažnijim procesom urušavanja mjehurića te većim intenzitetom ultrazvuka.

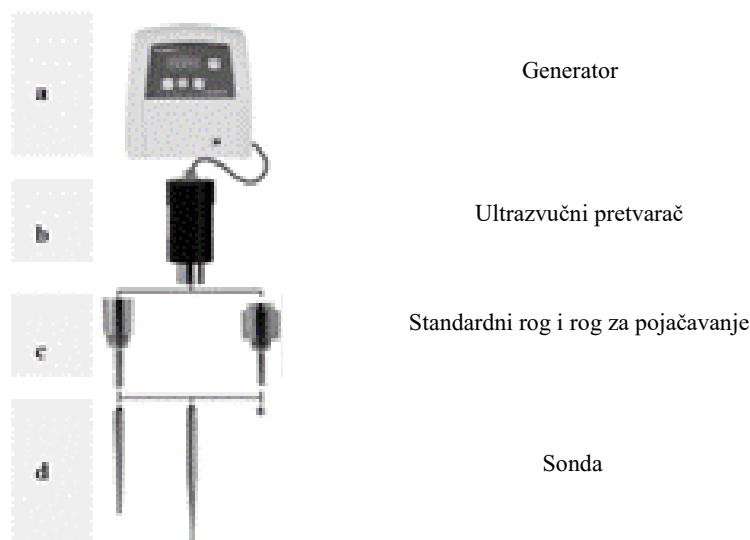
Velike amplitude ometaju rad pretvornika ultrazvuka što rezultira miješanjem tekućine umjesto pojave kavitacije i slabim prijenosom akustičnog vala kroz tekućinu. Međutim, amplitudu treba povećati kada se radi s uzorcima visoke viskoznosti, poput ulja i krvi. Otapalo koje se koristi za obradu uzoraka UAE mora biti pažljivo odabrano, stoga je potrebno uzeti u obzir fizikalne parametre kao što su viskoznost, površinska napetost i tlak para otapala. Navedeni parametri utječu na pojavu kavitacije. Što su veće prirodne kohenzivne sile između molekula koje čine otapalo (visoka viskoznost i visoka površinska napetost), to je teže postići kavitaciju. Temperatura otapala ima dvije uloge u ultrazvučnoj obradi. S jedne strane, korištenjem visokih temperatura narušavaju se snažne interakcije otopljene tvari i matrice što rezultira bržom difuzijom. S druge strane, pri porastu temperature može se primijetiti porast tlaka pare otapala. Navedena činjenica uzrokuje da više para otapala popuni kavitacijske mjehuriće, koji se onda manje snažno urušavaju i smanjuju se učinci djelovanja ultrazvuka. Stoga je optimiranje temperature od velike važnosti kako bi se dobili zadovoljavajući učinci i prinosi ekstrakcije. Na sonokemijske učinke utječe i vanjski tlak. Ako se vanjski tlak poveća, tada je potrebna veća ultrazvučna energija da se izazove kavitacija, odnosno da se razbiju molekularne sile otapala. Za određenu frekvenciju postoji određeni vanjski tlak koji će osigurati optimalnu sonokemijsku reakciju. [26, 28]

2.3.3. Ultrazvučna sonda

Ultrazvučna sonda koja je uronjena u uzorak, primjer je izravne primjene ultrazvuka u analitičkoj kemiji. Ultrazvuk se širi u otopini bez ikakve barijere koja može nadvladati ultrazvučni val, osim samog medija. [28] Ova metoda ima nekoliko nedostataka a to su kontaminacija uzorka metalima odvojenim od sonde (npr. aluminij ili krom) i gubitak hlapljivih spojeva zbog upotrebe ultrazvučnih sondi u otvorenim sustavima.

Glavni dijelovi ultrazvučne sonde su:

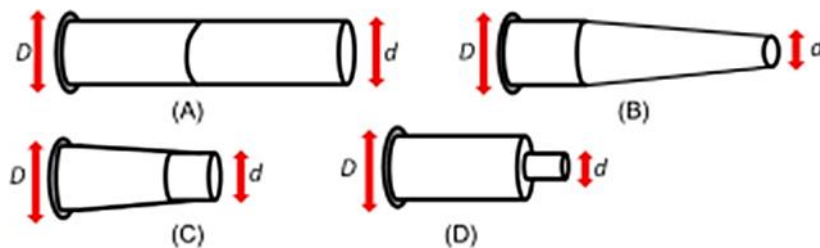
1. **Generator** - zadužen za pretvorbu napona u visokofrekventnu električnu energiju
2. **Ultrazvučni pretvarač**- pretvara električnu energiju u mehaničke vibracije pri konstantnoj frekvenciji
3. **Standardni rog i rogovi za pojačavanje** – povećavaju amplitudu sonikacije
4. **Sonde**- prenose ultrazvučnu energiju u uzorak. (*Slika 5.*)



Slika 5. Glavni dijelovi ultrazvučne sonde. [28]

Dizajn sonde je ključan za dobru učinkovitost UAE jer oblik i promjer sonde utječu na povećanje snage. Ultrazvučne sonde velike snage obično se preferiraju zbog svoje visoke učinkovitosti ekstrakcije i mogućnosti povećanja prinosa u kraćem vremenu ekstrakcije. Postoji nekoliko oblika sonde: stepenasta, eksponencijalna, cilindrična i linearna (**Slika 6.**).

Stepenasta sonda daje najveće povećanje amplitude, dok je eksponencijalni oblik sonde zbog svojih malih promjera na radnim krajevima prikladan za mikro primjene. [26, 28]



Slika 6. Različiti oblici sonde:

- (A)- cilindrični,
- (B)- eksponencijalni,
- (C)- linearni,
- (D)- stepenasti. [28]

Ultrazvučne sonde najčešće se izrađuju od legura titana jer su termootporne, mogu se obrađivati u autoklavu i otporne su na korozivne medije. Spiralne sonde izrađene od titana (Ti) ili aluminijske (Al) pružaju nježnu ultrazvučnu obradu vodenih medija u epruvetama ili drugim tankim laboratorijskim posudama. Ultrazvučna snaga se raspoređuje po cijeloj površini spiralne sonde, čineći tako raspodjelu intenziteta ultrazvuka homogenijom po cijeloj dužini sonde. Budući da takve sonde mogu kontaminirati medij, provode se istraživanja o korištenju novih materijala (kvarc, silicij) za vrhove ultrazvučnih sondi, što bi moglo riješiti problem kontaminacije otopina za ekstrakciju. Silikatne sonde ne dovode do kontaminacije uzorka metalima, imaju visoku otpornost na temperaturu i ne pokazuju električnu vodljivost. Međutim, potrebno je riješiti nekoliko nedostataka ovakve sonde. Zbog male čvrstoće silicijskog stakla imaju ograničenu amplitudu, krhke su tijekom rada i ne smiju se postavljati na čvrstu površinu.[28]

2.3.4. Ultrazvučna kupelj

Neizravna primjena UAE provodi se pomoću ultrazvučne kupelji u kojoj ultrazvučni val prvo treba proći kroz tekućinu unutar ultrazvučnog uređaja, a zatim stjenku posude u kojoj se nalazi uzorak. To uzrokuje da je intenzitet ultrazvuka unutar posude za uzorke niži od očekivanog. Ultrazvučna kupelj sastoji se od spremnika izrađenog od nehrđajućeg čelika s jednim ili više ultrazvučnih pretvornika. Raspodjela intenziteta ultrazvuka unutar ultrazvučne kupelji je heterogena, zbog čega bi reakcijski spremnik trebao biti postavljen na mjestu gdje se postiže najveći intenzitet ultrazvučne obrade. Također od velike važnosti je i oblik reakcijske posude, da bi se postigla minimalna refleksija ultrazvuka, posuda s ravnim dnom kao što je stožasta tikvica, bila bi najbolji izbor. Debljina posude također treba biti minimalna. Vrste ultrazvučnih kupelji prikazane su u **tablici 2**. [26, 28]

Tablica 2. Vrste ultrazvučnih kupelji i njihove karakteristike. [28]

Vrsta ultrazvučne kupelji	Karakteristike
Klasična ultrazvučna kupelj	- radi na jednoj frekvenciji (40 kHz) - regulacija temperature
Ultrazvučna kupelj s više frekvencija	- koristi istovremeno ultrazvučne pretvornike s različitim frekvencijama (npr. 25 i 40 kHz)
Ultrazvučna kupelj s najnaprednijim uvjetima tehnologije	- dvostruka frekvencija ultrazvuka - radi s jednom od dvije frekvencije istovremeno (25/45 ili 35/130 kHz), - regulacija snage - mogućnost kontrole intenziteta (amplitude) (10 % - 100 %) Tri načina rada: 1. Sweep: frekvencija varira unutar definiranog raspona. Ultrazvučna učinkovitost je homogenije raspoređena u kupelji nego tijekom standardnog rada. 2. Standardno: frekvencija je regulirana mehaničkom rezonancijom ultrazvučnog pretvornika 3. Degas: snaga se prekida na kratko kako ultrazvučne sile ne bi zadržale mjehuriće - regulacija topline i vremena

2.4. OTAPALA

Visoka lipofilnost luteina i srodnih estera određuje njegovu topljivost u ekstrakcijskom otapalu, stoga učinkovitost ekstrakcije luteina iz različitih matrica uzoraka može varirati. Iako se nepolarna otapala poput heksana koriste u ekstrakciji karotenoida, ksantofili poput luteina ekstrahiraju se relativno polarnim otapalima poput polietilen-glikola i dietil-etera. Tetrahidrofuran i metanol također se mogu dodati uzorku hrane za bolju učinkovitost ekstrakcije. [4] Prema standardnoj metodi kao ekstrakcijska smjesta upotrebljava se heksan:acetone:toulen:etanol=10:7:7:6. [29] Osim navedenih otapala, kao ekstrakcijske smjese mogu se još upotrijebiti metanol:acetone= 1:1, etilacetat, acetone, propan-2-ol, etanol, 2-metiltetrahidrofuran (MTHF). [10, 30, 31]

2.4.1. Zelena otapala

Za konvencionalne tehnike ekstrakcije većinom se upotrebljavaju teška organska otapala poput kloroforma, heksana, diklormetana i dietil-etera, koja su ekološki neprihvatljiva i stvaraju velike količine otpada. U posljednje vrijeme sve više pažnje pridaje se zelenim otapalima koja su ekološki prihvatljivija te su u skladu sa 12. principa zelene kemije. Takva otapala su biorazgrađiva, te se dobivaju iz obnovljivih izvora energije. Osim toga odlikuje ih niz poželjnih svojstava kao što su vrlo niska toksičnost, slaba zapaljivost te nizak potencijal za eksploziju. Razvijeno se je više metoda (SMART, SAGE, PARIS II) kojima je cilj odabrati što više ekološki prihvatljivije otapalo, a da se time ne smanji učinkovitost i iskorištenje kemijskog procesa. Primjer zelenih otapala prikazan je u **tablici 3.** [32]

