

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Ana Rack

Određivanje vitamina E
Determination of vitamin E

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2018.

SAŽETAK

Vitamini su esencijalni spojevi u ljudskom organizmu te ih je potrebno unositi hranom cijeloga života. Vitamini topivi u mastima uključuju vitamin E o kojem će ovdje biti više riječi.

Vitamin E je vitamin koji ima ulogu biokatalizatora i antioksidansa u ljudskom organizmu. Vitamin E se ubraja u skupinu spojeva koji se nazivaju tokoferoli. Na tokoferole se mogu vezati različite skupine te ovisno što je vezano na molekulu tokoferola razlikuju se spojevi tokoferoli i tokotrienoli. Najpoznatiji i najrašireniji oblik skupine tokoferola je α -tokoferol.

Određivanje vitamina E odnosno α -tokoferola može se izvršiti raznim metodama. Metode koje se u današnje vrijeme koriste najčešće se ubrajaju u skupinu kromatografskih metoda, gdje se posebno ističe tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Osim kromatografskih metoda, za određivanje vitamina E važan je postupak ekstrakcije, razne kolorimetrijske metode, spektrofotometrija, radioimunološko određivanje, elektroforeza te razne detekcije uzoraka pomoću UV-detekcije ili detekcije fluorescencijom.

Sve metode koje služe za određivanje vitamina E u uzorcima, teže imati što više kvaliteta i biti što produktivnije u odnosu na dotada poznate metode.

Ključne riječi: vitamin E, α -tokoferol, kromatografske metode, HPLC

ABSTRACT

Vitamins are essential compounds in the human organism and it is necessary to get vitamins from food throughout the whole life. Vitamins soluble in oil include vitamin E, which we are going to talk about more.

Vitamin E is a vitamin that has the role of a biocatalyzator and antioxidant in the human body. It belongs to a group called tocopherols. Different groups can be bound to tocopherols and depending on what is bound to them, tocopherols have two forms: tocopherols and tocotrienols. The best known and the most widespread form of group of tocopherols is α -tocopherol.

Determination of vitamin E, i.e. α -tocopherols can be done through various methods. Methods used nowadays mostly belong to chromatography methods, particularly the high-performance liquid chromatography (HPLC). In addition to chromatography methods, the extraction process, colorimetric methods, spectrophotometric methods, electrophoresis, radioimmunoassay determination and different sample detection methods using UV-detection and fluorescence detection are important for determination of vitamin E.

All methods used to the determine vitamin E in samples aim to have better quality and be more productive compared to already known methods.

Keywords: vitamin E, α -tocopherol, chromatography, HPLC

SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
2. VITAMINI	6
2.1. KEMIJSKI SASTAV I ULOGA VITAMINA	6
2.2. NOMENKLATURA I BIOLOŠKA AKTIVNOST VITAMINA	8
3. VITAMIN E	10
3.1. STRUKTURA I BIOLOŠKA AKTIVNOST VITAMINA E	10
3.2. ODREĐIVANJE I SINTEZA TOKOFEROLA	12
3.3. DJELOVANJE I NEDOSTACI VITAMINA E.....	15
4. METODE ODREĐIVANJA VITAMINA E.....	16
4.1. KROMATOGRFSKE METODE	18
4.1.1. PLINSKO TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA.....	18
4.1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI.....	21
4.1.3. KROMATOGRAFIJA SA SUPERKRITIČNIM TEKUĆINAMA.....	29
4.1.4. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA	30
4.2. EKSTRAKCIJA.....	32
4.3. OSTALE METODE ODREĐIVANJA	34
5. ZAKLJUČAK.....	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Vitamini su kemijski spojevi vrlo korisni i potrebni ljudskom organizmu. Za normalan rad i funkciju organizma potrebne su male količine vitamina, no manjak ovih spojeva može biti popraćen određenim posljedicama [1].

Vitamini se dijele u dvije skupine, vitamine koji su topivi u mastima i vitamine koji su topivi u vodi. Vitamin E ubraja se u skupinu vitamina topivih u mastima te će ova skupina biti bolje objašnjena. Ovi spojevi imaju raznoliku ulogu u ljudskom organizmu, pomažu kod obavljanja različitih funkcija [1].

1920. godine, znanstvenici su otkrili vitamin E. Otkrili su ga u istraživanjima sa štakorima, gdje je utjecao na njihovu plodnost [1].

Vitamin E čine dvije skupine spojeva, koje se nazivaju tokoferoli i tokotrienoli. U prirodi postoje četiri spoja tokoferola i četiri spoja tokotrienola koji imaju biološku aktivnost vitamina E, a to su: α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol i δ -tokoferol te α -tokotrienol, β -tokotrienol, γ -tokotrienol i δ -tokotrienol [2].

Cilj ovog rada je, prikazati s kojim se sve metodama može odrediti vitamin E. Određivanje α -tokoferola tj. vitamina E može se provesti raznim metodama. Metode koje se najviše koriste su kromatografske metode. Ove metode zasnivaju se na odvajanju tvari pomoću mobilne i stacionarne faze. Stacionarna faza je nepokretna faza kroz koju ide mobilna odnosno pokretna faza. Ovisno o kojoj je kromatografskoj metodi riječ, mobilne i stacionarne faze se razlikuju. Najčešće korištena kromatografska metoda je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Osim HPLC-a od kromatografskih metoda koriste se još plinsko-tekućinska kromatografija, visokodjelotvorna razdjelna kromatografija, visokodjelotvorna adsorpcijska kromatografija, visokodjelotvorna kromatografija ionske izmjene, visokodjelotvorna kromatografija na gelu, kromatografija sa superkričnim tekućinama i tankoslojna kromatografija.

Svaka od ovih metoda biti će bolje pojašnjena u radu. Osim kromatografskih metoda, objasnit će se i ostale metode, pomoću kojih se može odrediti vitamin E, kao što su: ekstrakcija (pomoću ekstrakcije vitamin E se ne može direktno odrediti, već se ekstrakcijom on odijeli te se potom može odrediti) te kolorimetrijsko određivanje [1, 3].

2. VITAMINI

Vitamini su skupina organskih molekula koje ljudski organizam ne može sintetizirati te ih unosi hranom i nemaju isti kemijski sastav. Njihova prisutnost u hrani nije velika, ali je dostatna za potrebe organizma [4, 5]. Imaju različite nazive, a naziv im je najčešće povezan s načinom na koji djeluju ili s njihovim kemijskim sastavom. Vitamini imaju različita svojstva, a jedno od njih je i svojstvo bioloških katalizatora, odnosno tvari koje ubrzavaju kemijske reakcije. Hranom se unose najveće količine vitamina i to u obliku provitamina, spojeva koji su preteče vitamina, a oni se onda daljnjim procesima u organizmu prevode u same vitamine. U organizmu se također nalaze i vitameri, spojevi koji imaju vitaminsko djelovanje te mogu nadomjestiti nedostatak vitamina. Čovjekov organizam ne proizvodi vitamine, te su oni za njega esencijalni, odnosno nužno su potrebni za čovjekov normalni rast i razvoj te se svakodnevnom prehranom moraju uzimati, kako ne bi došlo do komplikacija ili bolesti radi njihovog nedostatka [1].

2.1. KEMIJSKI SASTAV I ULOGA VITAMINA

1911. godine poljski biokemičar Funk uveo je riječ vitamin. Funk je u svojim istraživanjima, riječ vitamin koristio za antiberiberi faktore. Nazivao ih je vitamini jer su bili nužni za život, a sama riječ vitamin proizlazi od latinske riječi *vita* (život). Budući da u svojoj strukturi antiberiberi faktori imaju amino skupinu, spojio je riječi *vita* i amin te je na taj način uveo riječ vitamin. Znanstvenici su vitamine podijeliti u dvije skupine s obzirom na topljivost, pa tako postoje vitamini topljivi u vodi i vitamini topljivi u mastima [1].

Vitamini koji se ubrajaju u skupinu vitamina topljivih u mastima, derivati su izoprenoidnih polimera kao što su vitamini A, E i K ili su derivati sterola, a to je vitamin D. Njihova aktivnost najbolje se uočava poticanjem propusnosti ili kod prijenosa kroz membranu stanice te njihovim redukcijsko-oksidacijskim djelovanjem (vitamini D, E i K). Vitamini mogu utjecati na aktivnost enzima, mogu povećavati njihovu aktivnost te tada imaju ulogu aktivatora (vitamini A, D i K) ili mogu smanjivati njihovu aktivnost te tada imaju ulogu inhibitora (vitamin D) [1]. Vitamini topljivi u mastima najčešće se mogu pronaći u hrani kao što su: jaja, razni mliječni proizvodi i jetra [5]. Drugu skupinu vitamina, vitamine topljive u vodi čine vitamini skupine B i askorbinska kiselina (vitamin C). Vitamini skupine B su: riboflavini, tiamin, cijanokobalamin, piridoksin, nikotinska kiselina, nikotinamid i pantotenska kiselina te folna kiselina i biotin. Za razliku od

vitamina topljivih u mastima, vitamini topljivi u vodi derivati su ugljikohidrata (vitamin C), piridina, purina i pirimidina (B₁, B₂, B₆, nikotinska kiselina, folna kiselina), kompleksi – porfirin nukleotidi (vitamin B₁₂) i aminokiseline [1]. Voće, povrće i meso hrana su koja sadržava najveću količinu vitamina topljivih u vodi [5].

Uloge vitamina topljivih u vodi su mnogobrojne, služe kod aktivacije enzima, pomažu kod djelovanja koenzima, imaju redukcijsko-oksidacijsko djelovanje, vrlo su korisni kod sinteze nukleinskih kiselina, a neki od vitamina mogu pomoći kod rada i funkcije mitohondrija [1].

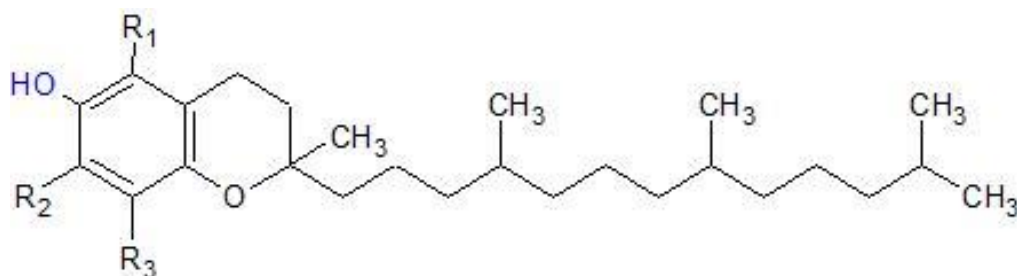
Kod određivanja strukture vitamina ili kod njihove sinteze koriste se spojevi koji su strukturno vrlo slični vitaminima, ali nemaju vitaminsko djelovanje. Antivitamini su spojevi koji imaju djelovanje suprotno djelovanju vitamina. Neki od takvih spojeva su 4-hidroksikumarin koji ima djelovanje suprotno vitaminu K, piritiain koji ima djelovanje suprotno djelovanju tiamina, izoniazid koji je antagonist niacina, metotreksat folne kiseline i dehidrobiotin koji ima djelovanje suprotno djelovanju biotina [1].

