Određivanje luteina

Blažević, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:182:823828

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STOSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA KEMIJU

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

Jelena Blažević

Određivanje luteina

(Determination of lutein)

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2018.

SAŽETAK

Lutein je prirodni pigment žute boje. Nalazi se u kromoplastima biljaka, voća i povrća zelene boje te u žumanjku jajeta. To su i njegovi najveći izvori. U organizmu čovjeka nalazi se u žutoj pjegi (makula).

U radu su opisani karotenoidi kao glavna skupina pigmenata i ksantofili kao podskupina u koju lutein pripada. Opisana su i kemijska svojstva luteina te njegovo djelovanje na organizam čovjeka. Navedene su i opisane metode kojima se lutein određuje kao i primjer određivanja luteina.

Ključne riječi: pigment, lutein, ekstrakcija, kromatografija, HPTLC

ABSTRACT

Lutein is natural yellow pigment. It can be found in the chromoplasts of green plants, fruits and vegetables and also in egg yolks. These are its biggest sources. Within the human organism it can be found in the yellow spot inside the eye.

This paper describes carotenoids as the main group of pigments and xanthophylls as the subgroup in which lutein is placed. The chemical properties of lutein and its effects on the human organism are also described. The methods used to determine lutein are listed and described as well as an example of determination of lutein.

Keywords: pigment, lutein, extraction, chromatography, HPTLC

Sadržaj:

1. UVOD 1
2. KAROTENOIDI 2
3. KSANTOFILI 5
4. LUTEIN 6
4.1. Hrana bogata luteinom 6
4.2. Uloga luteina u tijelu čovjeka 7
5. KEMIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE LUTEINA 9
5.1. Ekstrakcija 9
5.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće 9
5.1.2. Ekstrakcija čvrsto-tekuće 10
5.2. Kromatografija 11
5.2.1. Kromatografija na stupcu (koloni) 12
5.2.2. Tankoslojna kromatografija - TLC 13
5.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - HPLC 14
6. PRIMJERI ODREĐIVANJA LUTEINA 16
6.1.Ekstrakcija luteina iz rajčice i mrkve 16
6.2. Ekstrakcija luteina iz mljevene paprike 16
6.3. Ekstrakcija luteina iz dodataka prehrani 16
6.4. Kromatografija na stupcu (koloni) 17
6.5. Tankoslojna kromatografija 17
6.6.Tankoslojna kromatografija visokog učinka 17
7. ZAKLJUČAK 19
8. LITERATURA 20

1. UVOD

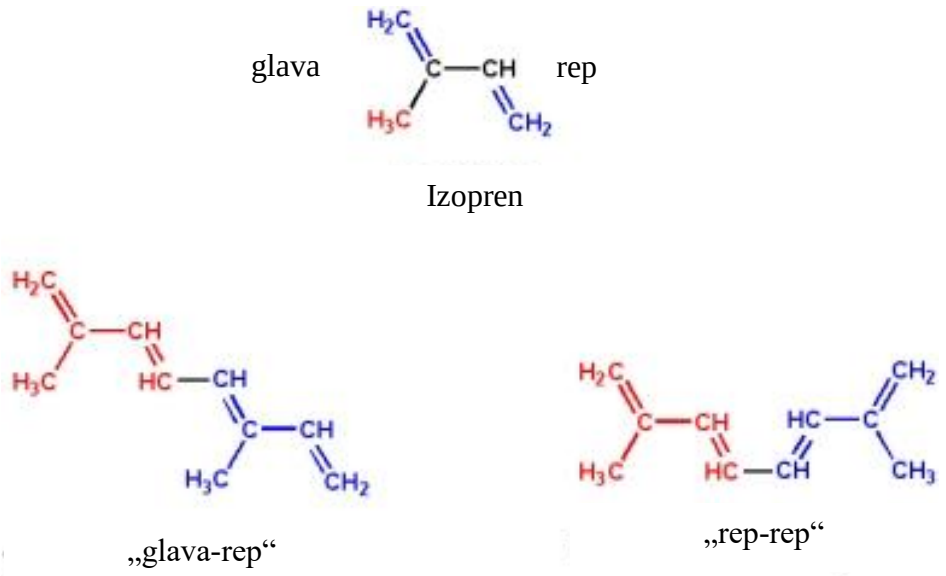
Lutein je prirodni pigment žute boje koji apsorbira plavo svjetlo vidljivog spektra elektromagnetskog zračenja. Ubraja se u ksantofile, jednu od dvije podskupine karotenoida. Prema kemijskoj strukturi je tetraterpen, a boja proizlazi od niza od devet konjugiranih dvostrukih veza. Lutein je polaran zbog prisustva kisika u strukturi te se otapa u polarnim otapalima.