Tablica 3. Pfizerova metoda i preporuke za odabir zelenih otapala. [32]

POŽELJNA OTAPALA	UPOTREBLJIVA OTAPALA	NEPOŽELJNA OTAPALA
Voda	Cikloheksan	Pentan
Aceton	Toulen	Heksan
Etanol	Heptan	Dietil-eter
Propan-1-ol	Metilcikloheksan	Diizopropil-eter
Propan-2-ol	Izooktan	Diklormetan
Etil-acetat	Acetonitril	Dikloretan
Izopropil-acetat	Tert-butil-metil-eter	Kloroform
Metil-etil-keton	2-metiltetrahidrofuran	Dimetilformamid
Metanol	Tetrahidrofuran	N-metil-2-pirolidon
Butan-1-ol	Octena kiselina	Piridin
<i>tert</i> -butanol	Etilen-glikol	Dimetilacetamid
	Dimetil-sulfoksid	1,4-dioksan
	Ksilen	Benzen
		Dimetoksietan
		Tetraklormetan

2.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

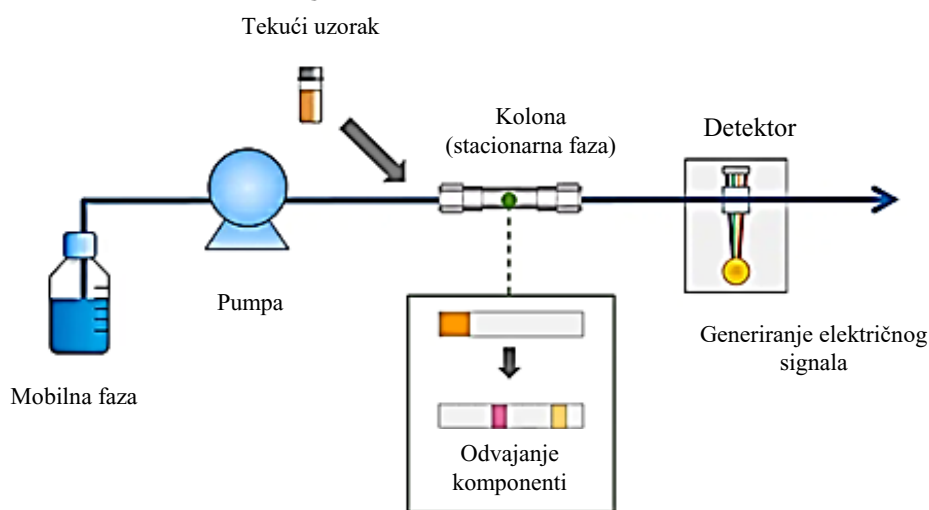
HPLC je kratica za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*), analitičku tehniku koja odvaja spojeve otopljene u tekućem uzorku i omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu različitih komponenti koje sadrži uzorak. Otapalo koje se koristi za odvajanje komponenti u tekućem uzorku za HPLC analizu naziva se mobilna faza. Mobilna faza se isporučuje u kolonu koja je ispunjena stacionarnom fazom, a zatim u detektor stabilnom brzinom protoka koju kontrolira pumpa za isporuku otapala. Određena količina uzorka se ubrizgava u mobilnu fazu a u koloni se odvajaju spojevi sadržani u uzorku. Spojevi odvojeni u koloni detektiraju se detektorom koji se smješta nakon kolone i koji svaki spoj koji se nalazi u uzorku identificira i kvantificira. Vrsta detektora odabire se ovisno o svojstvima analita. Detektori koji se najčešće upotrebljavaju su: UV-VIS detektor, detektor fluorescentnih zraka, foto-diodni detektor, detektor indeksa loma i detektor električne vodljivosti. [33]

Dijelovi HPLC-a i njihova uloga (*Slika 7.*) :

- 1. Pumpa** – isporučuje mobilnu fazu kontroliranom brzinom protoka.
- 2. Jedinica za otplinjavanje (otplinjač)** - zrak se lako može otopiti u mobilnoj fazi pri atmosferskom tlaku. Ako mobilna faza sadrži mjehuriće zraka i uđe u pumpu, može doći do fluktuacije brzine. Jedinica za otplinjavanje pomaže u sprječavanju ovog problema uklanjanjem mjehurića zraka u mobilnoj fazi.
- 3. Injektor uzorka** - uvodi standardnu otopinu ili otopinu uzorka u mobilnu fazu.
- 4. Kolona** - ispunjena stacionarnom fazom koja može biti polarna ili nepolarna. HPLC normalnih faza je naziv za kolonu u kojoj je stacionarna faza polarna, dok je mobilna faza koja se isporučuje u kolonu nepolarna. U HPLC-u obrnutih faza, stacionarna faza je nepolarna, dok je mobilna faza za razliku od nje polarna.
- 5. Pećnica za kolonu** – kolona se stavlja u pećnicu kako bi se temperatura održavala konstantnom.
- 6. Detektor** - detektira spojeve eluirane iz kolone.

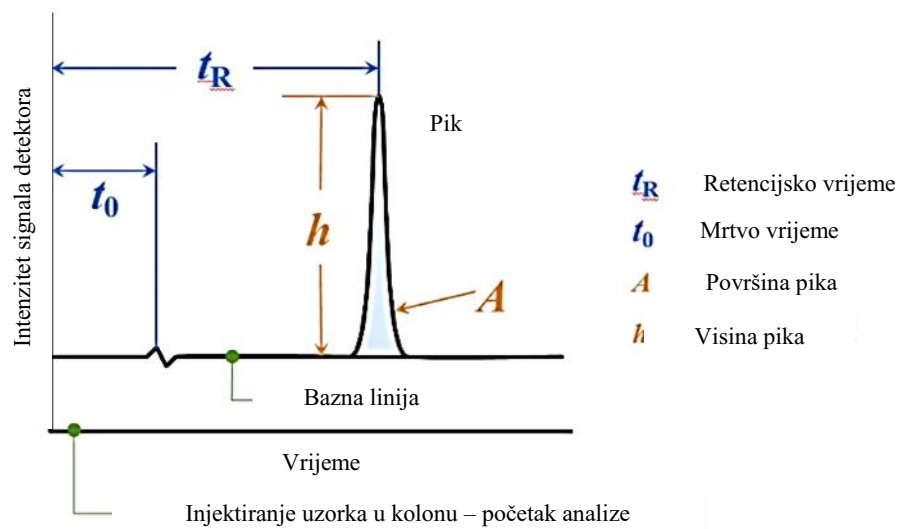
7. Sustav za obradu podataka - obrađuje signal iz detektora kako bi se dobio kromatogram za identifikaciju i kvantificiranje spojeva.

HPLC detektira spojeve na temelju njihove razlike u brzini prolaska kroz kolonu. Jači afinitet (npr. Van der Waalsova sila) između komponente i mobilne faze omogućuje brže kretanje komponente kroz kolonu zajedno s mobilnom fazom. S druge strane, što je jači afinitet sa stacionarnom fazom, to se ona sporije kreće kroz stupac kolone. [33]



Slika 7. Dijelovi HPLC-a. [33]

Kromatogram je dvodimenzionalni dijagram s okomitom osi koja prikazuje koncentraciju analita i horizontalnom osi koja predstavlja vrijeme analize. Kada se iz stupca ne eluiraju spojevi iscrtava se linija paralelna s vodoravnom osi, koja se naziva baznom linijom. Detektor reagira na temelju koncentracije ciljanog spoja u vrpci eluiranja. Vrijeme zadržavanja (t_R) vremenski je interval između injektiranja uzorka i pojave njegovog signala na detektoru. Potrebno vrijeme da nezadržani spojevi (spojevi bez interakcije za stacionarnu fazu) prijeđu od injektora do detektora naziva se mrtvo vrijeme (t_0). Visina pika (h) je okomita udaljenost između vrha pika i bazne linije, dok je površina pika (A) područje zatvoreno vrhom pika i baznom linijom. Rezultati dobiveni kromatogramom koriste se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu komponenti uzorka (**Slika 8.**). [33]



Slika 8. Kromatogram. [33]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

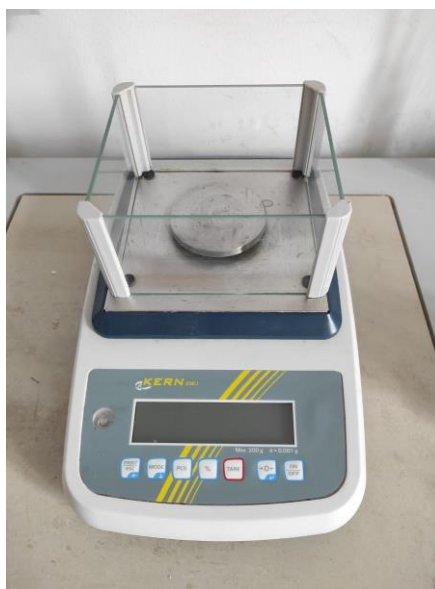
3.1. Kemikalije

- n-heksan, HPLC čistoće
- aceton
- toulen
- etanol, apsolutni, bezvodni
- propan-2-ol
- metanol, HPLC čistoće
- tetrahidrofuran (THF), HPLC čistoće
- etilacetat (Fisher Scientific, UK)
- 40 % metanolna otopina kalijevog hidroksida (KOH)
- 5 % i 10 % metanolna otopina natrijevog hidroksida (NaOH)
- 10 % vodena otopina natrijevog sulfata (Na₂SO₄)
- 0,2 % metanolna otopina 2,6-di-tert-butil-4-metilfenola (BHT)
- 0,2 % metanolna otopina askorbinske kiseline

3.2. Pribor i instrumentacija

- staklene epruvete s čepom
- tamne kivete za centrifugiranje (PP)
- kivete za centrifugiranje (PP)
- HPLC vijalice
- graduirana pipeta (1 mL)
- mikropipeta
- čaše
- odmjerne tikvice
- analitička vaga (Sartorius) (*Slika 9.*)
- laboratorijska tresilica (vorteks), (IKA)
- magnetska mješalica s grijačem (IKA)

- centrifuga (Hettich) (*Slika 10.*)
- ultrazvučna kupelj s regulatorom temperature (Bandelin, Berlin, Njemačka) (*Slika 11.*)
- sustav za ultrazvučnu homogenizaciju (Sonoplus 3100, Bandelin, Berlin, Njemačka) (*Slika 12.*)
- uređaj za kromatografiju visoke djelotvornosti (Shimadzu) (*Slika 13.*)



Slika 9. Analitička vaga (Sartorius).