Ovisno u čemu su vitamini topljivi, u vodi ili mastima, zbog njihovog suviška ili manjka može doći do određenih zdravstvenih problema. Ako nastane prekomjerna količina vitamina koji su topljivi u mastima, dolazi do njihovog taloženja u masnom tkivu koje može rezultirati poremećajem zvanim hipervitaminoza. Dođe li do suviška vitamina topljivih u vodi, oni se izlučuju iz organizma putem urina, stoga je hipervitaminoza ove skupine vitamina vrlo rijetka. Sljedeći poremećaj do kojeg može doći je avitaminoza odnosno smanjena količina vitamina u organizmu [1].

Osim "pravih" vitamina, postoje spojevi koji nisu po definiciji vitamini, ali se nazivaju vitaminima, a to su vitamini U, T, L i P koji imaju različite uloge i funkcije u organizmu ljudi. Vitamin U pomaže kod problema sa želucem, a može ga se pronaći u kupusu i drugom zelenom povrću. Vitamin T karakterističan je po tome što pomaže kod rasta organizma, a znanstvenici su ga izolirali iz termita po kojima je i dobio naziv. Vitamini kompleksa P koriste se kod poboljšavanja cirkulacije, dobivaju se različitim postupcima iz voća i povrća, a poznatiji su pod nazivom bioflavonoidi. Vitamin L, drugim imenom faktor laktacije, u strukturi sadrži derivat adenina [1].

2.2. NOMENKLATURA I BIOLOŠKA AKTIVNOST VITAMINA

U povijesti kada znanstvenicima nisu bili poznati sastavi samih vitamina, dodjeljivali su im velika slova abecede, iza riječi vitamin (vitamin A, vitamin B, vitamin C, vitamin D, vitamin E). Vitaminima koji su kasnije otkriveni, a koji su bili slični po nekim biološkim svojstvima prethodno otkrivenim vitaminima, znanstvenici su samo dodavali brojeve u obliku indeksa (B₃). Vitamini su se vrlo brzo otkrivali i nomenklatura ih nije mogla pratiti, pa tako za isti vitamin postoji više različitih imena. Kriteriji za imenovanje trivijalnih imena vitamina su: kemijska građa, svojstva vezana za fiziološko djelovanje i biološku aktivnost te rasprostranjenost samog vitamina u prirodi. Primjer imenovanja tokola i derivata prikazan je na slici 1 [1].



SPOJ $R_1 = R_2 = R_3 = -H$ JE TOKOFEROL

SPOJ $R_1 = R_2 = R_3 = -CH_3$ VITAMIN E JE 5,7,8-TRIMETILTOKOL ILI α -TOKOFEROL

Slika 1. Prikaz imenovanja i strukture tokola [1].

Vitamini topljivi u mastima vrlo su bitni kod sinteze kolagena, raznih kostiju, pomažu pri koagulaciji krvi, bitni su za vid, diferencijaciju stanica te su ključni kod ostalih funkcija u organizmu. Za normalnu funkciju organizma nisu potrebne velike količine vitamina, ali ipak postoji određena razina vitamina koja mora biti zadovoljena, jer u protivnom dolazi do bolesti i poremećaja [1]. Posljedice nedostatka pojedinih vitamina prikazane su u tablici 1 [1].

Znanstvenici su otkrili kako biološka aktivnost vitamina pomaže kod liječenja određenih bolesti. Vitamini A i C koriste se kao antikancerogeni [1].

Tablica 1. Prikaz bolesti koje nastaju kao posljedica nedostatka vitamina [1].

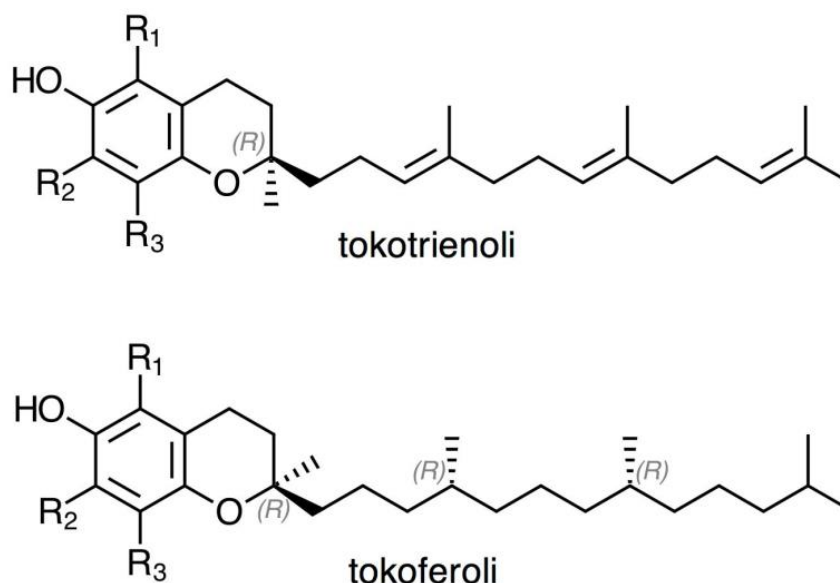
Vitamin	Bolest
A	Noćno slijepilo, kseroftalmija
D	Rahitis, osteomalacija
E	Degeneracija živaca i mišića
K	Smanjena koagulacija krvi, krvarenje u novorođenčadi
B ₁	Beri-beri, polineuritis
B ₂	Dermatitis
Niacin	Pelagra
B	Nema vidljivih tragova deficitarnosti
Folna kiselina	Megaloblastična anemija
Biotin	Dermatitis
Pantotenska kiselina	Nema vidljivih tragova deficitarnosti
B ₁₂	Perniciozna anemija
C	Skorbut

3. VITAMIN E

Antisterilitetni vitamin ili faktor "X" nazivi su pod kojima je još poznat vitamin E. Znanstvenici su 1920. godine otkrili da postoji određeni spoj odnosno komponenta u biljnom ulju koja je ključna za plodnost štakora. Kasnijih godina otkriveni su slični spojevi u žitaricama te su zaključili da ima više sličnih spojeva, koji sastavom ili biološkom aktivnošću sličje vitaminu E. Kako bi se istraživanja vitamina E provela, potrebni su spojevi koji su izotopno obilježeni. Proučavanje biološke uloge vitamina E bilo je posebno zabilježeno osamdesetih godina prošlog stoljeća, što govori da je ova skupina spojeva relativno nova i neistražena [1].

3.1. STRUKTURA I BIOLOŠKA AKTIVNOST VITAMINA E

Vitamin E se ubraja u skupinu tokoferola, spojeva koji se u prirodi nalaze u dvije skupine, koji nemaju ista svojstva, ali imaju zajedničku strukturnu skupinu, a to je kroman-6-ol koji može biti supstituiran sa zasićenim izoprenoidnim lancem C₁₆ formirajući tokole ili s nezasićenim izoprenoidnim lancem C₁₆ formirajući tokotrienole. Strukturni prikazi tokoferola i tokotrienola prikazani su na slici 2. Ove dvije skupine spojeva razlikuju se po broju dvostrukih veza. Tokotrienoli imaju tri dvostruke veze u ugljikovodičnom lancu dok tokoferoli nemoju dvostruke veze u ugljikovodičnom lancu. Osim razlike u dvostrukim vezama, skupine se razlikuju i prema broju i položaju metilnih skupina te imaju različita biološka djelovanja [6]. Slobodna hidroksilna skupina tokoferola podložna je različitim tipovima reakcija kao što su acetiliranje hidroksilne skupine, alkiliranje ili fosforiliranje. Nadalje, reakcije kojima su podložni tokoferoli su klorometiliranje, hidroksimetiliranje i nitroziranje koje se događa zbog prisutnosti slobodnog položaja u prstenu A. U prirodi se nalaze četiri spoja koja imaju biološku aktivnost vitamina E, nazivaju se α , β , γ i δ -tokoferoli, koji su prikazani u tablici 2. Svi tokoferoli po kemijskom sastavu metilni su derivati tokola odnosno 2-metil-2-(4',8',12'-trimetiltridecil)-6-kromola [1].



Slika 2. Prikaz strukture tokoferola i tokotrienola [6].

Tablica 2. Prikaz α , β , γ i δ -tokoferola [6].

Naziv	R ₁	R ₂	R ₃
α (alfa)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β (beta)	CH ₃	H	CH ₃
γ (gama)	H	CH ₃	CH ₃
δ (delta)	H	H	CH ₃

Kao i kod tokoferola, postoje četiri spoja iz skupine tokotrienola koji imaju biološku aktivnost vitamina E: α , β , γ i δ -tokotrienoli [6]. Neki od spojeva iz te skupine su 5,7,8-trimetiltokotrienol i 5,8-dimetiltokotrienol. Iako su po sastavu slični, tokoferoli i tokotrienoli imaju različitu biološku aktivnost [1].

Najveću biološku aktivnost od ovih spojeva ima α -tokoferol koji spada u skupinu tokoferola. α -tokoferol pretežito se nalazi u životinjskom tkivu, a pošto ima izrazito veliku biološku aktivnost često se umjesto naziva vitamin E koristi baš α -tokoferol. Ako se želi naglasiti točno spoj α -tokoferol onda se i koristi naziv α -tokoferol dok se naziv vitamin E upotrebljava ako se žele naglasiti i tokoferoli i tokotrienoli koji imaju aktivnost kao α -tokoferol. Tokoferoli se nalaze u raznim žitaricama (suncokret, uljana repica i sojino ulje) gdje nisu u esterificiranom obliku i nisu topljivi u uljima.¹ α -tokoferol glavni je

predstavnik i najrašireniji je spoj. Isto tako vrlo je bitan sastojak svakodnevne prehrane čovjeka i vrlo je bitno da se unosi u organizam cijeloga života. Nedostatak α -tokoferola kao i svih ostalih vitamina, nosi sa sobom određene poremećaje i bolesti. Nepravilnosti koje su zapažene, nađene su kod trudnica, dojenčadi te kod djece. α -tokoferol je jedini oblik koji je prihvatljiv ljudskom organizmu i nalazi se u ljudskoj plazmi i tkivu [2].

3.2. ODREĐIVANJE I SINTEZA TOKOFEROLA

α -tokoferol dobro se određuje pomoću HPLC-a. Za njegovo određivanje bitne su metode koje ne iziskuju puno vremena i koje nisu komplicirane. Osim ove metode mogu se koristiti i neke druge metode kao što su kolorimetrijske reakcije s ionima željeza i dipiridinom ili titracije s cerijevim (IV)-sulfatom [1].

Zašto je HPLC kao metoda vrlo poželjna kod određivanja vitamina E odnosno α -tokoferola? Njen postupak ne zahtjeva puno vremena i nije kompliciran, započinje tako da se uzorak prvo osapunjuje, zatim se oslobađaju slobodni tokoferoli koji su se nalazili u stanicama, potom se uklanjaju masti i provodi se postupak hidrolize estera tokoferola kako bi u konačnici dobili slobodni tokoferoli. Nadalje, dolazi do faze gdje se odvaja α -tokoferol. Ova metoda ima mogućnost odvajanja sva četiri tokoferola i sva četiri tokotrienola za razliku od plinske kromatografije, koja ne odvaja α -tokoferole od α -tokotrienola. Da bi se tokoferol odredio pomoću metode HPLC, moraju se zadovoljiti određeni uvjeti što je prikazano u tablici 3 [1].

Tablica 3. Prikaz uvjeta kromatografskog određivanja tokoferola pomoću HPLC [1].