Vrlo je važan za ljudski organizam zbog velikog utjecaja na zdravlje očiju, te sprječavanje nastanka makularne degeneracije koja je vodeći uzrok nastanka sljepoće. Jako važan je antioksidativni učinak luteina u organizmu čovjeka i sve veće je zanimanje znanstvenika za istraživanje luteina iz tog razloga.

Najveća koncentracija luteina je u voću i povrću zelene boje te žumanjku jajeta. Određivanje luteina u navedenim uzorcima se sastoji od ekstrakcije ksantofila pomoću polarnih otapala te određivanja luteina raznim kromatografskim metodama.

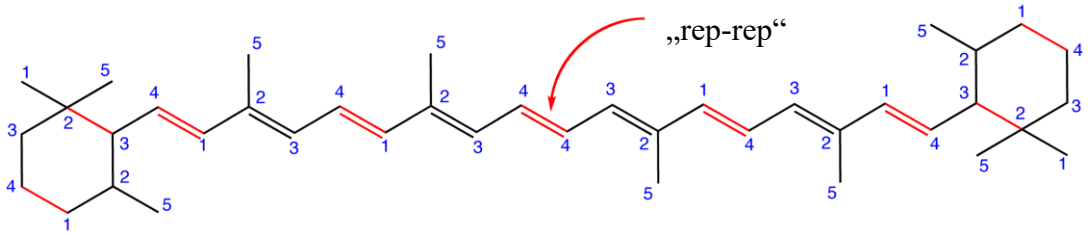
2. KAROTENOIDI

Karotenoidi su velika skupina pigmenata koji su odgovorni za žutu, narančastu i crvenu boju listova, plodova i cvjetova biljaka. Karotenoidi prema kemijskoj strukturi pripadaju tetraterpenima, skupini terpena. Terpeni su polimeri, velike molekule koje se sastoje od dijelova koji se ponavljaju (monomera) povezanih u dugačke lance. Krajevi lanaca mogu biti ciklički ili aciklički. Terpeni se klasificiraju prema izoprenskom pravilu, prema broju izoprenskih jedinica koje sadrže u svojoj strukturi. To su C_5- jedinice koje se vežu prema pravilu „glava-rep“ ili „rep-rep“. C_5-jedinica koja se ponavlja naziva se izopren (Slika 1) [1].