Slika 10. Centrifuga (Hettich).



Slika 11. Ultrazvučna kupelj s regulatorom temperature (Bandelin, Berlin, Njemačka).



Slika 12. Sustav za ultrazvučnu homogenizaciju (Sonoplus 3100, Bandelin, Berlin, Njemačka).

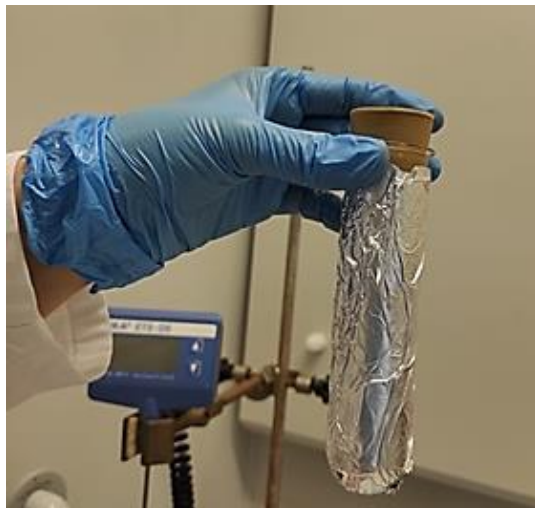


Slika 13. Uređaj za kromatografiju visoke djelotvornosti (Shimadzu).

3.3. Opis korištenih metoda

3.3.1. Standardna metoda

U staklene kivete od 50 mL izvagano je 1 g uzorka hrane za koke nesilice u koju je dodano 15 mL ekstrakcijske smjese (heksan:aceton:etanol:toulen= 10:7:6:7) i 1 mL 0,2 % metanolne otopine BHT-a. Sadržaj je promiješan na vorteksu 30 sekundi i potom je dodano 2 mL ultračiste vode i 2 mL 40 % metanolne otopine KOH te je smjesa ponovno promiješana na vorteksu 30 sekundi. Kivete su obložene aluminijskom folijom kako bi se smanjio utjecaj svjetla na uzorke, te su stavljene na zagrijavanje u vodenu kupelj na 56 °C, 20 minuta (*Slika 14.*) Nakon zagrijavanja epruvete su ostavljene u mraku 1 sat. Potom je u smjesu dodano 15 mL n-heksana i 5 mL 10 % vodene otopine Na₂SO₄ (*Slika 15.*) nakon čega se smjesa promiješala. Smjesa je ponovno ostavljena 1 sat u mraku kako bi se slojevi odijelili. Alikvot gornjeg heksanskog sloja profiltriran je kroz filter s veličinom pora 0,20 μm te je 1 mL uzorka uparavan na rotvaporu na 55 °C. Nakon uparavanja, svakom uzorku je dodano 1 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. U vijalicu je preneseno 1 mL tako pripremljenog uzorka i uzorak je analiziran na HPLC-u. [34]



Slika 14. Epruveta obložena aluminijskom folijom prije zagrijavanja.



Slika 15. Gornji heksanski sloj nakon dodatka n-heksana i 10 % vodene otopine Na_2SO_4 .

3.3.2. Metoda 1

U tamne PP kivete za centrifugu od 50 mL izvagano je 1 g uzorka hrane za koke nesilice u koju je dodano 19 mL ekstrakcijske smjese metanol:aceton = 1:1 i 1 mL 0,2 % metanolne otopine BHT-a. Sadržaj je promiješan na vorteksu 30 sekundi. Ekstrakcija je potpomognuta ultrazvukom pomoću ultrazvučne sonde tokom 3 minute (*Slika 16.*). Uzorci su ostavljeni u mraku 10 minuta, nakon čega su centrifugirani 10 minuta na 6000 rpm. Supernatant je profiltriran kroz filter s veličinom pora 0,45 μm i 1 mL profiltriranog supernatanta je upareno na rotavaporu do suhog, nakon čega je dodano 1 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. U vijalicu je preneseno 1 mL tako pripremljenog uzorka i uzorak je analiziran na HPLC-u.

3.3.2.1. Metoda 1 uz saponifikaciju

U tamne PP kivete za centrifugu od 50 mL izvagano je 1 g uzorka hrane za koke nesilice u koju je dodano 15 mL ekstrakcijske smjese metanol:aceton = 1:1, 2 mL 0,2 % metanolne otopine BHT-a i 3 mL 40 % metanolne otopine KOH. Sadržaj je promiješan na vorteksu 30 sekundi. Ekstrakcija je potpomognuta ultrazvukom pomoću ultrazvučne sonde tokom 3 minute. Uzorci su ostavljeni u mraku 10 minuta, nakon čega su centrifugirani 10 minuta na 6000 rpm. Supernatant je profiltriran kroz filter s veličinom pora 0,45 μm i 1 mL profiltriranog supernatanta je upareno na rotavaporu do suhog, nakon čega je dodano 1 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. U vijalicu je preneseno 1 mL tako pripremljenog uzorka i uzorak je analiziran na HPLC-u.



Slika 16. Direktna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UZVS).

Prethodno navedene i opisane metode (standardna metoda, metoda 1, metoda 1 uz saponifikaciju) korištene su za pripremu neusitnjenih i usitnjenih uzoraka, a metode koje će biti opisane u nastavku korištene su za pripremu usitnjenih uzoraka.

3.3.3. Metoda 2

U tamne kivete za centrifugu od 15 mL izvagano je 1 g usitnjenog uzorka hrane za koke nesilice u koju je dodano 2 mL 10 % vodene otopine askorbinske kiseline, 5 mL propan-2-ola i smjesa je promiješana na vorteksu 10 sekundi. Nakon miješanja na vorteksu uzorci su stavljeni u ultrazvučnu kupelj 15 minuta a potom su centrifugirani 20 min na 4 °C i 5000 rpm. Izdvojeno je 3 mL supernatanta u bočicu za uparavanje i ostavljeno na tamnom mjestu. Uzorak u tamnim kivetama za centrifugu ponovno je ekstrahiran dodatkom 3 mL propan-2-ola i postupak je ponovljen. Nakon centrifugiranja, 2 mL supernatanta je preneseno u bočice za uparavanje. Prikupljeni supernatant uparavan je na rotavaporu pod sniženim tlakom. Nakon uparavanja dodano je 2 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. Uzorci su promiješani i preneseni u vijalicu za HPLC analizu. [30]

3.3.3.1. Metoda 2 uz saponifikaciju

U tamne kivete za centrifugu od 15 mL izvagano je 1 g usitnjenog uzorka hrane za koke nesilice u koju je dodano 5 mL propan-2-ola, 2 mL 10 % askorbinske kiseline u propan-2-olu, 3 mL 5 % odnosno 10 % NaOH u propan-2-olu. Sadržaj je promiješan na vorteksu 30 sekundi, te su uzorci stavljeni na zagrijavanje u vodenu kupelj 30 minuta na 60 °C. Uzorci su ostavljeni u mraku 15 minuta da se ohlade i stavljeni su 15 minuta na ultrazvučnu kupelj, potom su centrifugirani 20 minuta na 4 °C i 5000 rpm. U bočice za uparavanje preneseno je 5 mL supernatanta i upareno na rotavaporu pod sniženim tlakom. Nakon uparavanja dodano je 2 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. U vijalicu je preneseno 1 mL uzorka profiltriranog kroz filtere s veličinom pora 0,45 µm.

3.3.4. Metoda 3

U tamne kivete za centrifugu od 15 mL izvagano je 1 g usitnjenog uzorka hrane za koke nesilice u koje je dodano 2 mL 10 % vodene otopine askorbinske kiseline, 5 mL smjese metanol:aceton = 1:1 i sve je miješano na vorteksu 10 sekundi. Nakon miješanja na vorteksu, ekstrakcija je potpomognuta ultrazvukom korištenjem ultrazvučne sonde 3 minute i potom su uzorci centrifugirani 10 min na 4 °C i 5000 rpm. Izdvojeno je 3 mL supernatanta u bočicu za uparavanje i ostavljeno na tamnom mjestu. U tamne kivete za centrifugu s uzorkom ponovno je dodano 3 mL smjese metanol:aceton= 1:1 i postupak je ponovljen. Nakon centrifugiranja, 2 mL supernatanta je preneseno u bočice za uparavanje. Prikupljeni supernatant uparavan je na rotavaporu pod sniženim tlakom. Nakon uparavanja dodano je 2 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. Uzorci su promiješani i 1 mL prenesen je u vijalicu za HPLC analizu.

3.3.4.1. Metoda 3 uz saponifikaciju

U tamne kivete za centrifugu od 15 mL izvagano je 1 g usitnjenog uzorka hrane za koke nesilice u koji je dodano 5 mL smjese metanol:acetone = 1:1, 2 mL 10 % metanolne otopine askorbinske kiseline, 3 mL 5 % odnosno 10 % metanolne otopine NaOH. Sadržaj je promiješan na vorteksu 30 sekundi, te su uzorci stavljeni na zagrijavanje u vodenu kupelj 30 minuta na 60 °C. Uzorci su ostavljeni u mraku 15 minuta da se ohlade, nakon čega je provedena ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom korištenjem ultrazvučne sonde 3 minute. Uzorci su potom centrifugirani 10 minuta na 4 °C i 5000 rpm. U bočice za uparavanje preneseno je 5 mL supernatanta i upareno na rotavaporu pod sniženim tlakom. Nakon uparavanja dodano je 2 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. U vijalicu je preneseno 1 mL profiltriranog uzorka (0,45 µm).

Ova metoda korištena je i za usporedbu vremena ekstrakcije odnosno vremena nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvučnom sondom, uzorci su ostavljeni 1 h na tamnom nakon čega su centrifugirani 10 minuta na 4 °C i 5000 rpm te su dalje pripremljeni na prethodno opisan način.

3.3.5. Metoda 4

U staklene bočice od 50 mL izvagano je 1 g uzorka hrane za koke nesilice u koju je dodano 15 mL ekstrakcijske smjese metanol:acetone = 1:1 i 1 mL 0,2 % metanolne otopine BHT-a. Sadržaj je promiješan na vorteksu 30 sekundi i potom je dodano 2 mL ultračiste vode, 2 mL 40 % metanolne otopine KOH te je smjesa ponovno promiješana na vorteksu 30 sekundi. Bočice sa uzorcima su stavljene na zagrijavanje u vodenu kupelj na 56 °C, 20 minuta. Nakon zagrijavanja uzorci su ostavljeni na tamnom 1 h. Potom je u smjesu dodano 15 mL n-heksana i 5 mL 10 % vodene otopine Na₂SO₄ (*Slika 17.*). Smjesa je ponovno ostavljena 1 h na tamnom kako bi se slojevi odijelili. Alikvot gornjeg heksanskog sloja profiltriran je kroz filter s porama 0,45 µm te je 1 mL uzorka uparavan na rotavaporu na 55 °C. Nakon uparavanja, svakom uzorku je dodano 1 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. U vijalicu je preneseno 1 mL tako pripremljenog uzorka i uzorak je analiziran na HPLC-u.