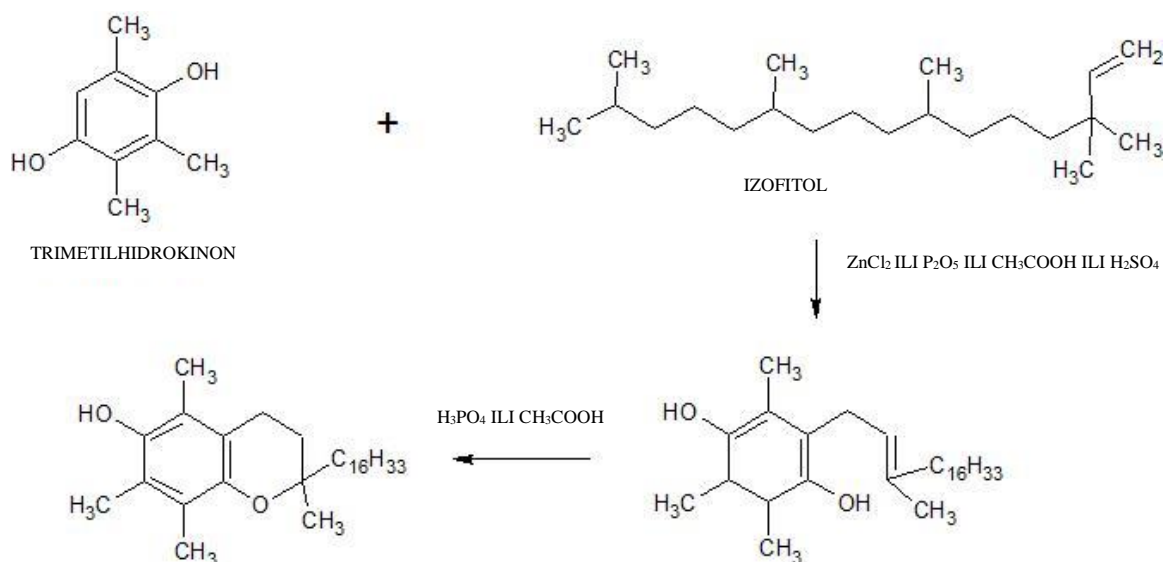
Uzorak	50 mL
Stacionarna faza	Lichrosorb Si 60,5 μm
kapacitet	50 μm
Mobilna faza	Φ (dioksan) = 3% u n-heksanu
Tlak	Oko 30 bara
Protok	1 mL/min.
Detekcija	Fluorometar 293/326 nm s određenim retencijskim vremenom za α -tokoferol za vrijeme kalibracije
Trajanje analize	30 min.
Kvantitativno određivanje	Mjerenje visine maksimuma ili integracija površine
Izračunavanje koncentracije	Visina maksimuma test-otopine prema visini maksimuma uzorka
Linearnost	50 μg α -tokoferola/mL ili 2-100 ng po injekciji
Osjetljivost metode	100 μg α -tokoferola u 100 g uzorka
Pouzdanost	97,3%

Osim metode HPLC-a, za određivanje i izoliranje tokoferola koristi se i proces destilacije u visokom vakuumu s ne dugačkim izlaganjem povišenoj temperaturi. Ovaj postupak je jako dobar jer dobiveni tokoferoli ne gube svoju biološku aktivnost nego ju zadržavaju cijelo vrijeme. Sljedeća dobra stvar je što ovaj postupak izdvaja samo tokoferole, a ne sve ostale spojeve, njima samo povećava koncentraciju u zadanom uzorku. Budući da nisu stabilni na zraku tokoferoli se pojavljuju u spojevima kao što su tokoferil acetat koji je otporan na kisik iz zraka i tokoferil sukcinat koji je na sobnoj temperaturi krutina. α -tokoferil acetat najzastupljeniji je oblik na tržištu koji se koristi kao dodatak hrani, preparatima i lijekovima koje koriste dijabetičari te u raznim dodacima za prehranu domaćih životinja [1].

Izolacija vitamina E iz uzorka biološkog podrijetla uključuje niz reakcija i postupaka. Eter, petroleter, benzen i kloroform spadaju u skupinu organskih lipofilnih otapala koji su bitni kod ekstrakcije vitamina E iz uzorka. Nakon ekstrakcije provodi se uparavanje navedenih otapala i saponifikacija, potom slijedi ekstrakcija neosapunjivog dijela organskim otapalom. Sljedeći korak je odvajanje komponenta frakcijskom destilacijom gdje se do tada nastali spoj prevodi u *p*-fenilazobenzoat, nastavlja se tekuće-

tekuće kromatografija ili HPLC i u konačnici se koncentrat tokoferola pročišćava molekularnom destilacijom ili kolonskom kromatografijom [1].

Kemijska sinteza α -tokoferola bazira se na postupku znanstvenika Fischera i Lowenberga, koji je otkriven 1929. godine. Postupak započinje reakcijom 2,3,5-trimetilhidrokinona s fitolom, kojeg se može pronaći u prirodi. Osim fitola može se upotrijebiti i izofitol čije su preteče pseudojonon ili heksahidropseudojonon. Kod potpune sinteze α -tokoferola koriste se spojevi aceton ili citral. Sinteza α -tokoferola prikazana je shematski na slici 3 [1].



Slika 3. Prikaz sinteze α -tokoferola [1].

Izvori za izolaciju tokoferola su sjemenke pamuka ili ulje pamuka koje sadrži 60% α -derivata i 40% γ -derivata. Osim ulja pamuka koriste se sojino ulje koje sadrži 20% α -derivata, 60% γ -derivata i 20% δ -derivata te ulje klica pšenice sadrži 60% α -derivata i 40% β -derivata. Osim prirodnih izvora, postoje i razni prehrambeni koncentрати koji se dodaju hrani, kako bi hrana bila bogatija vitaminima. Vitaminski koncentрати dodanoj hrani smanjuju njenu kaloričnost za razliku od biljnih ulja [1].

3.3. DJELOVANJE I NEDOSTACI VITAMINA E

U organizmu vitamin E može djelovati kao sastavni dio nekih redoks sustava. Spojevi kao što su α -tokoferilhidrokinon i α -tokoferetoksid sprječavaju i pomažu kod eksperimentalnog liječenja distrofije mišića kod pokusnih životinja [1].

Vitamin E ima određeno djelovanje na receptore vitamina A koji se nalaze u jetri. Antioksidacijsko djelovanje vitamina E, koje je vrlo bitno i poznato, čuva β -karoten za vrijeme procesa oksidativne enzimске pregradnje vitamina A [1]. Nadalje, njegovo antioksidacijsko svojstvo vrlo je bitno kod raznih procesa u našem organizmu, vitamin E hvata štetne međuprodukte koji nastaju kod nepotpunih reakcija određenih spojeva. Kod tih reakcija otpuštaju se štetni radikali koji onda uništavaju i uzrokuju starenje ljudskih stanica. Zbog ovog svojstva hvatanja štetnih radikala vitamin E dobio je naziv vitamin protiv starenja [5].

Nedovoljna količina vitamina E u organizmu najbolje se zapaža u mišićima, ali i kod metabolizma ugljikohidrata i kod procesa disanja. Još jedan od znakova nedovoljne količine vitamina E je povećano izlučivanje kreatina u urinu. Manjak bilo kojeg vitamina u organizmu može se dokazati i povećanom ugradnjom ^{32}P u biomolekulu DNA. Smanjenom aktivnošću, odnosno inhibicijom enzima fosfoglukomutaze smanjuje se sinteza glikogena koju regulira vitamin E. Kod provedenih istraživanja zapaženo je da smanjena količina vitamina E ima značajan inhibicijski utjecaj kod završnih faza spermatogeneze štakora. Negativan utjecaj deficita vitamina E u organizmu zabilježen je i kod trudnica gdje može doći do intrauterine smrti i resorpcije fetusa u prvim mjesecima nakon začeća [1].

4. METODE ODREĐIVANJA VITAMINA E

Kroz povijest, prva ozbiljnija istraživanja vitamina dogodila su se u 19. i 20. stoljeću. Spomenuta istraživanja bazirala su se na biološkim metodama određivanja biološke aktivnosti vitamina. Tijekom procesa izolacije vitamina iz biološkog materijala i usvajanjem novih procesa sinteze, tada aktualne metode pomogle su razvoju novih analitičkih metoda za kvantitativno i kvalitativno određivanje vitamina u kratkom vremenskom intervalu. Znanstvenici i dalje otkrivaju i pronalaze nove analitičke metode koje imaju manje vrijeme dobivanja rezultata, koje su točnije, preciznije i ne ovise o početnom uzorku, odnosno nije važno radi li se određivanje vitamina iz neke sirovine li iz konačnog vitaminskog proizvoda [1].

Metode koje služe za određivanje količine pojedinog vitamina u nekim uzorcima, ne mogu se koristiti i za saznanje o njegovoj biološkoj aktivnosti, jer ta dva podatka ne moraju biti ista za pojedini vitamin. Kod određivanja sastava pojedinog vitamina, osim postojećih fizikalno-kemijskih metoda, koriste se i metode koje zahtijevaju postupke s mikroorganizmima ili nekim drugim biološkim vrstama. U ranije spomenute fizikalno-kemijske metode ubrajaju se HPLC, plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS), kromatografija na tankom sloju (TLC) i određivanje kolometrijskim metodama [1].

Metode koje uključuju pokusne životinje baziraju se na dva postupka, na kurativnom i profilaktičkom postupku. Kurativni postupak provodi se tako da se životinjama uskrate vitamini koji se žele odrediti, a ostala hrana im se daje potpuna. Nakon što se primijete prvi simptomi kao što su usporen rast, životinje se podijele u skupine, te se jednoj skupini daju prije uskraćeni vitamini, ali u nepoznatoj koncentraciji, dok se drugoj skupini daju uskraćeni vitamini, ali poznate koncentracije. Profilaktički postupak razlikuje se od kurativnog postupka po tome što se životinjama tijekom cijelog pokusnog ciklusa daje hrana s vitaminima koji imaju i poznatu i nepoznatu koncentraciju [1].

Osim metoda s pokusnim životinjama postoje i metode za određivanje koncentracije vitamina uz pomoć mikroorganizama. Mikroorganizmi koji pomažu kod određivanja koncentracije vitamina su Protozoa i fitoflagelati. Ove metode mogu se potkrijepiti s nekoliko primjera, pa tako za svoj rast *Tetrahymena thermophila* treba tiamin, riboflavin, piridoksin, niacin i pantotensku kiselinu, drugi mikroorganizam *Ochromonas danica* treba

samo tiamin i biotin, dok *Lactobacillus plantarum* treba biotin, niacin i pantotensku kiselinu.

Kako se vitamine može određivati iz raznih proizvoda, postoji mogućnost različitog prikazivanja sadržaja vitamina. Unatoč tome uvedene su određene jedinice koje su odabrane prema jedinstvenim kriterijima, izmjerenoj biološkoj aktivnosti, a nazivaju se internacionalne jedinice (I.J., engl. *International Unit, I.U.*), što je prikazano u tablici 4 [1].

Tablica 4. Prikaz kriterija određivanja sadržaja vitamina [1].