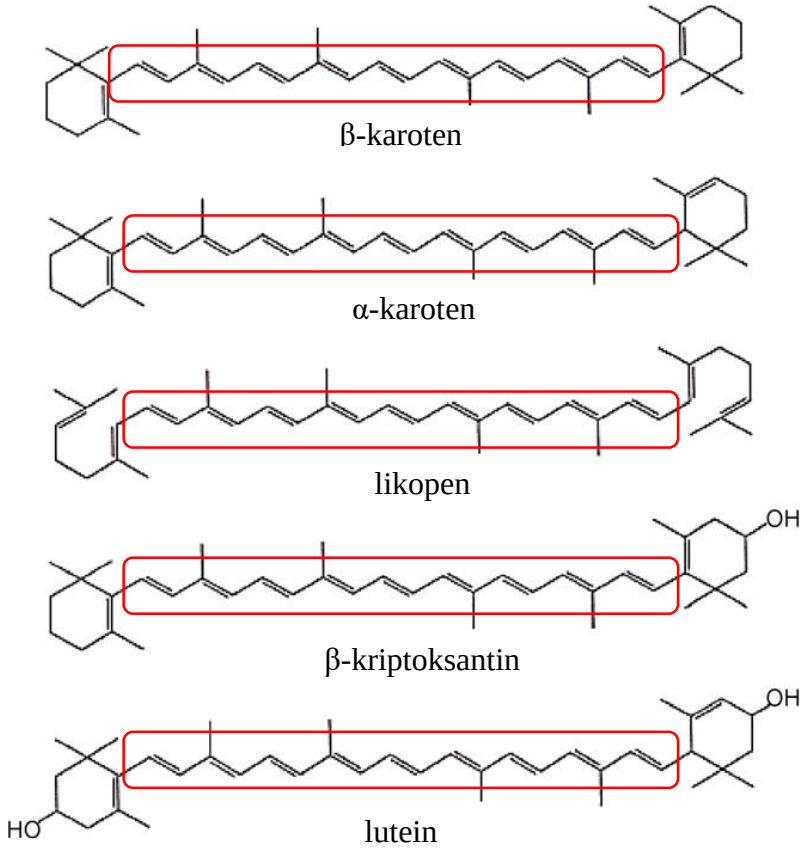
Slika 1. Struktura izoprena i primjer vezanja „glava-rep“ i „rep-rep“ [2].

Tetraterpeni sadrže osam izoprenskih jedinica. Prema pravilu vezanja „rep-rep“ spajaju se dvije geranilgeranil-pirofosfat molekule (Slika 2). Nastaje perfitoen-pirofosfat, molekula koja je prekursor karotenoida [1].



Slika 2. Općenita struktura tetraterpena i prikaz mjesta vezanja prema pravilu „rep-rep“ [3].

Ljudsko oko vidi boju predmeta ukoliko tvar koju sadrži apsorbira svjetlost u vidljivom području elektromagnetskog zračenja (400-800 nm). Predmeti crne boje apsorbiraju sve valne duljine vidljivog spektra, a bijele boje reflektiraju sve valne duljine. Ukoliko predmet apsorbira samo neke valne duljine, a reflektira ili propušta ostale, ljudsko oko će vidjeti boju. Konjugirani spojevi imaju svojstvo koje dovodi do stvaranja boje. Pigmenti, dakle karotenoidi koriste konjugirani sustav dvostrukih veza. Konjugirani sustav koji sadrži manje od osam konjugiranih dvostrukih veza apsorbira u UV-području i boja nije vidljiva ljudskom oku. Niz od devet konjugiranih dvostrukih veza daje karakteristične boje (Slika 3) [4].



Slika 3. Strukture karotenoida i prikaz konjugiranih dvostrukih veza [5].

Karotenoide sintetiziraju fotosintetski organizmi, neke bakterije i gljivice. Javljaju se u kloroplastima viših biljaka. Glavne uloge karotenoida, u organizmima koji obavljaju fotosintezu, su apsorpcija sunčeve energije, svjetlosti, za upotrebu u fotosintezi i zaštiti klorofila od oštećenja uzrokovanih izlaganjem UV zračenju. Životinje i ljudi nemaju sposobnost sintetiziranja karotenoida, pa ih moraju unositi u organizam hranom. Ova skupina obuhvaća preko 600 spojeva pronađenih u prirodi. U ljudskoj prehrani prisutno je