3.3.5.1. Modificirana metoda 4

U staklene bočice od 50 mL izvagano je 1 g uzorka hrane za koke nesilice u koju je dodano 15 mL ekstrakcijske smjese metanol:acetone = 1:1 i 1 mL 0,2 % metanolne otopine BHT-a. Sadržaj je promiješan na vorteksu 30 sekundi i potom je dodano 2 mL ultračiste vode, 2 mL 40 % metanolne otopine KOH te je smjesa ponovno promiješana na vorteksu 30 sekundi. Bočice s uzorkom su stavljene na zagrijavanje u vodenu kupelj na 56 °C, 20 minuta. Nakon zagrijavanja uzorci su ostavljeni na tamnom 1 h. Potom je u smjesu dodano 15 mL etilacetata i 5 mL 10 % vodene otopine Na₂SO₄ (*Slika 17.*). Smjesa je ponovno ostavljena 1 h na tamnom kako bi se slojevi odijelili. Alikvot gornjeg sloja etilacetata profiltriran je kroz filter s veličinom pora 0,45 µm te je 1 mL uzorka uparavan na rotvaporu na 55 °C. Nakon uparavanja, svakom uzorku je dodano 1 mL smjese heksan:etilacetat u omjeru 65:35. U vijalicu je preneseno 1 mL tako pripremljenog uzorka i uzorak je analiziran na HPLC-u.



Slika 17. Usporedba gornjeg sloja etilacetata (lijevo) i heksana (desno).

3.4. Odabir i provjera najuspješnije metode ekstrakcije

Najuspješnija metoda ekstrakcije odabrat će se prema rezultatima HPLC analize sadržaja luteina u pripremljenim uzorcima uz korištenje što većeg udjela zelenih otapala.

Nakon odabira najuspješnije metode ekstrakcije, potrebno je provesti provjeru prikladnosti metode. Provjera se provodi na način da se najprije izmjeri sadržaj luteina u standardnoj otopini luteina odabrane koncentracije, potom se izmjeri sadržaj luteina u uzorku pripremljenog odabranom metodom ekstrakcije i na kraju se izmjeri sadržaj luteina u smjesi uzorka i standarda.

Priprema uzoraka za provjeru prikladnosti metode:

Uzorak 1: 500 μL otopine standarda + 500 μL heksan:etilacetat u omjeru 65:35,

Uzorak 2: 500 μL otopine realnog uzorka + 500 μL heksan:etilacetat u omjeru 65:35,

Uzorak 3: 500 μL otopine standarda + 500 μL otopine realnog uzorka.

3.5. Analizirani uzorci

Lutein je određivan u osam različitih uzoraka hrane s različitim dodacima (lutein, omega-3 masne kiseline, selen, vitamin A, E, D3). Popis oznaka različitih uzoraka hrane te njihov sastav prikazan je u **tablici 4**. Za ispitivanje različitih parametara ekstrakcije korištena je hrana dostupna na tržištu koja nije sadržavala dodatke.

Sve analize su provedene na pet paralelnih uzoraka. Uzorci su nakon prikupljanja i usitnjavanja čuvani u hladnjaku na 4 °C.

Tablica 4. Popis oznaka različitih uzoraka hrane i njihov kemijski sastav.

Oznaka hrane	Sastav
H_K	Usitnjeni kukuruz
PN-Do	Vitamin A, D3, E, Fe, Mn, Se, BHT, BHA, ulja i masti, pšenično brašno, vapnenac
H_M	Usitnjeni kukuruz i PN-Do pomiješani u omjeru 4:1
H_L	Hrana obogaćena luteinom
P-6 Q	Hrana obogaćena luteinom, omega-3 masnim kiselinama, selenom i vitaminom E
H_Q	Hrana obogaćena luteinom, omega-3 masnim kiselinama, selenom i vitaminom E
PPT-1-DO	Hrana pomiješana sa usitnjenim kukuruzom, ječmom i sojom
Valpomin	Hrana pomiješana sa usitnjenim kukuruzom, zobi i pšenicom

3.6. Parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Direktna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UZVS)

- Amplituda: 70 %
- Interval ultrazvuka: 3 s
- Interval pauze: 2 s
- Ukupno vrijeme trajanja: 3 min

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

- Protok: 1 mL/min
- Temperatura pećnice: sobna temperatura
- Vrijeme trajanja analize: 8 min
- Valna duljina: 450 nm
- Injektirani volumen: 20 μ L
- Mobilna faza: metanol:tetrahidrofur u omjeru 9:1

Kalibracijska krivulja konstruirana je ranije a dobiveni R^2 iznosio je 0,99989.

3.7. Prikaz dobivenih rezultata

Podatci dobiveni određivanjem sadržaja luteina u uzorcima prikazani u tablicama, statistički su obrađeni i opisani standardnom pogreškom (standardnom devijacijom, SD), relativnom standardnom pogreškom (relativna standardna devijacija, RSD) i intervalom pouzdanosti. Standardna devijacija (SD) govori nam o raspodjeli podataka dobivenih mjerenja oko srednje vrijednosti, odnosno o raspršenosti podataka unutar iste skupine. Relativna standardna devijacija (RSD) ili koeficijent varijacije je omjer standardne devijacije i aritmetičke sredine, izražava se postotkom i govori nam o preciznosti mjerenja. Interval pouzdanosti je raspon vrijednosti oko aritmetičke sredine serije mjerenja unutar kojeg se može očekivati prava vrijednost. [35, 36, 37]

U tablicama su crveno označene vrijednosti koji nisu u skladu sa zadovoljavajućom RSD vrijednosti manjom od 5 %.

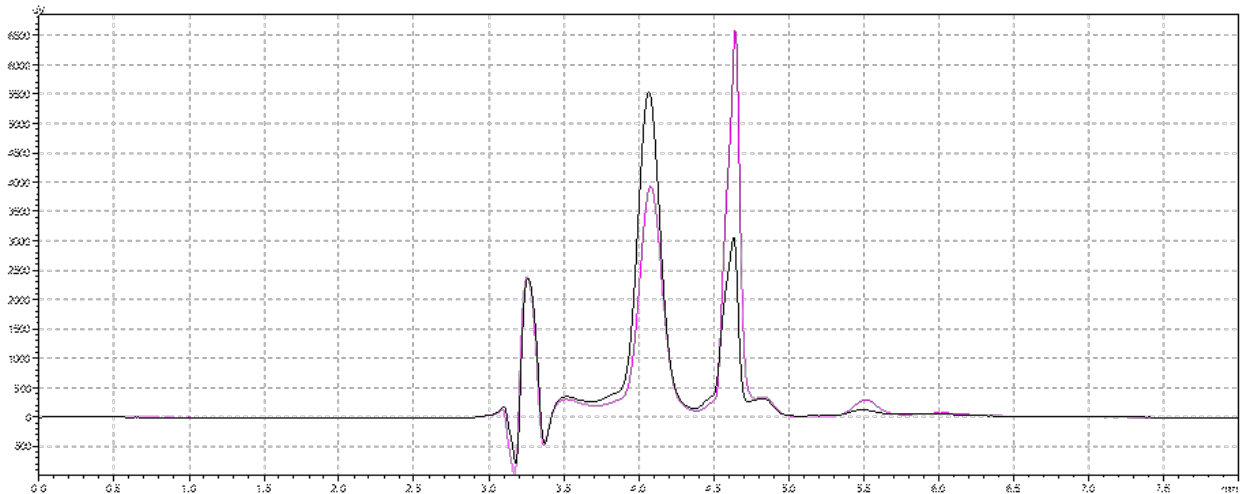
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Usporedba rezultata dobivenih primjenom standardne metode i metode 1 na neusitnjene i usitnjene uzorke

Koncentracija luteina određena je u neusitnjenim i usitnjenim uzorcima primjenom standardne metode i metode 1. Rezultati dobiveni standardnom metodom prikazani su u **tablici 5** i na **slici 18**. Sadržaj luteina određen standardnom metodom u usitnjenim uzorcima je 25,7 % veći u odnosu na uzorke koji nisu usitnjeni. Vrijednost RSD dobivena standardnom metodom manja je kod uzoraka koji su usitnjeni što ukazuje na homogeniji uzorak. Rezultati dobiveni metodom 1 prikazani su u **tablici 6** i **slici 19**. Sadržaj luteina veći je u usitnjenim uzorcima i iznosi 4,546 mg/kg hrane, dok u neusitnjenim uzorcima iznosi 2,987mg/kg hrane. Vrijednost RSD je veća kod uzoraka koji su usitnjeni ali unatoč tome određeni sadržaj luteina 52 % bolji primjenom metode 1 na uzorcima koji su usitnjeni.

Tablica 5. Usporedba rezultata dobivenih standardnom metodom primijenjenoj na neusitnjene i usitnjene uzorke.

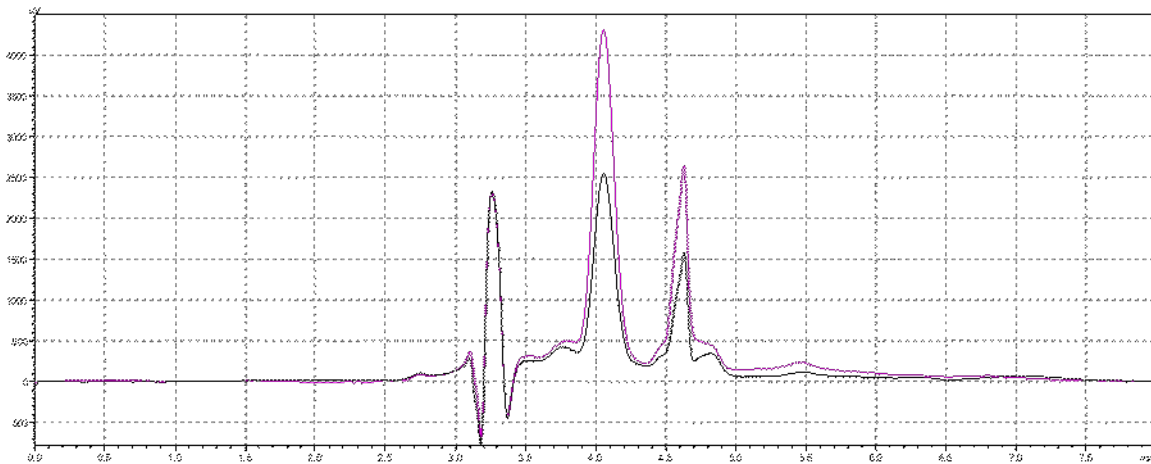
Uzorak	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)	Interval pouzdanosti (±)
1	0,27520	11,008	10,145	0,952	9,379	0,932
2	0,26521	10,608				
3	0,25362	10,145				
4	0,19724	7,890				
5	0,22049	8,820				
1 usitnjena hrana	0,33038	13,215	12,753	0,716	5,613	0,627
2 usitnjena hrana	0,29220	11,688				
3 usitnjena hrana	0,32195	12,878				
4 usitnjena hrana	0,33815	13,526				
5 usitnjena hrana	0,31140	12,456				



Slika 18. Usporedba sadržaja luteina u neusitnjenim (—) i usitnjenim (—) uzorcima primjenom standardne metode.