Vitamin	Naziv jedinice	Maseni udio vitamina u jedinici
Vitamin A	I.J.	0,3 µg <i>all-trans</i> retinol 0,344 µg <i>all-trans</i> retinil acetata 0,549 µg <i>all-trans</i> retinil palmitata
Vitamin D	I.J.	0,025 µg vitamin D ₂ ili D ₃
Vitamin E	I.J.	1 mg <i>all-rac-α</i> -tokoferil acetata 0,91 mg <i>all-rac-α</i> -tokoferola
Vitamin K	Damova jedinica	0,083 µg vitamina K ₁ 0,04 µg 2-metil – 1,4-naftokinona 0,14 µg vitamina K ₂
Vitamin B ₁	I.J.	3 µg aneurina
Vitamin B ₂	Sherman – Bourquinova jedinica	2 µg riboflavina
Vitamin B ₆	Štakorska jedinica	7,5 µg piridoksina
Pantotenska kiselina	Pileća jedinica	14 µg pantotenske kiseline
Biotin	Štakorska jedinica	0,04 µg biotina
Vitamin C	I.J.	50 µg L–askorbinske kiseline

Prijašnje biološke metode, za razliku od danas poznatih metoda, imale su određene nedostatke kao što je mogućnost određivanja samo ukupne aktivnosti pojedinog vitamina. Današnje metode riješile su taj problem te se danas mogu odrediti i točni izomeri ili analozi vitamina odnosno provitamina. Jedna od takvih metoda je HPLC [1].

4.1. KROMATOGRAFSKE METODE

Analiza pomoću kromatografskih metoda koristi se za identifikaciju, odjeljivanje i određivanje količine kemijskih sastojaka prisutnih u određenim smjesama. Nije poznata nijedna druga metoda koja je ovako jaka i korisna kao kromatografija. Ova metoda je i najkorisnija i najprimjenjivija za određivanje vitamina E [3].

Ruski botaničar Mihail Semenovič Cvet početnom prošlog stoljeća izumio je metodu kromatografije. Uspio ju je otkriti kod pokusa gdje je odjeljivao otopine biljnih pigmenata, kao što su klorofil i ksantofil, prolaskom kroz staklenu kolonu koja je bila napunjena sitnozrnastim kalcijevim(II) karbonatom. Sastojci koji su se odvojili bili su vidljivi na koloni tako što su postali obojeni. Pomoću ovog pokusa Cvet je otkrio i dao naziv kromatografiji. Ova metoda odvaja sastojke ovisno o brzini kojom tekuća ili plinska mobilna faza nosi čestice kroz kolonu raznih stacionarnih faza.

Riječ kromatografija obuhvaća velik broj sustava i tehnika iz analitike, no svima je zajedničko posjedovanje stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza u kromatografiji je faza koja je nepokretna, a mobilna faza je pokretna. Poznate su dvije vrste kromatografskih metoda koje se baziraju na istim vrstama ravnoteže: kromatografija na stupcu i plošna kromatografija. Kod kromatografije na stupcu nepokretna faza ispunjava usku cijev kroz koju teče odnosno prolazi pokretna faza zbog djelovanja sile teže ili tlaka. U plošnoj kromatografiji nema uskih stupaca i kolona već se nepokretna faza nalazi u porama papira ili je nanesena na neku ravnu plohu, dok pokretna faza pod utjecajem gravitacije ili kapilarnih sila prolazi kroz nepokretnu fazu [3].

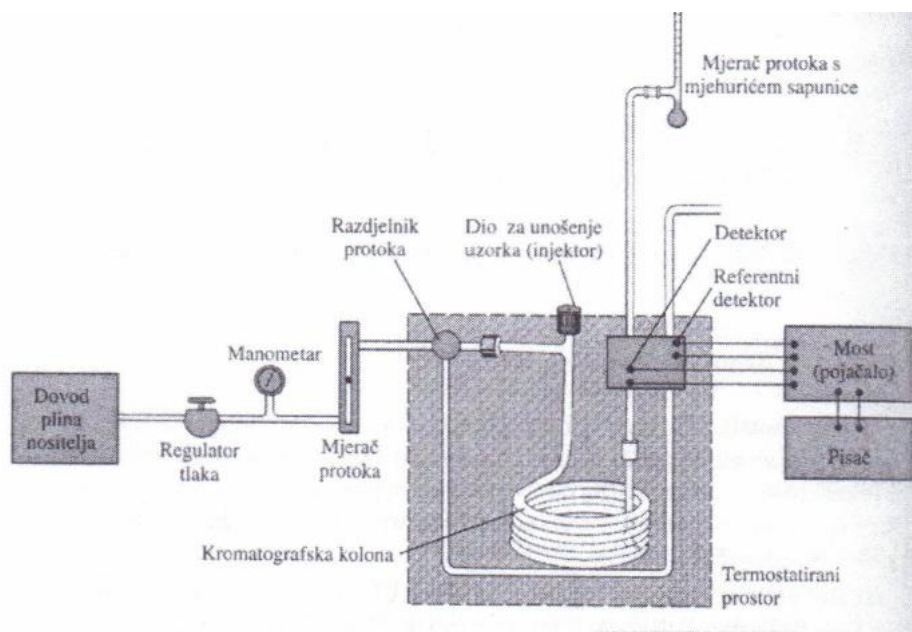
4.1.1. PLINSKO TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinsku kromatografiju karakterizira mobilna faza, odnosno inertni plin koji eluira sastojke uzorka kroz kolonu koja je ispunjena nepokretnom fazom. Koji će se inertni plin koristiti kao mobilna faza, ovisi o primijenjenom detektoru. Plinovi koji se mogu koristiti kao inertni plin odnosno pokretna faza su: dušik, helij, argon i vodik. U usporedbi s tekućinskom kromatografijom u plinskoj kromatografiji nema reakcije između analita i mobilne faze, pa zato nema ovisnosti brzine kretanja analita kroz kolonu o kemijskoj strukturi mobilne faze [3].

U plinskoj adsorpcijskoj kromatografiji nepokretna faza je kruta odnosno čvrsta tvar koja je karakteristične površine, gdje se odvija adsorpcija analiziranih tvari. Osim krute tvari, stacionarna faza može biti i tekuća. Tekuća nepokretna faza uvijek se zadržava na čvrstom nosaču bilo adsorpcijom bilo kemijskim vezanjem. U adsorpcijskoj kromatografiji do odvajanja sastojaka iz uzoraka dolazi zbog razlika u položaju postignute ravnoteže između plinovitog sastojka iz zadanog uzorka i čvrste površine stacionarne faze. Primjena plinske adsorpcijske kromatografije je ograničena na spojeve male molekularne mase kao što su ugljikov dioksid, ugljikovodici, kisik i dušik [3].

Plinsko-tekućinska kromatografija najprimjenjivija je metoda za odjeljivanje i određivanje složenih smjesa. Tekućina je u ovoj metodi stacionarna faza, faza nanescna na površinu čvrste tvari adsorpcijom ili kemijskim vezanjem kroz koji prolazi mobilna faza [3].

Uređaj kojim se izvodi plinsko-tekućinska kromatografija naziva se plinsko-tekući kromatograf koji je prikazan na slici 4 [3].



Slika 4. Prikaz uređaja za plinsko-tekućinsku kromatografiju [3].

Kod plinsko-tekućinske kromatografije mogu se koristiti razne kolone, a neke od njih su kapilarne i cjevaste otvorene kolone. Kod kapilarnih kolona stacionarnu fazu čini sloj tekućine jednake debljine kojom je ispunjena unutrašnjost stijenke cijevi. Kasnijim istraživanjima razvijena je i druga vrsta kolone tzv. cjevasta otvorena kolona, koja je imala

puno više mana i nedostataka te nije bila upotrebljavana kao kapilarna kolona. Iako su kapilarne kolone bile bolje, imale su nekoliko mana te nisu puštene u masovnu primjenu sve dok kasnije ove mane proizvođači nisu smanjili te se one ipak danas masovno upotrebljavaju [3].

Kako bi ova metoda bila efikasna te kako bi pogreške bile minimalne, prije svakog rada potrebno je izvršiti termostatiranje kolone. Ovaj postupak podrazumijeva održavanje konstantne temperature kolone koja se u većini slučajeva nalazi u određenom prostoru. Taj prostor gdje se održava konstantna temperatura naziva se termostatirani prostor. Koja je temperatura dobra i koja će se temperatura održavati ovisi o vrelištu uzorka i stupnju traženog odjeljivanja. Ako su temperature niže od optimalne temperature za eluciju, elucija će trajati duže, a ako je temperatura blizu tražene temperature ili nešto viša vrijeme potrebno za eluciju biti će kratko pa tako i sam postupak [3].

U narednim odjeljcima, gore napisani tekst potkrijepit će se primjerima. Neki od primjera upotrebe ove metode su određivanje vitamina E iz ljudske plazme [7], žitarica i keksa [8], seruma [9] te iz pilećeg mesa [10]. Uz navedene metode, bilo plinska ili tekućinska kromatografija, koristile su se i dodatne metode određivanja kako bi efikasnost bila bolja.

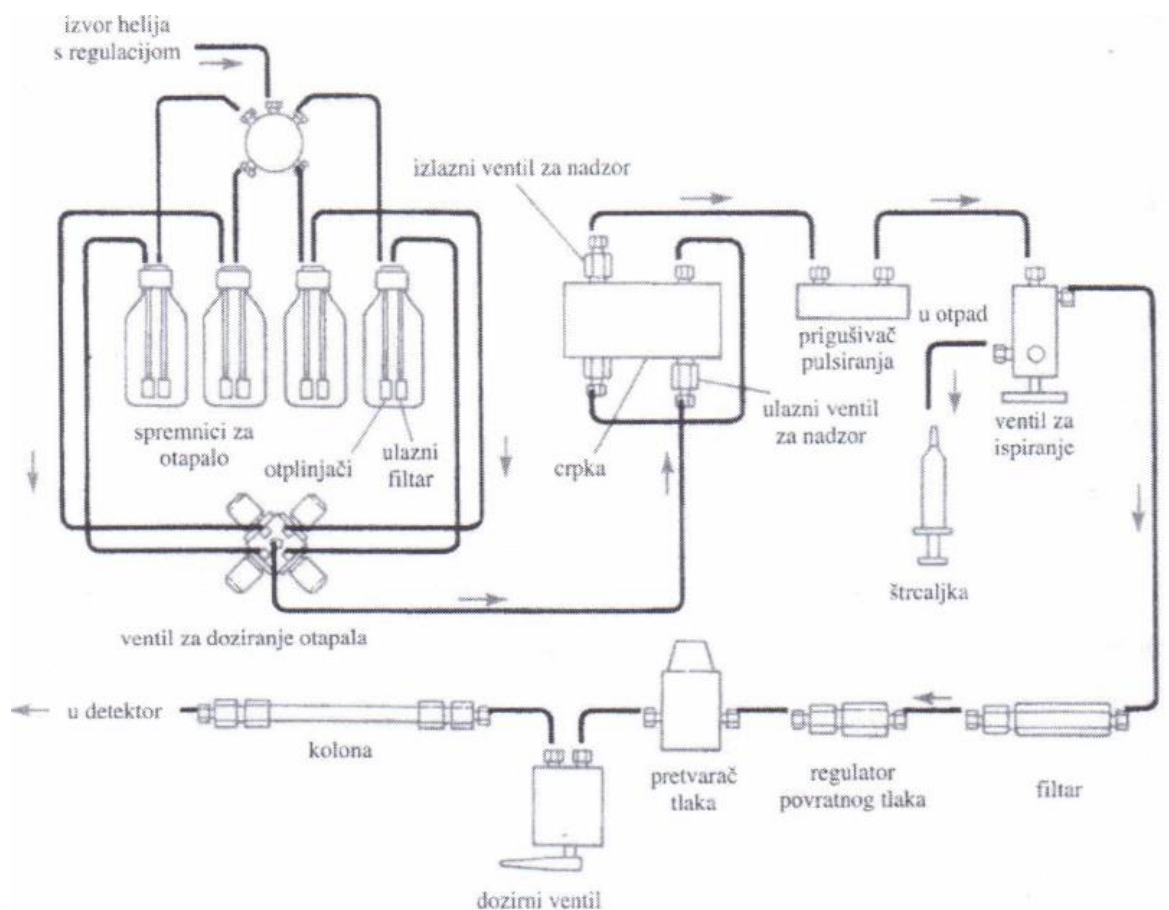
U ovom primjeru znanstvenici su koristili metodu tekućinske kromatografije kako bi odredili prisutnu količinu vitamina E u uzorku. Postupak je započeo ekstrakcijom s kloroformom i metanolom, pomoću kojih su odvojili vitamine iz uzoraka. Dobiveni vitamini viđeni su na koloni koja se koristila, a detektirani su pomoću UV detektora. Rezultati su pokazali da uzorak jetre sadrži najveće količine vitamina A, potom vitamina E te najmanju količinu vitamina D. U jetri i mišićima zabilježen je isključivo vitamin E [11].