samo 20-40 spojeva, a 90% ih predstavljaju β-karoten, α-karoten, likopen, lutein i β-kriptoksantin. Oni u ljudskom tijelu sprječavaju nastanak kardiovaskularnih bolesti, tumora i drugih kroničnih bolesti. Novija se istraživanja sve više baziraju na antioksidativnom djelovanju karotenoida. Istražuje se koliko učinkovito i kako oni uklanjanju, odnosno neutraliziraju reaktivne kisikove spojeve (ROS) iz tijela. Karotenoidi se dijele na dvije osnovne grupe: ksantofili i karoteni. U grupu ksantofila, spojeva koji u strukturi imaju sadržan kisik (karbonilnu ili karboksilnu skupinu), ubrajaju se lutein, zeaksantin i β-kriptoksantin. U grupu karotena, spojeva koji ne sadrže kisik (tzv. ugljikovodični karotenoidi), ubrajaju se likopen, β-karoten i α-karoten [4].

3. KSANTOFILI

Ksantofili su pigmenti žute boje iz grupe karotenoida. Odgovorni su za boju lišća u jesen. Oni se, kao i svi karotenoidi, nalaze u kloroplastima biljaka, ali njihova je boja potisnuta bojom klorofila. U jesen, u odsutnosti tolike količine sunčeve svijetlosti koja pogoduje klorofilu, klorofil se raspada i lišće poprima boje koje dolaze od ksantofila (Slika 4) [6, 7].

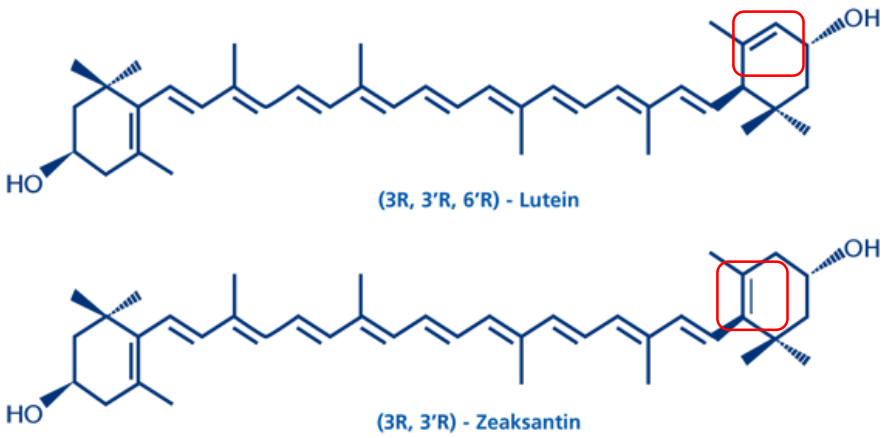


Slika 4. Boje lišća u jesen [8].

Lutein, zeaksantin, neoksantin, violaksantin, β-kriptoksantin su ksantofili. Lutein je primarno zastupljen u hrani koja se konzumira. Sadrže kisik u strukturi. Kisik može biti prisutan kao jedna ili više hidroksilnih ili karbonilnih skupina. β-kriptoksantin jedini je provitamin A iz grupe ksantofila, za razliku od karotena. Gotovo svi karoteni su kao i β-kriptoksantin prekursori vitamina A. Dakle potrebno ih je unositi u organizam, a korisni su nakon pretvorbe u vitamin A (retinol). Ksantofili imaju veću polarnost u odnosu na ostale karotenoide zbog prisutnosti kisika u strukturi i otapaju se u polarnim otapalima [4].