Tablica 6. Usporedba rezultata dobivenih primjenom metode 1 na neusitnjene i usitnjene uzorke.

Uzorak	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)	Interval pouzdanosti (±)
1	0,14905	2,981	2,987	0,0722	2,417	0,071
2	0,17664	3,533				
3	0,14991	2,998				
4	0,15360	3,072				
5	0,14481	2,896				
1 usitnjena hrana	0,21834	4,367	4,546	0,324	7,123	0,284
2 usitnjena hrana	0,23383	4,677				
3 usitnjena hrana	0,22742	4,548				
4 usitnjena hrana	0,21344	4,269				
5 usitnjena hrana	0,24997	4,999				



Slika 19. Usporedba sadržaja luteina u neusitnjenim (—) i usitnjenim (—) uzorcima primjenom metode 1.

4.2. Rezultati dobiveni metodom 2 i 3 sa i bez saponifikacije

Rezultati dobiveni primjenom metode 2 i metode 2 uz saponifikaciju na usitnjene uzorke prikazani su u **tablici 7**. Najbolji prinos ekstrakcije dobiven je uz saponifikaciju s 5 % NaOH (1,441 mg/kg hrane) dok je najmanja vrijednost RSD dobivena kod nesaponificiranih uzoraka (5,066 %). Puno bolji rezultati dobiveni su primjenom ekstrakcijske smjese (gdje je propan-2-ola zamijenjen smjesom metanol:aceton u omjeru 1:1) što je opisano u metodi 3 i metodi 3 uz saponifikaciju. Rezultati dobiveni ovim dvjema metodama prikazani su u **tablici 8**. Sadržaj luteina u nesaponificiranim uzorcima je 113 % veći u odnosu na rezultate dobivene metodom 2, odnosno 205 % veći u odnosu na rezultate dobivene metodom 2 uz saponifikaciju.

Tablica 7. Usporedba rezultata dobivenih primjenom metode 2 i metode 2 uz saponifikaciju na usitnjene uzorke.

Uzorak	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)	Interval pouzdanosti (±)
1	0,28860	0,808	0,829	0,0420	5,066	0,041
2	0,26330	0,738				
3	0,28876	0,809				
4	0,28805	0,807				
5	0,31845	0,892				
1, saponif. 5 % NaOH	0,32862	1,314	1,441	0,140	9,693	0,122
2, saponif. 5 % NaOH	0,35335	1,413				
3, saponif. 5 % NaOH	0,34010	1,360				
4, saponif. 5 % NaOH	0,36432	1,457				
5, saponif. 5 % NaOH	0,4075	1,630				
1, saponif. 10 % NaOH	0,20763	0,831	0,748	0,077	10,256	0,067
2, saponif. 10 % NaOH	0,20776	0,831				
3, saponif. 10 % NaOH	0,19881	0,795				
4, saponif. 10 % NaOH	0,16851	0,674				
5, saponif. 10 % NaOH	0,17299	0,692				

Tablica 8. Usporedba rezultata dobivenih primjenom metode 3 i metode 3 uz saponifikaciju na usitnjene uzorke.

Uzorak	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)	Interval pouzdanosti (±)
1	0,96225	2,695	2,596	0,1008	3,883	0,099
2	0,88998	2,493				
3	0,94173	2,638				
4	0,87780	2,459				
5	0,92485	2,591				
1, saponif. 5 % NaOH	1,18972	4,759	4,394	0,324	7,380	0,284
2, saponif. 5 % NaOH	1,04038	4,162				
3, saponif. 5 % NaOH	1,13843	4,554				
4, saponif. 5 % NaOH	1,05802	4,232				
5, saponif. 5 % NaOH	1,00813	4,033				

Budući da su rezultati dobiveni metodom 3 i metodom 3 uz saponifikaciju za obje metode bolji u odnosu na metodu 2 i metodu 2 uz saponifikaciju, ispitan je utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj luteina. Iz rezultata prikazanih u **tablici 9.** vidljivo je da je veći sadržaj luteina dobiven kada je vrijeme ekstrakcije bilo 1 h kod saponificiranih uzoraka (5,118 mg/kg hrane), dok vrijeme ekstrakcije nije znatno utjecalo na sadržaj luteina kod nesaponificiranih uzoraka. Najniža RSD vrijednost dobivena je kod uzoraka na kojima je primjenjena saponifikacija s vremenom ekstrakcije 1 h (0,435 %).

Tablica 9. Utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj luteina u uzorcima primjenom metode 3 i metode 3 uz saponifikaciju.

Uzorak	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)	Interval pouzdanosti (±)
Vrijeme čekanja (t = 0 h)						
1	0,99547	2,788	2,846	0,1	5,101	0,127
2	0,97634	2,735				
3	1,0023	2,808				
4	1,10695	3,101				
5	0,99897	2,798				
1, saponif. 5 % NaOH	1,24782	4,991	4,860	0,1	2,555	0,122
2, saponif. 5% NaOH	1,2423	4,969				
3, saponif. 5 % NaOH	1,28501	5,14				
4, saponif. 5 % NaOH	1,20924	4,837				
5, saponif. 5 % NaOH	1,11748	4,47				
Vrijeme čekanja (t = 1 h)						
1	1,06489	2,983	2,814	0,1	4,406	0,109
2	1,02779	2,879				
3	1,00561	2,817				
4	0,95888	2,686				
5	0,96499	2,703				
1, saponif. 5 % NaOH	1,32669	5,307	5,118	0	0,435	0,022
2, saponif. 5% NaOH	1,32482	5,299				
3, saponif. 5 % NaOH	1,32226	5,289				
4, saponif. 5 % NaOH	1,33513	5,341				
5, saponif. 5 % NaOH	1,13381	4,535				

4.2. Ispitivanje različitih otapala primjenom metode 1 i metode 1 uz saponifikaciju

Budući da su bolji rezultati dobiveni primjenom metode 1 i metode 1 uz saponifikaciju u usporedbi s metodama 2 i 3, navedenom metodom ispitane su različite ekstrakcijske smjese, prikazane u **tablici 10**. Iz tablice je vidljivo da se od ispitanih ekstrakcijskih smjesa najboljom pokazala metanol:aceton u omjeru 1:1 kod uzoraka sa i bez saponifikacije. Najveći sadržaj luteina dobiven je kod uzoraka sa saponifikacijom (5,309 mg/kg hrane), kod kojih je dobivena i najniža RSD vrijednost (0,420 %).

Tablica 10. Usporedba različitih ekstrakcijskih smjesa primjenom metode 1 i metode 1 uz saponifikaciju.

Ekstrakcijska smjesa	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	RSD (%)
Metoda 1			
Aceton	0,06016	1,203	4,135
Propan2-ol	0,05147	1,029	4,716
Etanol	0,17913	3,583	3,104
Metanol	0,23145	4,629	2,063
Metanol: aceton + THF	0,2374	4,748	6,774
Metanol: aceton = 2:1	0,23089	4,618	2,319
Metanol: aceton = 1:1	0,25741	5,148	1,498
Metoda 1 uz saponifikaciju			
Aceton	0,06071	1,214	3,516
Propan2-ol	0,02716	0,543	16,7
Etanol	0,16003	3,201	4,294
Metanol	0,17499	3,500	4,888
Metanol:aceton + THF	0,23736	4,985	6,984
Metanol:aceton= 2:1	0,20347	4,069	3,283
Metanol:aceton = 1:1	1,32723	5,309	0,420

4.4. Ispitivanje utjecaja omjera suhe tvari i ekstrakcijske smjese

Budući se u prethodnim analizama najboljom pokazala ekstrakcijska smjesa metanol:aceton= 1:1 ispitani su omjeri suhe tvari i ekstrakcijske smjese, rezultati prikazani u **tablici 11**. Prema korištenoj metodi (metoda 1 uz saponifikaciju) najbolji omjer se pokazao omjer 1:20 (5,148 mg/kg hrane).

Tablica 11. Usporedba različitih omjera suhe tvari i ekstrakcijske smjese metanol: aceton = 1:1.

Ekstrakcijska smjesa	Omjer suha tvar: ekstrakcijska smjesa	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	RSD (%)
Metanol: aceton = 1:1	1:5	0,63030	3,152	4,513
Metanol: aceton = 1:1	1:10	0,39565	3,956	2,651
Metanol: aceton = 1:1	1:20	0,25741	5,148	1,498
Metanol: aceton = 1:1	1:40	0,05039	2,015	5,285

4.5. Usporedba rezultata dobivenih metodom 4 i modificiranom metodom 4

Dobiveni rezultati prikazani su u **tablicama 12. i 13.** Primjenom metode 4 sadržaj luteina je veći za 49,35 % (19,410 mg/kg hrane) u odnosu na modificiranu metodu 4 (9,579 mg/kg hrane), što ukazuje da je heksan bolje krajnje otapalo od etilacetata. Niža RSD vrijednost dobivena je primjenom modificirane metode 4 (1,606 %). Usporedba rezultata dobivenih standardnom metodom, metodom 4 i modificiranom metodom 4 prikazani su u **tablici 14.** Najbolji rezultati dobiveni su metodom 4 (19,410 mg/ kg hrane), što ukazuje da se ekstrakcijska smjesa heksan:aceton:etanol:toulen u omjeru 10:7:6:7 može zamijeniti „zelenijom smjesom“ metanol:aceton = 1:1. Iz tog razloga metoda 4 primjenjena je za analizu realnih uzoraka. Osim metodom 4, realni uzorci su analizirani i modificiranom metodom 4.

Tablica 12. Usporedba rezultata dobivenih metodom 4.

Uzorak	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)	Interval pouzdanosti (±)
1	0,45608	18,243	19,410	1,338	6,893	0,029
2	0,50812	20,325				
3	0,46403	18,561				
4	0,53273	21,309				
5	0,46533	18,613				

Tablica 13. Usporedba rezultata dobivenih modificiranom metodom 4.