Sljedeći primjer je određivanje tokoferola i tokotrienola iz biljnih ulja pomoću plinske kromatografije uz pomoć masene spektroskopije. Ova metoda nije uključivala prijašnje postupke koji su bili korišteni kao što su saponifikacija i derivatizacija. Tokoferoli i tokotrienoli određeni su pomoću postupka ekstrakcije s metanolom, potom postupkom centrifugiranja nakon čega je dobiveni produkt nanesen na GC-MS sustav za analizu. Nakon vrlo kratkog vremena vrlo dobro su se uvidjeli određivani tokoferoli i tokotrienoli. Ova metoda nije komplicirana, daje točne rezultate i vrlo je pogodna za određivanje gore navedenih spojeva iz biljnih ulja [12].

Kod plinske i tekućinske kromatografije postoje razni detektori, te su istraživanja koja su provedena, pokazala da metoda GC koja koristi ECD detektore koji detektiraju elektrone, ima puno selektivnije i bolje rezultate od istraživanja koja su koristila GC s UV detekcijom [13].

4.1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Kroz povijest kako su znanstvenici sve više istraživali i koristili kromatografske metode, uvidjeli su da što je manja dimenzija zrnaca punila u koloni, to je konačni rezultat bio točniji i bilo je potrebno kraće vrijeme izvedbe. HPLC nije ništa drugačija metoda od ostalih kromatografskih metoda, već samo želi naglasiti novije postupke koji su se razvili od onih ranije poznatih koji se još uvijek koriste npr. u preparativne svrhe. Novija punila koja se koriste kod HPLC-a su punila koja imaju zrnca promjera 10 μm ili manje. Osim suvremenih punila, za efikasne brzine koje se moraju postići kod ove metode potreban je i određeni tlak koji iznosi nekoliko milijuna Pa. Zbog ovih posebnih uvjeta koji su potrebni kod HPLC-a, uređaj koji se koristi je puno skuplji i složeniji, kao što je prikazano na slici 5 [3].



Slika 5. Prikaz uređaja za HPLC [3].

Uređaj za HPLC sastoji se od spremnika koji sadržavaju potrebno otapalo, a mogu biti čelični ili stakleni. Osim spremnika ovaj uređaj ima i posebnu opremu za uklanjanje plinova ili krutih čestica iz tekućina kako bi se izbjegle moguće pogreške. Odstranjivači plinova imaju ulogu sprječavanja širenja zona eluiranih sastojaka i zaustavljanja mogućih mjehurića ili čestica koje mogu ometati rad detektora. Spomenuti odstranjivači plina također imaju složenu strukturu te se mogu sastojati od različitih vakuum crpki, grijača, destilacijskog uređaja, miješalice ili sustava za otplinjavanje [3].

Kolone koje se koriste kod HPLC-a najčešće su napravljene od čelika, ali pri nekim posebnim uvjetima mogu se koristiti i staklene kolone. Kao što je ranije navedeno promjeri i duljine kolona koje se ovdje koriste vrlo su male, a napravljene su i novije mikrokolone, koje su još manje i kraće te imaju bolje rezultate, vrijeme trajanja razdvajanja je manje i u samom procesu potroše se manje količine otapala. Silikagel je punilo koje se najčešće koristi kod ove metode. Njegova se zrnca sintetiziraju iz submikrometarskih dimenzija pri točno određenim uvjetima kako bi nastala većina agregata. Produkt nastao ovim procesom

presvlači se tankim organskim slojem koji se na površinu silikagela veže kemijskim ili fizikalnim procesima [3].

Detektori kod ove metode su vrlo specifični, odnosno ne postoji univerzalna skupina detektora za HPLC. Detektori ovise o tome kakav je uzorak, svaki ima drugačija svojstva i po nečemu su više ili manje prihvatljivi. Najčešće korišteni detektori su oni koji svoj rad temelje na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja, no postoje i razni fotometri i spektrofotometri za posebne slučajeve [3].

Jedan od primjera primjene HPLC-a je određivanje količine tokoferola, tokotrienola, ubikinona i ubikinola iz mišjih stanica uz UV i elektrokemijske detekcije, koje poboljšavaju određivanje i smanjuju postotak pogriješke. Pomoću ovih metoda znanstvenici su otkrili da su stanice mišjeg mozga sadržavale isključivo α -tokoferole, ubikinoli nisi bili pronađeni. Kod stanica kože pronađeni su većinom tokotrienoli i nešto manja količina γ -tokoferola. U bubrezima je pak pronađena velika količina ubikinona-9 [14].

Nadalje, koliko je metoda HPLC-a povoljna za određivanje α -tokoferola, potvrđuje određivanje tokoferola, ubikinona i ubikinola iz krvi, plazme i ostalih ljudskih uzoraka, gdje je također korištena. Ovdje su se uz HPLC koristile metode ekstrakcije i elektrokemijske detekcije. Kao rezultat ovog eksperimenta dobiveni su razni kromatografski pikovi koji su uspoređivani sa standardima te su se iz njih mogle iščitati količine prethodno navedenih istraživanih spojeva. Osim sa standardima znanstvenici su dobivene rezultate uspoređivali i s rezultatima dobivenim iz drugih uzoraka [15].

Sljedeći primjer korištenja HPLC-a kao djelotvorne metode je određivanje vitamina A (retinola) i vitamina E (tokoferola) iz plazme i crvenih krvnih stanica (eritrociti). Znanstvenici su u eritrocitima odredili samo α -tokoferole, a retinol nije pronađen jer ga eritrociti nemaju. U plazmi su pak pronašli i jednu i drugu vrstu tvari. Metoda se pokazala vrlo efikasnom i primjenjiva je za razna istraživanja [16]. Obrano, poluobrano i pasterizirano mlijeko [17], plodovi različitog stupnja zrelosti [18] i razni životinjski uzorci [19] također su primjeri određivanja α -tokoferola, odnosno svih tokoferola primjenom HPLC-a kao metode. Uz HPLC koriste se i druge metode ili postupci kako bi određivanje bilo produktivnije i brže.

4.1.2.1. VISOKODJELOTVORNA RAZDJELNA KROMATOGRAFIJA

Vrsta kromatografije, razdjelna kromatografija jedna je od najprimjenjivijih metoda ovoga područja. Ova metoda uključuje dvije vrste kromatografije: kromatografiju u sustavu tekućina-tekućina i kromatografiju u sustavu vezane faze. Ove vrste razlikuju se načinom kako je nepokretna faza vezana na odabrano punilo. Vežu između stacionarne faze i punila kod kromatografije u sustavu tekuće-tekuće čini fizikalna adsorpcija, dok vežu u sustavu vezane faze čine kovalentne veze. Danas se više primjenjuje kromatografija u sustavu vezane faze, dok se u prošlosti, odnosno u samim počecima više koristila kromatografija u sustavu tekuće-tekuće [3].

Punila koja se koriste kod kromatografije u sustavu vezane faze, pripremaju se reakcijama organoklorsilana s –OH skupinama nastalim na površini silikagela procesom hidrolize u toploj otopini razrijeđene klorovodične kiseline. Kao produkt ove reakcije dobiva se organosiloksan. Ova punila puno su stabilnija od ostalih punila koja su vezana za nepokretnu fazu fizikalnim silama. Mana ovih punila je što nemaju veliki kapacitet za uzorak [3].

Postoje dvije vrste razdjelne kromatografije ovisno o polarnosti pokretne i nepokretne faze: normalna kromatografija i reverzna kromatografija. Nepokretna faza je polarna, a pokretna faza je nepolarna kod normalne kromatografije, dok je kod reverzne nepokretna faza nepolarna, a pokretna faza je polarna. Kod normalne kromatografije komponenta koja je najmanje polarna prva će se eluirati, kako raste polarnost pokretne faze vrijeme elucije postaje sve kraće. Obrnuta situacija je kod reverzne kromatografije, gdje se sastojak koji ima najveću polarnost eluira prvi, a kako raste polarnost pokretne faze, vrijeme elucije iziskuje više vremena. Polarne stacionarne faze kao što su voda ili trietilenglikol i nepolarne mobilne kao što su heksan ili i-propil eter koriste se u normalnoj kromatografiji. U reverznoj kromatografiji ugljikovodik predstavlja nepolarnu stacionarnu fazu, a voda, acetonitril ili metanol polarna otapala mobilne faze. Ova metoda ima vrlo široku primjenu, što je prikazano u tablici 5 [3].

Tablica 5. Prikaz primjene visokodjelotvorne razdjelne kromatografije [3].

Područje	Tipične smjese
Farmacija	Antibiotici, sedativi, steroidi, analgetici
Biokemija	Aminokiseline, bjelančevine, ugljikovodici, lipidi
Živežne namirnice	Umjetna sladila, antioksidansi, aflatoksin, aditivi

Industrijski kemijski proizvodi	Kondenzirani aromati, premazi, promotori, boje
Zagađivači	Pesticidi, herbicidi, fenoli, poliklorirani bifenili
Sudska kemija	Droge, otrovi, alkoholi u krvi, narkotici
Klinička medicina	Žučne masne kiseline, metaboliti droga, urinski ekstrakti, estrogeni

Primjeri korištenja ove metode dani su u narednom tekstu. Prvi primjer gdje se primjenjivala visokodjelotvorna razdjelna kromatografija s reverznom kolonom je određivanje α -tokoferola iz bioloških uzoraka kao što su plazma, krv, različite stanice i tkiva. Ova metoda ima vrlo široku primjenjivost na raznim uzorcima što se vidi u ovom istraživanju gdje su uzorci bili ljudskog, mišjeg i štakorskog podrijetla. Još jedna prednost ove metode je što pomaže kod standardizacije određenih vrsta uzoraka, odnosno pomaže kod određivanja točne koncentracije određenog uzorka, pomoću kojeg se zatim mogu odrediti koncentracije ili neki drugi podaci koji su bitni kod nepoznatog uzorka [20].

Sljedeći primjer upotrebe visokodjelotvorne razdjelne kromatografije s reverznom kolonom je određivanje količine suncokretovog ulja u maslinovom [21] preko α -tokoferola kao parametra u ovom istraživanju. Uz navedenu metodu koristili su se i drugi postupci kako bi istraživanje bilo uspješnije. Metoda se pokazala vrlo produktivnom, jednostavnom i točnom, a kao rezultat dobiveno je da je postotak suncokretovog ulja u maslinovom ulju 5%. Ova metoda se može koristiti za određivanje vitamina E iz bilo kojih biljnih ulja [22].