4. LUTEIN

Lutein (β,ε-karoten-3,3'-diol), molekulske formule $C_{40}H_{56}O_2$ jedan je od spojeva koji pripadaju skupini ksantofila. Taj pigment apsorbira plavo svijetlo iz vidljivog spektra elektromagnetskih valova, dakle pri niskim koncentracijama daje tvarima izgled žute boje, a pri visokim koncentracijama narančaste i narančasto-crvene boje. Najveća količina luteina se može pronaći u povrću zelene boje. Topiv je u mastima, a netopiv u vodi, pa se zato u crijevima ugrađuje u hilomikrone koji ga transportiraju do jetre. Više od 50% luteina u krvi prenose lipoproteini velike gustoće (HDL), a ostatak luteina transportiran je lipoproteinima male gustoće (LDL) i vrlo male gustoće (VLDL). Lutein i zeaksantin su izomeri. Razlikuju se samo po položaju jedne dvostruke veze unutar terminalnog prstena (Slika 5). U prošlosti se sadržaj ta dva ksantofila izražavao zajedno jer ih nije bilo moguće razdvojiti niti razlikovati. Danas se razvojem analitičkih tehnika sadržaj svakog od ta dva ksantofila izražava zasebno [9, 10].



Slika 5. Strukture izomera luteina i zeaksantina [11].

4.1. Hrana bogata luteinom

Lutein se nalazi u lisnatom povrću (kelj, raštika, špinat, salata), voću (mandarine) i žitaricama (kukuruz) u količinama koje su navedene u Tablici 1. Nalazi se i u žumanjku jajeta, no njegov sadržaj u jajima niži je nego u povrću. Međutim, njegova bioiskoristivost je najveća iz žumanjka jajeta jer se on sastoji od lipidnog matriksa. Taj se matriks sastoji od kolesterola, triacilglicerola i fosfolipida. U njemu su raspršeni lutein, zeaksantin i ostali mikronutrijenti topivi u mastima, kao što su vitamini A, D i E. Iz toga razloga njegova

iskoristivost iz biljaka je jako mala za ljudski organizam. Tome pridonosi i to što vlakna (npr. pektin) dodatno smanjuju bioiskoristivost luteina iz biljaka [9, 12].

Tablica 1. Masa luteina prisutna u 250 g prehrambenog proizvoda [13].

prehrambeni proizvod	masa luteina / mg
Kelj	26,50
Špinat	2,40
Brokula	3,40
Kukuruz	1,40
Naranča	0,31
Mandarina	0,47
Rajčica	0,36
Grašak	2,40
Celer	0,38
Tikvica	2,70

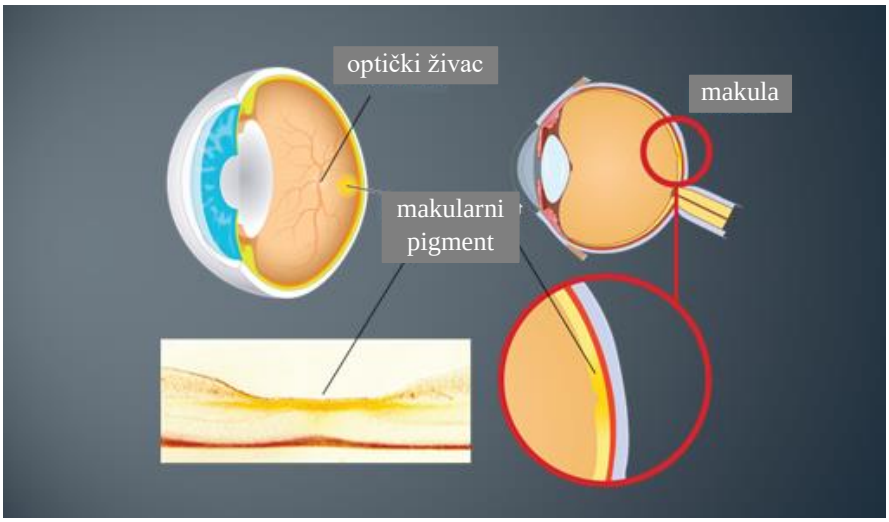
4.2. Uloga luteina u tijelu čovjeka

Lutein je poznat po svojoj važnosti za zdravlje očiju. U prošlosti je služio kao sredstvo pigmentiranja kože, mesa i žumanjaka jaja. Nesilice same ne mogu sintetizirati karotenoide koji su odgovorni za žutu boju žumanjka. Na boju i količinu karotenoida u žumanjku utječe prehrana. Lutein je bitan za sprječavanje senilne makularne degeneracije, smanjenje rizika od razvoja bolesti krvnih žila te zaštitu kože od oštećenja uzrokovanih UV zračenjem. Za veće iskorištenje luteina iz hrane neophodna je veća količina masti u crijevima ljudi. Razlog tome je što se apsorpcija karotenoida odvija pasivnom difuzijom zajedno s mastima iz micela [9, 12].