Uzorak	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)	Interval pouzdanosti (±)
1	0,23935	9,574	9,579	0,004	1,606	0,003
2	0,24005	9,602				
3	0,24560	9,824				
4	0,23637	9,455				
5	0,23606	9,442				

Tablica 14. Usporedba rezultata dobivenih standardnom metodom, metodom 4 i modificiranom metodom 4.

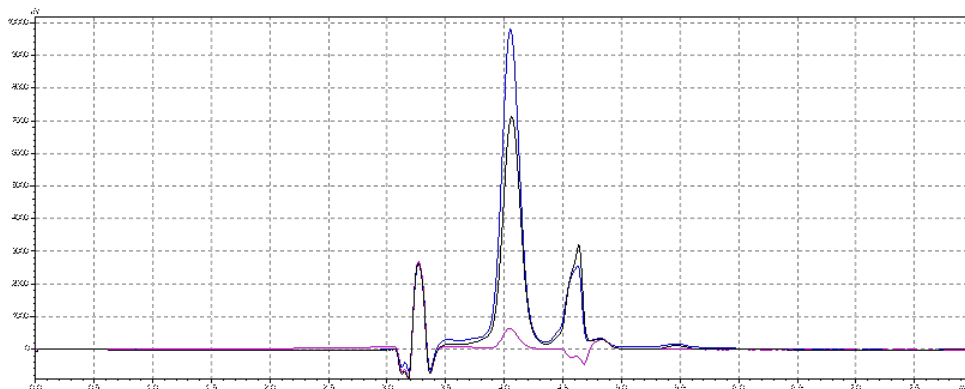
Metoda	mg/L (ppm)	mg/kg hrane
Standardna metoda	0,31882	12,753
Metoda 4	0,48526	19,410
Modificirana metoda 4	0,23949	9,579

4.6. Provjera prikladnosti metode 4 i modificirane metode 4

U **tablicama 15. i 16.** i na **slikama 20. i 21.** prikazani su rezultati dobiveni provjerom prikladnosti metode 4 i modificirane metode 4. Uspješnijom se pokazala metoda 4 sa iskorištenjem 101,503 % dok iskorištenje za modificiranu metodu 4 iznosi 86,779 %.

Tablica 15. Provjera prikladnosti metode 4.

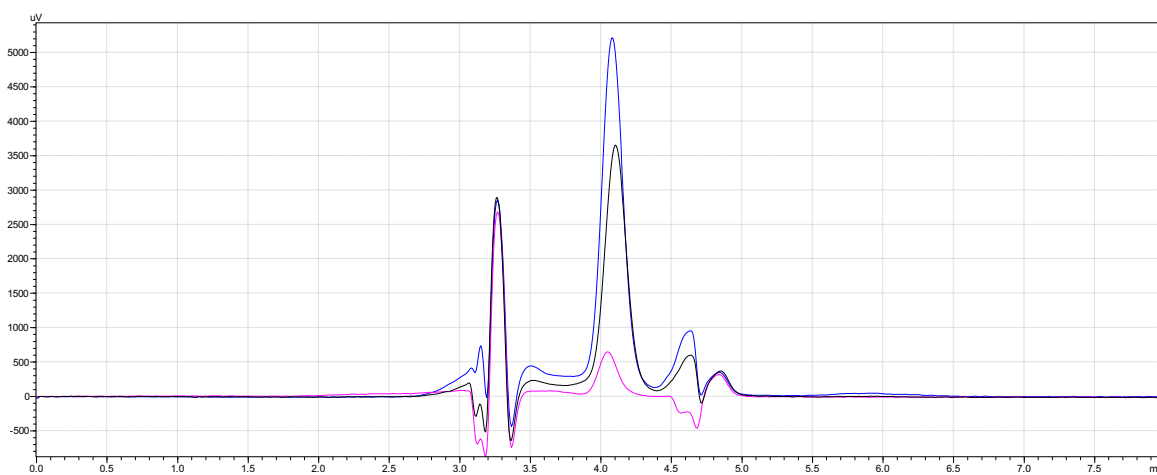
Uzorak	mg/L (ppm)
1	0,39106
Standard	0,08794
1 + standard	0,48688
Teoretski	0,47900
Dobiveno	0,48688
iskorištenje (%)	101,503



Slika 20. Kromatogrami dobiven provjerom prikladosti metode 4
(— standard, — uzorak 1, — smjesa uzorka 1 i standarda).

Tablica 16. Provjera prikladosti modificirane metode 4.

Uzorak	mg/L (ppm)
1	0,21264
Standardni dodatak	0,08794
1 + standardni dodatak	0,26084
Teoretski	0,30058
Dobiveno	0,26084
Iskorištenje (%)	86,779



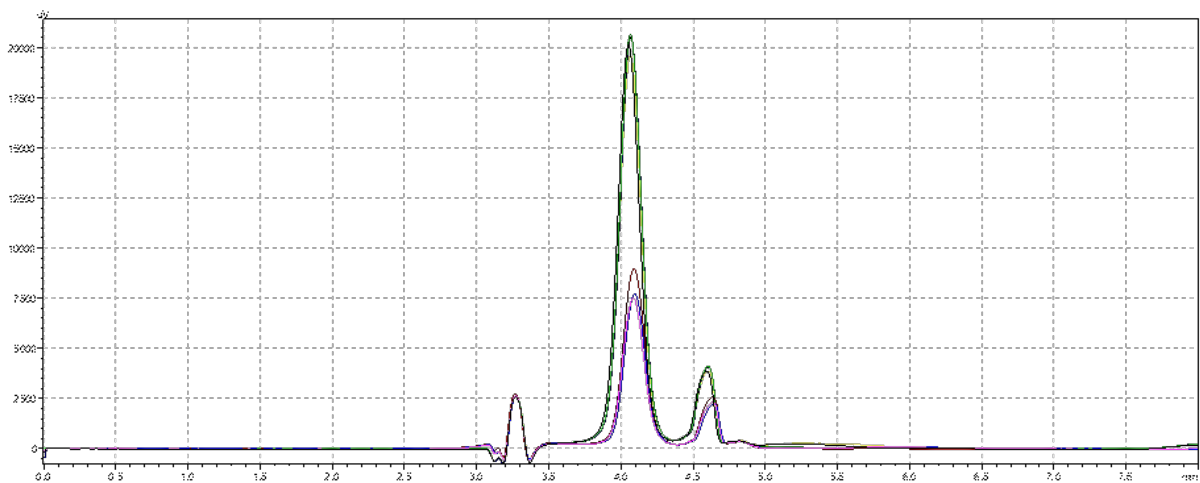
Slika 21. Kromatogrami dobiven provjerom prikladosti modificirane metode 4
(— standard, — uzorak 1, — smjesa uzorka 1 i standarda).

4.7. Analiza realnih uzoraka

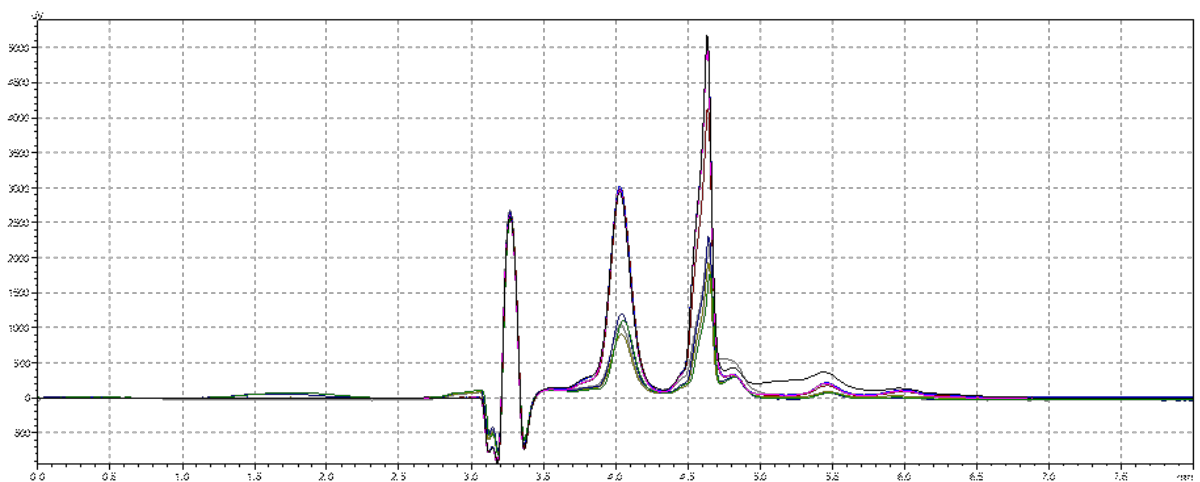
Za analizu realnih uzoraka upotrebljena je metoda 4 i modificirana metoda 4, a dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 17 (Slika 22. – Slika 29.)**. U svim uzorcima veći sadržaj luteina određen je metodom 4, veći za 37,22 % do 48,38 % u odnosu na modificiranu metodu 4. Značajno manje RSD vrijednosti dobivene su kod svih uzoraka koji su pripremljeni metodom 4 (u tablici prikazani kao rezultati dobiveni uz dodatak heksana) u odnosu na modificiranu metodu 4 (u tablici prikazani kao rezultati dobiveni uz dodatak etilacetata). Najveći sadržaj luteina određen je u uzorcima s oznakom H_Q, hrani koja sadrži dodatak luteina, omega-3 masnih kiselina, selen i vitamina E (75,314 mg/kg hrane), dok je najniži sadržaj luteina određen u uzorcima s oznakom PN-Do, hrani koja nije pomiješana sa žitaricama (8,482 mg/kg hrane).

Tablica 17. Usporedba rezultata dobivenih metodom 4 i modificiranom metodom 4 na realnim uzorcima.