4.1.2.2. VISOKODJELOTVORNA ADSORPCIJSKA KROMATOGRAFIJA

Sljedeća vrsta visokodjelotvorne kromatografije je visokodjelotvorna adsorpcijska kromatografija, koju karakterizira to da se analizirani sastojci adsorbiraju na površini polarnog punila. U samim počecima korištenja kromatografija ova metoda bazirala se isključivo na sustavu tekućina-čvrsta tvar, gdje je nepokretna faza bila polarna tvar koja je bila vrlo fino i sitno usitnjena. Takvo punilo analit je zadržavalo pomoću adsorpcijskih sila te se pomoću njih analit nalazio u porama punila [3].

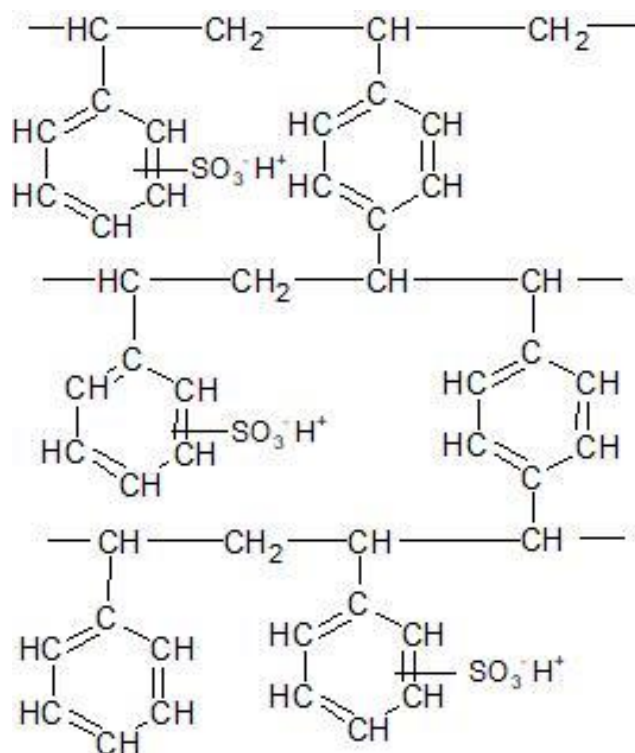
Stacionarne faze u adsorpcijskoj kromatografiji su silikagel i glinica. Silikagel kao stacionarna faza u ovoj metodi ima vrlo veliki kapacitet za uzorak te se može zbog toga koristiti u velikom broju raznih odjeljivanja. Oba spoja, i glinica i silikagel, imaju slična adsorpcijska svojstva te s povećanjem polarnosti analita raste vrijeme zadržavanja. Kakva je mobilna faza, odnosno njezin sastav, jedina je varijabla koja utječe na omjer raspodjele analita [3].

Primjena ove metode je karakteristična jer može odjeliti razne smjese izomera kao što su meta supstituirani i para supstituirani derivati benzena, što ostale kromatografske metode ne mogu. Danas se najviše primjenjuje za određivanja nepolarnih organskih spojeva koji se ne otapaju u vodi [3].

4.1.2.3. VISOKODJELOTVORNA KROMATOGRAFIJA IONSKE IZMJENE

Kromatografija ionske izmjene sljedeća je metoda koja spada u skupinu visokodjelotvornih kromatografskih metoda. Glavna karakteristika ove metode su ionski izmjenjivači koji čine stacionarnu fazu. Princip rada ove metode je odjeljivanje iona sličnog naboja elucijom iz kolone koja je napunjena sitnim zrcima ionskih izmjenjivača [3].

Ionski izmjenjivači, sintetičkog podrijetla, polimerne su tvari koje posjeduju veliku molekularnu masu te u svojoj strukturi sadrže razne funkcionalne skupine po molekuli. Složena struktura s puno funkcionalnih skupina prikazana je na slici 6. Poznate su dvije vrste ionskih izmjenjivača, a to su kationski izmjenjivači i anionski izmjenjivači. Kationski izmjenjivači najčešće su jake kiseline koje posjeduju sulfonske kisele skupine (RSO_3H^+) i one imaju širu primjenu ili mogu biti slabe kiseline s karboksilnim kiselim skupinama (RCOOH). Anionski izmjenjivači u svojoj strukturi sadržavaju bazične aminske funkcionalne skupine koje su povezane na polimernu molekulu. Izmjenjivači s jakim bazama su kvaterni amini, a izmjenjivači sa slabim bazama su sekundarni ili tercijarni amini. Zajedničko svojstvo svim izmjenjivačima je netopljivost u vodenim otopinama [3].



Slika 6. Prikaz ionskih izmjenjivača s raznim funkcionalnim skupinama [3].

Postupak odvijanja ove kromatografske metode započinje s ionima analita uzorka koji se stavljaju na početak kolone. Kolona je napunjena s odgovarajućim ionskim izmjenjivačem. Ioni uzorka istiskuju ione eluensa s mjesta gdje se nalaze nabijene skupine na sorbensu. Zatim slijedi elucija iona uzorka sa sorbensa [3].

Pozitivna strana ove metode je ta što kroz cijeli postupak postoji mogućnost praćenja vodljivosti eluensa koji izlazi iz kolone, što omogućuje detekciju i određivanje koncentracije eluiranih sastojaka [3].

Danas su poznate dvije vrste visokodjelotvorne kromatografije ionske izmjene: kromatografija na koloni uz prigušenje eluensa i ionska kromatografija na jednoj koloni. Razlika između ove dvije vrste kromatografije je način kojim se sprječavaju interakcije koje mogu dovesti do vodljivosti eluensa iz kolone pri mjerenju vodljivosti analita [3].

Primjer upotrebe visokodjelotvorne kromatografije ionske izmjene koja koristi anionske izmjenjivače je određivanje vitamina E u plazmi lipoproteina različitih gustoća. Lipoproteini su biomolekule građene od proteina i lipida. α i γ -tokoferoli glavni su

antioksidansi topivi u mastima, koji se nalaze u lipoproteinima. Lipoproteini se svrstavaju u različite skupine ovisno o gustoći: lipoproteini vrlo male gustoće (VLDL), lipoproteini male gustoće (LDL) i lipoproteini velike gustoće (HDL). Znanstvenici su ovdje određivali vitamin E koji se nalazio u lipoproteinima pomoću kromatografije ionske izmjene koja koristi anionske izmjenjivače, reverzne kromatografije i pomoću detekcije fluorscencije [23].

4.1.2.4. VISOKODJELOTVORNA KROMATOGRAFIJA NA GELU

Ekskluzijska kromatografija, drugi je naziv za kromatografiju na gelu. Ovu metodu karakterizira proces odjeljivanja koji ovisi o veličini molekula koje su dane na analiziranje. Spojevi i molekule koje imaju veliku molekulsku masu posebno su pogodni za ovu metodu [3].

Punila koja se koriste u ovoj vrsti kromatografije sastavljena su od malih zrnaca silikagela ili polimera koja posložena čine mrežu pora jednake veličine. U mrežu pora ulaze molekule eluensa i uzorka te na taj način budu zaštićene od toka mobilne faze odnosno ne sudjeluju u njoj. Ako je molekula veća od pora punila, ona neće moći ući u pore, te će bez zadržavanja u mreži nastaviti teći zajedno s mobilnom fazom. Molekule koje mogu ući u pore gela puno sporije prolaze kolonu jer upadaju u pore punila. Osim malih i velikih molekula, postoje i molekule srednje veličine, njihova brzina prolaska kroz kolonu ovisi o njihovom promjeru. Zaključak gore napisanog, veličina čestica ili molekula koje prolaze kroz kolonu diktira brzinu prolaska samih čestica kroz kolonu. Kod ove metode, odjeljivanje čestica ovisi samo o veličini i nekad o obliku čestica koje prolaze te u samom procesu odjeljivanja nema ni fizikalnih ni kemijskih reakcija koje bi utjecale na odjeljivanje. Točnije, ovdje se pokušavaju spriječiti bilo kakve reakcije koje bi se mogle dogoditi, bilo kemijske ili fizikalne, između uzorka i stacionarne faze, kako se ne bi smanjila djelotvornost kolone [3].

Danas postoje različite vrste punila za ovu metodu odjeljivanja, a razlikuju se hidrofилna i hidrofobna punila. Hidrofobna punila za svoj rad koriste nepolarne organske mobilne faze, dok hidrofилna punila upotrebljavaju mobilne faze na bazi vode. S obzirom na to koja punila se koriste, postoje i različiti nazivi za kromatografije. Kromatografska metoda koja koristi hidrofилna punila naziva se gel filtracijska kromatografija i koristi se kod određivanja polarnih spojeva. Druga vrsta kromatografskih metoda je gel permeacijska

kromatografija kojoj su za rad potrebna hidrofobna punila i koristi se kod određivanja nepolarnih spojeva [3].

4.1.3. KROMATOGRAFIJA SA SUPERKRITIČNIM TEKUĆINAMA

Hibrid plinske i tekućinske kromatografije je kromatografija sa superkritičnim tekućinama (SFC), što označava da posjeduje svojstva i jedne i druge kromatografske metode. Ova metoda nije još potpuno istražena, ali se pretpostavlja da će biti učinkovitija i da će imati prednost nad raznim drugim kromatografskim metodama. Superkritične tekućine označavaju tekućine koje nastaju kada se pojedina supstanca zagrije na veću temperaturu od svoje kritične temperature. Kada se postigne kritična temperatura određene supstance, ona se ne može tlačenjem kondenzirati u tekućinu. Svojstva samih supstanci u superkritičnom stanju dosta se razlikuju od svojstava supstanci kada se ne nalaze u tom stanju, što je vidljivo u tablici 6. Važno svojstvo superkritičnih tekućina je mogućnost otapanja velikih molekula koje nisu hlapljive [3].

Tablica 6. Prikaz svojstava tvari u raznim stanjima [3].

	Plin	Superkritična tekućina	Tekućina
Gustoća, g/cm ³	$(0,6 - 2) \cdot 10^{-3}$	0,2 – 0,5	0,6 – 1,6
Koeficijent difuzije, cm ² · s ⁻¹	$(1 - 4) \cdot 10^{-1}$	$10^{-3} - 10^{-4}$	$(0,2 - 2) \cdot 10^{-5}$
Viskoznost, g · cm ⁻¹ · s ⁻¹	$(1 - 3) \cdot 10^{-4}$	$(1 - 3) \cdot 10^{-4}$	$(0,2 - 3) \cdot 10^{-2}$

Svi podaci predstavljaju samo red veličine.

Uređaji koji se koriste kod SFC slični su uređajima za HPLC, no specifičnost ove metode je način nadzora i mjerenja tlaka u koloni. Postoje razni čimbenici koji utječu na rad samih uređaja. Jedan od njih je učinak tlaka. Kako tlak raste povećava se i gustoća superkritičnih tekućina, ali brzo i nelinearno. Posljedica toga je promjena faktora kapaciteta što rezultira smanjenjem vremena elucije.

Kolone koje se koriste kod ove metode su punjene i kapilarne kolone. Kapilarne kolone su duže od punjenih te zbog toga imaju veću djelotvornost i prednost korištenja. Općenito gledano, kolone koje se koriste kod SFC-a, puno su duže od ostalih kolona koje se koriste u drugim metodama, što SFC čini efikasnijom metodom. Punila koja se koriste u ovoj metodi najčešće su polisiloksani koji se kemijskim reakcijama vežu za stjenku kapilarne cijevi s unutrašnje strane [3].