U ljudskom serumu prisutan je samo slobodni lutein. U prirodi se lutein nalazi u obliku estera, diestera s dvije masnokiselinske skupine na mjestima na kojima se u slobodnom luteinu nalaze hidroksilne skupine. Slobodni lutein se stoga u ljudskom tijelu

direktno apsorbira. Ester se prije apsorpcije mora prevesti u slobodni lutein hidrolizom masnih kiselina [9, 12].

Jako je važan za očuvanje funkcije normalnog vida. Nalazi se u mrežnici i leći oka zajedno sa zeaksantinom. Točnije u žutoj pjegi (makula), sastojak je makularnog pigmenta. Boja makule je vidljiva ispod (Slika 6) [9, 12, 14].



Slika 6. Prikaz mrežnice oka i boje makule koja dolazi od luteina [15].

Lutein se u najvećim količinama unosi u organizam u proljeće iz biljaka. Unos opada tijekom ljeta, jeseni i zime zbog nedostatka svježeg povrća. Stoga je unos luteina iz jaja od velike važnosti. Ukoliko je smanjen unos luteina dolazi do opasnosti od razvoja raznih poremećaja. Može doći do makularne degeneracije koja je vodeći uzrok sljepoće u razvijenim zemljama. Lutein i zeaksantin apsorbiraju plavi dio spektra. Za plavi dio spektra se smatra da oštećuje mrežnicu oka. Proteini koji stvaraju mrežnicu mogu postati oksidirani, a tada ona postaje zamućena. Dakle apsorpcija plavog dijela spektra stvara slobodne radikale koji oksidiraju proteine. Prisutnost luteina kao antioksidansa sprječava oksidaciju proteina [9, 12, 14].

5. KEMIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE LUTEINA

Neke od klasičnih metoda za izolaciju, pročišćavanje i određivanje organskih spojeva su: ekstrakcija, prekristalizacija, sublimacija, destilacija i kromatografske metode [16]. Određivanje luteina počinje ekstrakcijom ksantofila iz uzorka. Zatim se ksantofile razdvaja kromatografijom. Kada je cilj određivanje luteina najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) te spektroskopija vidljivog zračenja [17].

5.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak izolacije i čišćenja organskih tvari. Temelji se na prijenosu tvari iz krute faze ili otopine, suspenzije, emulzije, u neko otapalo. Temelji se i na različitoj topljivosti tvari koja se ekstrahira iz otopine i primjesa koje su prisutne, u dva otpala koja se ne miješaju. Organsko otapalo koje se koristi za ekstrakciju mora biti kemijski inertno prema tvarima prisutnim u smjesi. Tvar koja se ekstrahira mora imati veću topljivost u otapalu od ostalih prisutnih tvari, kako bi se mogla efikasno izolirati od ostatka smjese. Otopina iz koje se vrši ekstrakcija spoja i otapalo za ekstrakciju moraju imati veliku razliku u gustoći. Na taj način se slojevi mogu odvojiti. Organsko otapalo ne smije imati previsoko vrelište tako da se nakon ekstrakcije lako može otpariti. Otapalo mora biti što manje zapaljivo i otrovno, te po mogućnosti jeftino. Organska otapala koriste se za ekstrahiranje organskih tvari, najčešća su: dietil-eter, kloroform, petroleter, diklormetan [16].