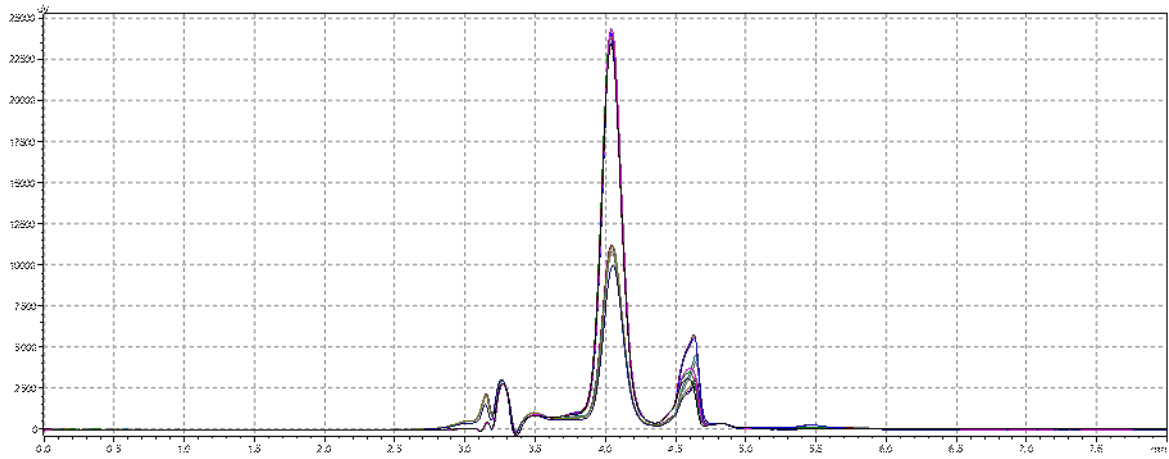
Oznaka hrane	Dodatak otapala	mg/L (ppm)	mg/kg hrane	RSD (%)
H_K	Heksan	1,005	40,181	2,901
	Etilacetat	0,3973	15,893	9,695
PN-Do	Heksan	0,2121	8,482	6,687
	Etilacetat	0,1013	4,053	12,389
H_M	Heksan	0,8957	35,828	1,895
	Etilacetat	0,3783	15,131	2,798
H_L	Heksan	1,0433	41,732	1,517
	Etilacetat	0,4909	19,635	3,345
H_Q	Heksan	1,8829	75,314	1,638
	Etilacetat	0,8579	34,315	7,521
P-6 Q	Heksan	0,2846	11,385	1,088
	Etilacetat	0,1377	5,509	6,663
PPT-1-DO	Heksan	0,879	35,161	1,755
	Etilacetat	0,3272	13,087	5,589
Valpomin	Heksan	0,7871	31,483	5,401
	Etilacetat	0,3064	12,254	4,888



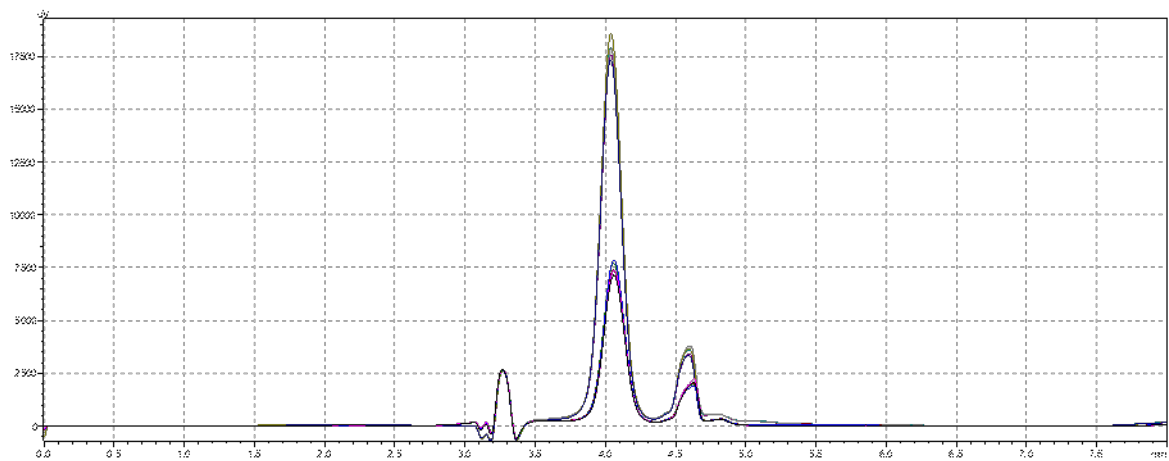
Slika 22. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima H_K primjenom metode 4 i modificirane metode 4.



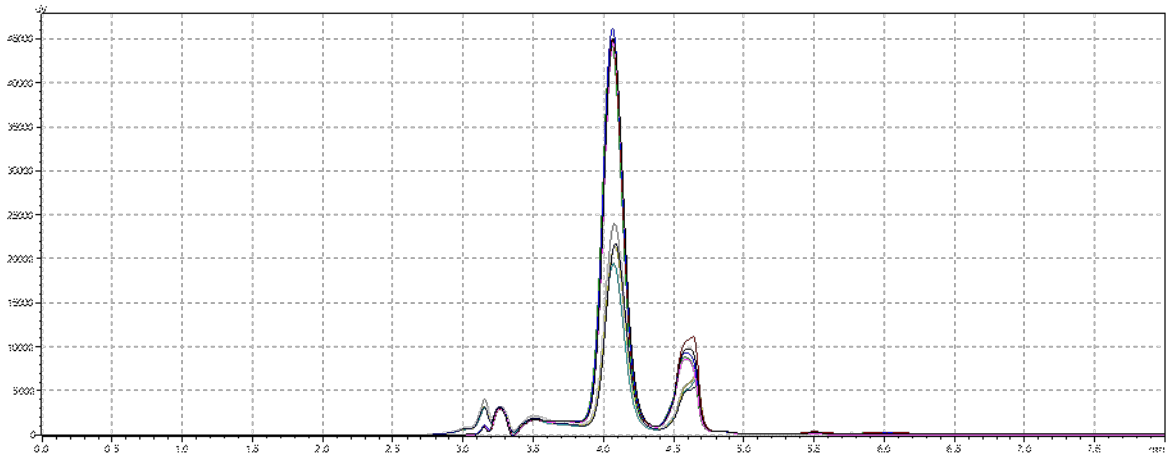
Slika 23. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima PN-Do primjenom metode 4 i modificirane metode 4.



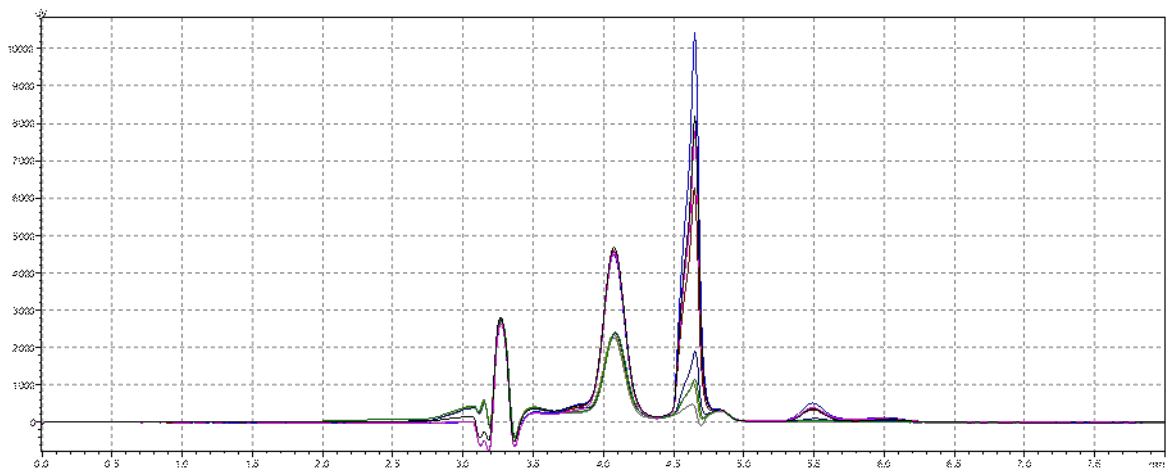
Slika 24. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima H_L primjenom metodom 4 i modificirane metode 4.



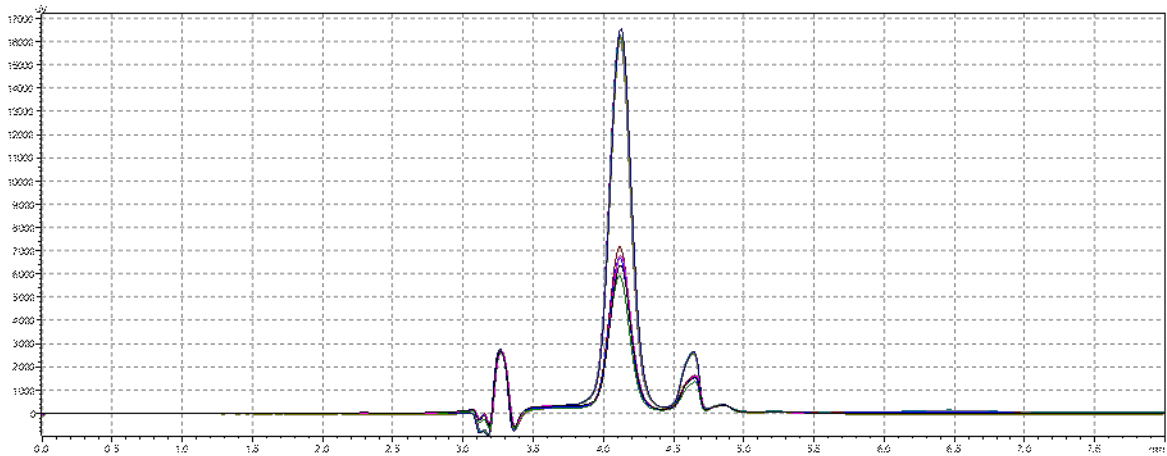
Slika 25. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima H_M primjenom metode 4 i modificirane metode 4.



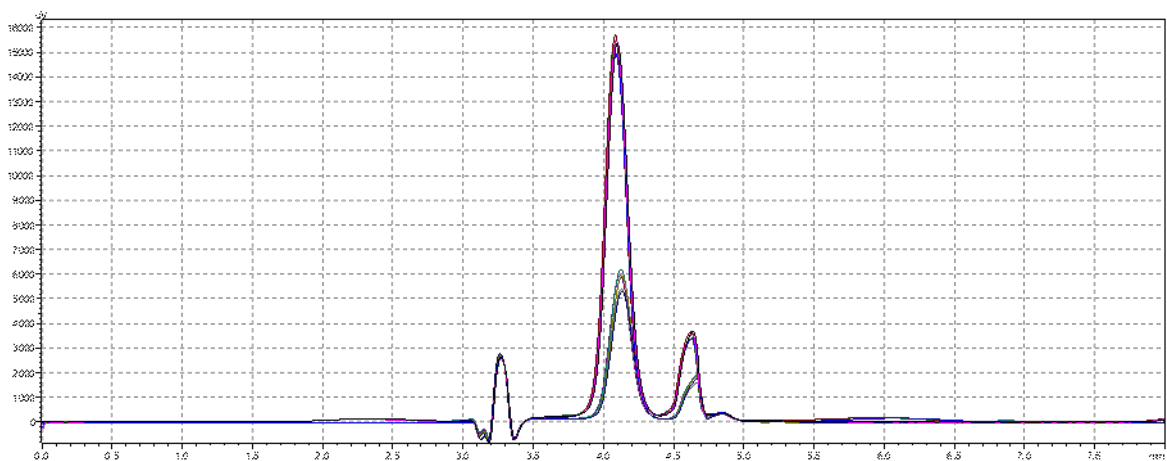
Slika 26. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima H_Q primjenom metode 4 i modificirane metode 4.