Mobilna faza koja se najčešće koristi kod SFC je ugljikov dioksid, jer vrlo dobro otapa razne organske molekule, propušta ultraljubičasto zračenje, nema miris, nije otrovan, lako je dostupan i nema visoku cijenu. Ugljikov dioksid ima vrlo pogodnu kritičnu temperaturu, te omogućuje velik izbor temperatura i tlakova u normalnih uvjetima koji su inače potrebni za superkritičnu tekućinsku kromatografiju. Osim ugljikovog dioksida kao mobilne faze u SFC-u mogu se koristiti pentan, tetrahidrofur, etan, diklorodifluorometan i dietileter [3].

Detektori koji se mogu koristiti su vrlo osjetljivi i nisu strogo specifični već su univerzalni te su isti kao detektori kod plinsko-tekućinske kromatografije što čini jednu od glavnih prednosti ove metode. Primjer jednog detektora je plamenoionizacijski detektor koji ima ulogu u SFC-u da omogući širenje superkritičnog nositelja kroz sapnicu u vodikov plamen što bude popraćeno promjenom električne vodljivosti medija uzrokovanom ionima koji su nastali iz analiziranog uzorka [3].

Prednost ove metode je što može analizirati i odrediti spojeve koje ostale kromatografske metode ne mogu. Neki od takvih spojeva su spojevi koji nisu hlapljivi ili su toplinski nestabilni te u svojoj strukturi ne sadrže kromoforne skupine koje se koriste kod fotometrijske detekcije [3].

Kod određivanja vitamina topivih u mastima (A, D, E i K) iz ulja sjemenki i otpadnog ribljeg ulja, korištena je SFC. Uz postupak saponifikacije ova metoda bila je uspješnija i produktivnija. Metoda SFC je korisna, učinkovita te iziskuje kratko vrijeme rada zbog čega je primjenjiva u raznim industrijskim postrojenjima. Iz ribljeg ulja pomoću SFC metode izdvojeni su α , γ i δ -tokoferoli i vitamin A, odnosno retinol [24].

Sljedeći primjer upotrebe SFC-a je određivanje vitamina E iz određenih prehrambenih proizvoda. Ovom metodom u vrlo kratkom vremenskom intervalu izdvojili su se vitamini A i E (brzo izdvajanje ovih vitamina dogodilo se zbog direktne injekcije ekstrakta), što dokazuje učinkovitost i kvalitetu ove metode. Kod većine kromatografskih pa tako i ostalih metoda za bolji rezultat koriste se i druge metode ili postupci za određivanje pojedinih komponenata [25].

4.1.4. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA

Tankoslojna kromatografija zajedno s papirnom kromatografijom i elektrokromatografijom čini metode plošne kromatografije. Zajedničke karakteristike ovih

metoda su da koriste ravan, relativno tanak sloj tvari koji se nanosi na razne površine koje mogu biti staklene, metalne ili plastične. Najupotrebljivija metoda plošne kromatografije je tankoslojna kromatografija. Njene prednosti su brzina, dobra razlučivost i osjetljivost te niska cijena. Tankoslojnu i tekućinsku kromatografiju međusobno povezuju mobilne i stacionarne faze, koje su kod ove dvije metode vrlo slične. Rezultati koji se dobiju metodom tankoslojne kromatografije mogu uvelike pomoći kod izvedbe učinkovite tekućinske kromatografije [3].

Ova metoda postala je nezamjenjiva, kod provjeravanja čistoće proizvoda u industriji lijekova, a osim toga često se upotrebljava u kliničkim i industrijskim laboratorijima te kod kemijskih i biokemijskih istraživanja [3].

Stacionarna faza kod tankoslojne kromatografije je tanki sloj fino usitnjenih zrnaca koji prijanja na staklenu ploču. Ova zrnca su vrlo slična stacionarnim fazama ostalih kromatografskih metoda. Osim stacionarne faze koja slični stacionarnim fazama ostalih metoda i mobilne faze također imaju zajedničke karakteristike [3].

Priprava ploča kod tankoslojne kromatografije vrlo je bitan dio same metode. Ploče koje se koriste u ovoj metodi, pripravlja se tako da se rasprši vodeni mulj, kojeg čine fino usitnjene čvrste tvari, na čistu površinu ploče, koja može biti napravljena od stakla ili plastike ili može biti mikroskopska ploča. U raspršeni vodeni mulj mogu se dodati veziva koja poboljšavaju međusobno povezivanje zrna ili njihovo povezivanje s površinom na koju se nanosi, što pridonosi efikasnosti metode. Nakon raspršivanja, ploče se ostavljaju kako bi se osušile. Sušenje se odvija u sušionicima i može biti dugotrajno [3].

Svrha kromatografskih metoda je odvajanje sastojaka smjese između stacionarne i mobilne faze. Kod tankoslojne kromatografije postoji postupak razvijanja kromatograma, koji označava prolazak uzorka koji se nalazi u mobilnoj fazi, kroz stacionarnu fazu. Razvijanje kromatograma ekvivalentno je procesu elucije kod tekućinske kromatografije. Proces započinje tako da se uzorak nanosi u obliku otopine u točku, koja se nalazi blizu jednog kraja ploče. To mjesto se označi olovkom. Zatim slijedi otparavanje otapala koje se nalazilo na površini ploče. Nadalje, ploča se stavlja u komoru koja bude zatvorena i zasićena parama razvijaača. Dio ploče uroni se u razvijaač, no mora se obratiti pozornost da uzorak ne dođe u neposrednu interakciju s razvijaačem. Kada razvijaač u kojem je uronjena ploča, prođe polovinu ili više od polovine ploče, ploča se izvadi iz komore i ostavi da se osuši. Dobiveni rezultati se očitavaju na više načina [3].

Većina tvari koje se uzmu kako bi se odredile ovom metodom, nisu obojene. Budući da tvari nisu obojene, nakon završetka kromatografskog postupka važno je na neki način detektirati odnosno neobojene tvari učiniti vidljivima. Kod detekcije tvari postoje dva načina, jedan je da se kromatogram prska otopinom joda ili sa sumpornom kiselinom. Na ovaj način najviše se određuju organski spojevi jer oni mogu reagirati s otopinom joda ili sa sumpornom kiselinom, pri čemu daju tamno obojene spojeve. Drugi način detekcije je da se kod početne priprave sloja doda fluorescentni indikator. Očitavanje ovih rezultata vrši se pod UV-svjetlom, gdje sve bude fluorescentno osim dijelova gdje se nalaze odijeljene komponente koje ne fluoresciraju [3].

Primjer određivanja raznih vitamina, pa tako i vitamina E, iz raznih uzoraka, metodom tankoslojne kromatografije uključuje odvajanje smjese vitamina pomoću silikagela na površini od aluminijske. Rezultati postaju vidljivi pomoću ultraljubičastog svjetla i na taj način se detektiraju [26].

4.2. EKSTRAKCIJA

Osim kromatografskih metoda koje su najpogodnije za određivanje vitamina E, koristi se i postupak ekstrakcije. Postupkom ekstrakcije vitamin E se ne može direktno odrediti već se izdvaja iz smjese odnosno iz uzoraka, a zatim se ostalim metodama može odrediti. Zajedničko svih metodama je to da se one međusobno kombiniraju kako bi se u konačnici dobio što bolji rezultat. Ekstrakcija je postupak gdje se tvari različitog podrijetla odvajaju pomoću dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Ima veliki broj različitih vrsta procesa za odvajanja tvari [3].

Kod ekstrakcije poznate su dvije veličine koje se koriste za opisivanje raspodjele otopljenih tvari koja se nalazi u otapalima koji se međusobno ne miješaju, a to su: koeficijent raspodjele ili distribucije i omjer raspodjele ili distribucije. Koeficijent raspodjele je konstanta ravnoteže koja govori kako su raspoređene otopljene tvari u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Omjer raspodjele je pak omjer analitičkih koncentracija u dva otapala koja se također međusobno ne miješaju. Ako je promatrani sustav jednostavan omjer raspodjele ekvivalentan je koeficijentu raspodjele, no kod složenih sustava ove dvije veličine uvelike se mogu razlikovati [3].

Kod ekstrakcije je važno napomenuti, da je puno efikasnija ako se odvija s više manjih obroka otapala koje se koristi za ekstrakciju određenog uzorka, nego da se ekstrakcija odvija u jednom obroku otapala koji bude u velikoj količini [3].

Ekstrakcijski postupak može se podijeliti u tri skupine s obzirom na razdvajanje između dva otapala koja se ne miješaju: jednostavna ekstrakcija, iscrpna ekstrakcija i protustrujna frakcionacija [3].

Jednostavnu ekstrakciju karakterizira da je omjer jedne komponente u ispitivanom uzorku povoljan, a omjer druge komponente nepovoljan. Kod ovih sustava odjeljivanje vrlo kratko traje, nije komplicirano i kvantitativno je. Otopina koja sadrži analit u ovom slučaju ne iziskuje velike količine potrebnog otapala, za dobre rezultate potrebno je samo šest obroka svježeg otapala. Aparatura koja se koristi u ovom slučaju također je jednostavna i uključuje običan lijevak za odjeljivanje [3].

Iscrpnu ekstrakciju obilježava omjer komponenata koji je kod obje komponente vrlo nepogodan te se približavaju nuli. Aparatura je nešto složenija i uključuje organsko otapalo koje prolazi niz procesa, destilira se, kondenzira i usmjeruje na prolazak kroz vodeni sloj. Ovaj postupak ekstrakcije ponavlja se nekoliko stotina puta sa svježim odgovarajućim otapalom [3].

Protustrujna frakcionacija specifična je po tome što se kod nje koriste automatski uređaji, jer se ovdje izvodi nekoliko stotina uzastopnih ekstrakcija. Primjenom ovih uređaja frakcionacija se izvodi u protustrujnoj shemi u kojoj se raspodjela između svježih obroka obiju faza događa u nizu zasebnih stupnjeva. Prednost ove metode je što može odvajati komponente koje imaju vrlo slične vrijednosti omjera raspodjele, može odjeliti komponente iako se koeficijenti zadanih komponenta ne razlikuju za više od 0,1 [3].

Ekstrakcijski postupci preferirani su u odnosu na ostale metode odjeljivanja jer je za njihov rad potrebno puno manje vrijeme, zaobilaze probleme kao što su taloženje ili naknadno taloženje te su idealni za izolaciju tvari koji se nalaze u tragovima u određenim uzorcima [3].

U narednom tekstu, bit će dani primjeri određivanja vitamina E postupkom ekstrakcije i ostalih metoda koje su pomogle za konačno određivanje. Pomoću postupka ekstrakcije iz raznih biljaka i urina izolirali su se α -tokoferoli, odnosno vitamin E. Kod određivanja vitamina E iz ljudskog urina znanstvenici su pronašli efikasnu metodu koja je

podrazumijevala direktnu ekstrakciju pomoću dietil etera. Ova metoda zahtjeva vrlo malu količinu ispitivanog uzorka. Postupak je zahtijevao niz različitih koraka kao što su hidroliza konjugiranih oblika, zakiseljavanje otopine i u konačnici ekstrakcija s dietil eterom [13, 27].