Slika 27. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima P-6_Q primjenom metode 4 i modificirane metode 4.



Slika 28. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima PP1-1-DO primjenom metode 4 i modificirane metode 4.



Slika 29. Usporedba sadržaja luteina u uzorcima valpomina primjenom metode 4 i modificirano metode 4.

5. ZAKLJUČAK

Lutein (3,3'-dihidroksi- β -karoten) je pigment svijetložute boje koji pripada skupini ksantofila. Od velike je važnosti za zdravlje čovjeka jer pomaže u prevenciji makule povezane s dobi (AMD), katarakte, kardiovaskularnih bolesti (KVB), moždanog udara, raka i neurodegenerativnih poremećaja. Osim toga karakteriziraju ga hepatoprotektivna i neuroprotektivna aktivnost te protuupalno djelovanje, stoga je od velike važnosti unos ove fitokemikalije hranom i/ili dodacima prehrane.

U ovom radu ispitano je pet metoda ekstrakcije luteina iz uzoraka hrane za koke nesilice: standardna metoda i metoda 1, metoda 2, metoda 3, metode 1, 2 i 3 uz saponifikaciju te metoda 4 i modificirana metoda 4. Veći sadržaj luteina određen je u usitnjenim uzorcima, što ukazuje da je homogeniji uzorak bolji za određivanje sadržaja luteina. Za ekstrakciju luteina pokazala se boljom direktna ultrazvučna ekstrakcija (UZVS) u trajanju od 3 minute u odnosu na indirektnu ultrazvučnu ekstrakciju. Uz primjenu UZVS od ispitanih ekstrakcijskih smjesa najboljom se pokazala metanol:aceton u omjeru 1:1 uz saponifikaciju 40 % metanolnom otopinom KOH, a najbolji omjer suhe tvari i ekstrakcijske smjese bio je 1:40 uz vrijeme ekstrakcije od 1 sata.

Najboljom metodom pokazala se metoda 4 u kojoj je ekstrakcijska smjesa iz standardne metode (heksan:aceton:etanol:toulen u omjeru 10:7:6:7) zamijenjena „zelenijom“ smjesom metanol: aceton u omjeru 1:1. U modificiranoj metodi 4 je upotrebljen etilacetat kao krajnje otapalo, dok je u metodi 4 upotrebljen heksan. Iako je etilacetat ekološki prihvatljivije otapalo, modificiranom metodom 4 određen je u prosjeku 50 % manji sadržaj luteina u odnosu na metodu 4, što ukazuje da je najbolje krajnje otapalo heksan. Obje prethodno navedene metode upotrijebile su se za određivanje sadržaja luteina u osam različitih uzoraka hrane za koke nesilice. Najveći sadržaj luteina određen je u hrani obogaćenoj luteinom, omega-3 masnim kiselinama, selenom i vitaminom E (H_Q) i u hrani obogaćenoj luteinom (H_L), 75,314 mg/kg hrane odnosno 41,732 mg/kg hrane. Dok je najniži sadržaj luteina određen u hrani koja nije pomiješana sa žitaricama (PN-Do), 8,482 mg/kg hrane. Najniža RSD vrijednost dobivena je primjenom metode 4 na uzorcima P-6 Q hrane (1,008 %).

6. LITERATURA

- [1] R.K. Saini, Y.S. Keum: Carotenoid extraction methods: A review of recent developments, *Food chemistry*, 240 (2018), 90-103.
- [2] M. Zia-UI-Hag, S. Dewanjee, M. Riaz: Carotenoids: Structure and Function in the Human Body, Springer, Kolkata, India, 2021.
- [3] S.S. Kadian, A. Sharma and D.R.Sood: Effect of light and heat on stability of crude carotenoid extract from natural sources, 4 (2013), 2415.-2418.
- [4] K. Zaheer: Hen egg carotenoids (lutein i zeaxanthin) and nutritional impacts on human health, *Cyta- journal of food*, 15 (2017), 474-487.
- [5] R. Tsao, M. Wang, Z. Deng: Lutein: Separation, Antioxidant Activity and Potential Health Benefits, 956 (2007), 353-372.
- [6] C. Grosso, P. Vălențao, F. Ferreres, P.B. Andrade: Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds, 13 (2015), 3182-3230.
- [7] P. Mäki-Arvela, I. Hachemi, D. Y. Murzin: Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89 (2014) , 1607–1626.
- [8] H.B. Sowbhagya, V.N. Chitra: Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 (2010), 146–161.
- [9] F.T. Ahmad, R.E. Asenstorfer, I.R. Soriano, D.J. Mares: Effect of temperature on lutein esterification and lutein stability in wheat grain, 58 (2013), 408-413.
- [10] M. Šivel, S. Kráčmar, M. Fišera, B. Klejdus, V. Kubáň: Lutein Content in Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.), Concentrates used for Production of Food Supplements, 32 (2014), 521-525.
- [11] N. I. N. Fuad, M. Sekar, S.H. Gan, P.T. Lum, J. Vaijanathappa, S. Ravi: Lutein: A Comprehensive Review on its Chemical, Biological Activities and Therapeutic Potentials, 12 (2020), 1769.-1778.

- [12] X. Yue, Z. Xu, W. Prinyawiwatkul, J.M. King: Improving Extraction of Lutein from Egg Yolk Using an Ultrasound- Assisted Solvent Method, *Jorunal of food science*, 71 (2006), 239.-241.
- [13] H.J. Schünemann, S. McCann, B.J.B.Grant, M. Trevisan: Freudenheim: Lung function in relation to intake of carotenoids and other antioxidant vitamins in a population-based study, 155 (2002), 463-471.
- [14] W. Miki: Biological functions and activities of animal carotenoids, *Pure and Applied Chemistry*, 63 (1991), 141-146.
- [15] S.P. Sundelin, S. E. Nilsson: Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001), 217-225.
- [16] V. N. Sumantran, R. Zhang, D.S. Lee, M.S. Wicha: Differential Regulation of Apoptosis in Normal versus Transformed Mammary Epithelium by Lutein and Retinoic Acid. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9 (2000), 257-263.
- [17] H.D. Sesso, J. E. Buring, E. P. Norkus: Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in men, 81 (2005), 990-997.
- [18] A. Manayi, M. Abdollahi, T. Raman, S.F. Nabavi, S. Habtemariam, M. Daglia: Lutein and cataract: from bench to bedside, *Crit Rev Biotechnol*, 36 (2016), 829- 839.
- [19] E. M. Abdel-Aal , H. Akhtar , K. Zaheer and R. Ali: Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health, *Nutrients* 5 (2013), 1169-1185.
- [20] G.P.R Oliveria., D. B. Rodriguez-Amaya: Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: Compositional variation in the food chain, 72 (2007) , 879–885.
- [21] F.M. Pitargue , H.K. Kang and D.Y. Kil: Lutein-enriched egg production for laying hens, *World's Poultry Science Association* 75 (2019), 1-13.

- [22] Y. Wang, D.R. Illingworth, S. L. Connor, P. Barton Duell, W. E. Connor.: Competitive inhibition of carotenoid transport and tissue concentrations by high dose supplements of lutein, zeaxanthin and beta-carotene, 49 (2010), 327-336.
- [23] S.H.G. Adabi, M.A. Kamali, J. Davoodi, R.G. Cooper: Quantification of lutein in egg following feeding hens with a lutein supplement and quantification of lutein in human plasma after consumption of lutein enriched eggs, 74 (2010), 158-163.
- [24] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=17468> (03.05.2022.)
- [25] A. Mohammed Awad , P. Kumar, M. Rashedi Ismail-Fitry , S. Jusoh , M. Faris Ab Aziz and A. Qurni Sazili: Green Extraction of Bioactive Compounds from Plant Biomass and Their Application in Meat as Natural Antioxidant, Antioxidants 10 (2021), 2-39.
- [26] M. Rutkowska, J. Namieśnik and P. Konieczka: Ultrasound-Assisted Extraction, The Application of Green Solvents in Separation Processes, (2017), 301-324.
- [27] B. K. Tiwari : Ultrasound; A clean green extraction technology, Trend sin Analytical Chemistry, 71 (2015), 100-109.
- [28] H. M Santos, C. Lodeiro and J.L. Capelo- Martne: The Power of Ultrasound, (2009), 1-16 .
- [29] <https://www.fao.org/3/bt058e/bt058e.pdf> (08.05.2022.)
- [30] M.V. Chandra-Hioe, J. Elvira, J. Arcot: Ascorbic Acid Effectively Improved Lutein Extraction Yield from Australian Sweet Lupin Flour, Plant Foods for Human Nutrition, 74 (2019), 34-39.
- [31] E. Damergia, J.P. Schwitzguebelb, D. Refardt, S. Sharmae, C. Holligerb, C. Ludwig: Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass, 25 (2017), 488-49.
- [32] Dragan, Miro: Zelena otapala u farmaceutskoj industriji, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2017.

- [33] https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html (8.6.2022.)
- [34] S. Leeson, L. Caston, H. Namkung, *Can.J. Anim. Sci* 87 (2007), 365-372.
- [35] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=57758> (8.6.2022.)
- [36] <https://bs.warbletoncouncil.org/coeficiente-de-variacion-13847> (8.6.2022.)
- [37] A. Šimundić: Interval pouzdanosti, *Biochemia Medica*, 18 (2008), 154 -161.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Doris Prokopec
Datum i mjesto rođenja	04.07.1998., Đakovo
Adresa	Ulica braće Radića 187, Novi Mikanovci
e-mail	prokopecdoris@gmail.com
Obrazovanje	
2020. - 2022.	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2017. – 2020.	Preddiplomski sveučilišni studij kemije Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Analiza mjerenih koncentracija lebdećih čestica u urbanim i ruralnim područjima u Istočnoj Slavoniji Mentor: izv.prof.dr.sc. Elvira Kovač- Andrić

2013. – 2017.	Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci, opća gimnazija
Osobne vještine	
Materinski jezik	Hrvatski jezik
Strani jezici	Engleski jezik- aktivno u govoru i pismu Njemački jezik- aktivno u govoru i pismu
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom
Sudjelovanje na kongresima	2022. sudjelovanje na 2. međunarodnoj studentskoj Green konferenciji
Ostale aktivnosti	2022. sudjelovanje na Danima otvorenih vrata Sveučilišta J.J. Strossmayera 2022. sudjelovanje na Festivalu znanosti
	2019.-2020. članica Studenskog zbora Odjela za kemiju 2019. sudjelovanje na Smotri Sveučilišta J.J. Strossmayera