Sljedeći primjer je određivanje vitamina E iz mlijeka pomoću ekstrakcije s heksanom. Zanimljivost ove metode je što se mogla izvršiti sa ili bez prethodnog koraka saponifikacije. Analiza dobivenih ekstrakta odvijala se pomoću metode HPLC-a i UV detekcije. Konačni rezultati uspoređivali su se s rezultatima gdje je bila korištena prethodna saponifikacija i onim rezultatima gdje ona prethodno nije bila izvršena. Zaključak istraživanja bio je da je metoda koja je koristila postupak saponifikacija bila uspješnija [28].

Novija metoda za određivanje α -tokoferola bila je tekuće-tekuće mikroekstrakcija (DLLME). Ovom metodom znanstvenici su određivali α -tokoferole iz raznih žitarica. Metoda je pokazala odlične rezultate u usporedbi s rezultatima starih metoda, bila je produktivnija, preciznija i osjetljivija [29].

4.3. OSTALE METODE ODREĐIVANJA

Osim prije spomenutih kromatografskih metoda koje su najrasprostranjenije i postupka ekstrakcije, postoje i ostale metode pomoću kojih se mogu odrediti vitamin E i α -tokoferoli. Jedna od tih metoda je spektrofotometrija. Ova metoda korištena je u primjeru određivanja antioksidansa, u koje se ubraja i vitamin E, iz žitarica i raznih sjemenki kao što su kukuruz i soja. Određivane su količine prisutnih antioksidansa postupkom koji se bazirao na redukciji atoma Mo(VI) u Mo(V) gdje se kao produkt dobio spoj zelenkaste boje pri niskom pH okruženju. Ako se isključivo određuje vitamin E iz nekog sjemena, onda su za izvedbu ove metode potrebni fosfomolibden i heksan koji potom idu u postupak ekstrakcije. Rezultati koji su dobiveni pokazali su da je spektrofotometrija vrlo pogodna i kvalitetna metoda za određivanje vitamina E iz žitarica. Spektrofotometrija se kao i većina metoda, može koristiti kao samostalna metoda ili može biti metoda koja pomaže nekoj drugoj metodi, u što boljem određivanju tvari [30].

Kolorimetrija je sljedeća metoda koja može pomoći kod određivanja vitamina E. Korištenje ove metode prikazano je u istraživanju znanstvenika koji su iz uzoraka

palminog ulja, oleina i stearina određivali količine vitamina E [31]. Kod određivanja vitamina E odnosno α -tokoferola koristili su frakcioniranje pomoću anionskog tenzida te potom Emmerie-Engelovu metodu u kojoj tokoferoli i tokotrienoli reduciraju željezo koje potom formira obojeni kompleks s dipiridilom, čija se apsorbancija mjeri na 520 nm [31].

Sljedeća metoda je masena spektroskopija sekundarnih iona s analizatorom vremena leta (TOF-SIMS) koja je efikasna za određivanje raznih biomolekula. Ova metoda provodi se tako da se na površinu ispitivanog uzorka nanese određene količine iona. Nakon nanošenja dolazi do sudaranja iona s atomima uzorka, stvara se energija i s površine uzorka izbacuju se sekundarni ioni. Elementi koji se mogu odrediti ovom metodom su razni, uključujući i izotope. Ova metoda smatra se jednom od najosjetljivijih metoda za detekciju određenog elementa iz danog uzorka. Primjer korištenja ove metode je određivanje α -tokoferola iz ljudskih stanica te istraživanje njihove reakcije na oksidativni stres. Upotrijebljena metoda omogućavala je znanstvenicima promatranje raspodjele antioksidansa α -tokoferola i drugih molekula u staničnim strukturama pomoću snimanja TOF-SIMS. Na ovaj način određeni su antioksidativni α -tokoferoli iz raznih dijelova ljudskih stanica, a rezultat istraživanja pokazao je povećanu prisutnost α -tokoferola kao odgovor na patogene [32].

Sljedeća metoda je DLLME koja je pogodna za određivanje α -tokoferola iz žitarica. Postupak metode temelji se na disperziji čestica u vodenoj fazi, gdje nastaju kapljice koje dolaze u kontakt s uzorkom, nakon čega slijedi ekstrakcija i određena tvar (npr. vitamin E) se na taj način može odrediti [29]. Nakon što se analiti izoliraju, pomoću UV ili fluorescentne detekcije mogu se odrediti te se mogu izvesti odgovarajući zaključci [1].

5. ZAKLJUČAK

Vitamini su vrlo bitni spojevi ljudskom organizmu. Postoje vitamini koji su topivi u mastima i vitamini topivi u vodi. Ovaj rad baziran je na vitaminima topivim u mastima jer u tu skupinu spada vitamin E.

Vitamin E spada u skupinu tokoferola, a α -tokoferol najpoznatiji je i najzastupljeniji predstavnik ove skupine spojeva. Vitamin E se iz raznih uzoraka može na relativno jednostavne i brze načine izolirati i odrediti.

Od svih metoda koje se koriste za određivanje vitamina E, kromatografske metode su ipak najprimjenjivnije. Od svih kromatografskih metoda najistaknutija je HPLC. Ova metoda pokazuje vrlo dobre, brze i pouzdane rezultate. Osim HPLC-a, za određivanje vitamina E, mogu poslužiti i druge kromatografske metode, koje ovisno o uzorku, aparaturi i sličnim faktorima, imaju prednost jedna nad drugom. Za što bolje rezultate i konačne produkte, znanstvenici kombiniraju više metoda ili postupaka za određivanje pa tako, osim kromatografskih metoda, za odjeljivanje i određivanje mogu poslužiti postupak ekstrakcije, razne kolorimetrijske metode i detekcije kao što su: UV detekcija ili detekcija fluorescencije.

6. LITERATURA

1. Z. Kniewald, Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb, 1993.
2. M. G. Traber, Vitamin E Inadequacy in Humans: Causes and Consequences, *Adv. Nutr.* **5** (2014) 503-514.
3. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
4. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Strayer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
5. D. Amić, Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 2008.
6. <http://www.plantagea.hr/aromaterapija/biljna-ulja-2/kemizam-biljnih-ulja-2/tokoferoli-i-tokotrienoli-2/> (10.09.2018.)
7. O. Midttun, P. M. Ueland, Determination of vitamins A, D and E in a small volume of human plasma by a high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25** (2011) 1942-1948.
8. I. N. Pasiás, I. K. Kiriakou, L. Papakonstantinou, C. Proestos, Determination of Vitamin E in Cereal Products and Biscuits by GC-FID, *Foods* **7** (2018) 1-6.
9. G. Giusepponi, P. Torquato, D. Bartolini, M. Piroddi, M. Birringer, S. Lorkowski, C. Libetta, G. Cruciani, S. Moretti, G. Saluti, F. Galli, R. Galarini, Determination of tocopherols and their metabolites by liquid-chromatography coupled with tandem mass spectrometry in human plasma and serum, *Talanta* **170** (2017) 552-561.
10. A. K. Hewavitharana, M. C. Lanari, C. Becu, Simultaneous determination of Vitamin E homologs in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* **1025** (2004) 313-317.
11. R. G. Pozo, E. Saitua, I. Unicilla, J. A. Montoya, Simultaneous Determination by HPLC of Fat-Soluble Vitamins in Albacore (Thunnus alalunga), *J. Food Sci.* **55** (1990) 77-78.

12. R. Zhang, W. Shen, X. Wei, F. Zhang, C. Shen, B. Wu, Z. Zhao, H. Liu, X. Deng, Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by GC-MS, *Anal. Methods* **8** (2016) 7341-7346.
13. J. K. Lodge, M. G. Traber, A. Elsner, R. B. Flohé, A rapid method for the extraction and determination of vitamin E metabolites in human urine, *J. Lipid Res.* **41** (2000) 148-154.
14. M. Podda, C. Weber, M. G. Traber, L. Packer, Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone, *J. Lipid Res.* **37** (1996) 893-901.
15. J. K. Lang, K. Gohil, L. Packer, Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinol, and ubiquinone in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions, *Anal. Biochem.* **15** (1986) 106-116.
16. J. G. Bieri, T. J. Tolliver, G. L. Catignani, Simultaneous determination of α -tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography, *J. Clin. Nutr.* **32** (1979) 2143-2149.
17. N. Chotyakul, M. P. Moure, J. A. Saraiva, J. A. Torres, C. P. Lamela, Simultaneous HPLC-DAD quantification of vitamins A and E content in raw, pasteurized, and UHT cow's milk and their changes during storage, *Eur. Food Res. Technol.* **238** (2014) 535-547.
18. R. Schex, V. M. Lieb, V. M. Jimenez, P. E. Squivel, R. M. Schweiggert, R. Carle, C. B. Steingass, HPLC-DAD-APCI/ESI-MSⁿ analysis of carotenoids and α -tocopherol in Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits of varying maturity stages, *Food Res. Int.* **105** (2018) 645-653.
19. M. J. Lee, W. Feng, L. Yang, Y. K. Chen, E. Chi, A. Liu, C. S. Yang, Methods for efficient analysis of tocopherols, tocotrienols and their metabolites in animal samples with HPLC-EC, *J. Food Drug Anal.* **26** (2018) 318-329.
20. H. M. Cimadevilla, D. Hevia, A. Miari, J. C. Mayo, F. Lombo, R. M. Sainz, Development and validation of a single HPLC method for determination of α -tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples, *Biomed. Chromatogr.* **29** (2015) 843-852.

21. S. M. Bakre, D. K. Gadmale, R. B. Toche, V. B. Gaikwad, Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography, *J. Food Sci. Technol.* **52** (2015) 3093-3098.
22. E. Gimeno, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventos, M. C. Torre, M. C. Lopez-Sabater, Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **881** (2000) 251-254.
23. Y. Hirowatari, H. Yoshida, H. Kurosawa, D. Manita, N. Tada, Automated measurement method for the determination of vitamin E in plasma lipoprotein classes, *Sci. Rep.* **4** (2014) 1-6.
24. K. Tyskiewicz, R. Gieysztor, I. Maziarczyk, P. Hodurek, E. Roj, K. Skalicka-Wozniak, Supercritical Fluid Chromatography with Photodiode Array Detection in the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Hemp Seed Oil and Waste Fish Oil, *Molecules* **23** (2018) 1131-1146.
25. J. M. Oberson, E. Campos-Gimenez, J. Riviere, F. Martin, Application of supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry to the determination of fat-soluble vitamins in selected food products, *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1086** (2018) 118-129.
26. http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/vita_en.pdf (22.9.2018.)
27. E. Vamanu, Antioxidant Properties of Mushroom Mycelia Obtained by Batch Cultivation and Tocopherol Content Affected by Extraction Procedures, *Biomed. Res. Int.* **974804** (2014) 1-8.
28. 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.
29. S. Liu, Q. Xie, J. Cao, P. Song, J. Chen, W. Bai, Rapid determination of α -tocopherol in cereal grains using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC, *J. Sep. Sci.* **36** (2013) 1135-1141.

30. P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E, *Anal. Biochem.* **269** (1999) 337-341.
31. M. L. Wong, R. E. Timms, E. M. Goh, Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin, *J. Am. Oil Chem.Soc.* **65** (1988) 258-261.
32. A. L. Bruinen, G. L. Fisher, R. Balez, A. M. Sar, L. Ooi, R. M. A. Heeren, Identification and High-Resolution Imaging of α -Tocopherol from Human Cells to Whole Animals by TOF-SIMS Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Coc. Mass Spectrom.* **29** (2018) 1571-1581.