5.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Pri ekstrakciji tekuće-tekuće (izmućkivanje) dolazi do razdjeljenja tvari između dva otapala koja se ne miješaju. Obično su to voda i organsko otapalo. Koncentracija tvari u dva otapala je konstanta i dana je *Nernstovim zakonom razdjeljenja*:

$$K = c_1/c_2 \quad (1)$$

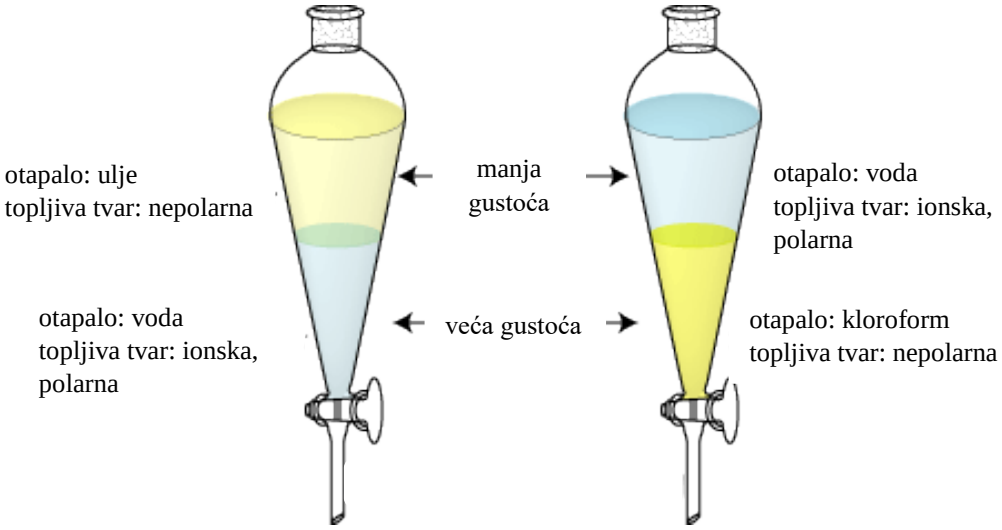
gdje je:

K = koeficijent razdijeljena (konstanta pri određenoj temperaturi);

c_1 = koncentracija otapala kojim se ekstrahira;

c_2 = koncentracija otapala iz kojeg se ekstrahira.

Kada je K>1 tvar je topljiva u gornjem otapala, a koncentracija tvari je K puta veća nego u donjem otapalu. Kada je K<1 koncentracija tvari je 1/K puta veća u donjem nego u gornjem otapalu. Svaka ekstrakcija ponavlja se tri puta da bi se tvar potpuno prevela iz jednog u drugo otapalo. Ekstrakcija tekuće-tekuće odvija se u lijevku za odjeljivanje (Slika 7) [16].



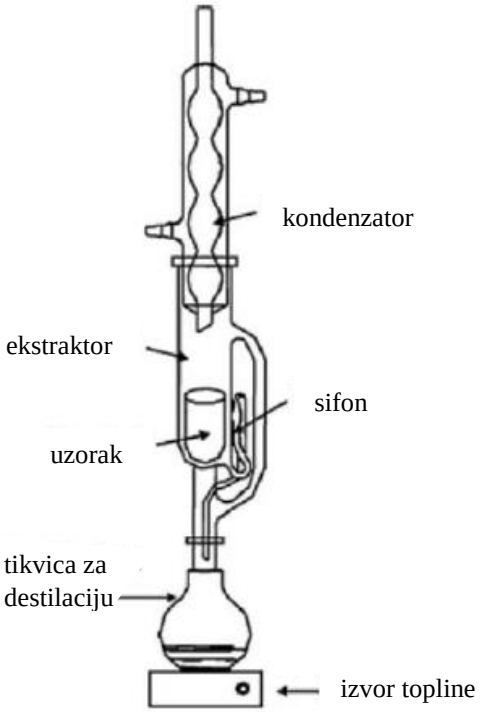
Slika 7. Prikaz lijevka za odjeljivanje i faza dvaju otapala koja se ne miješaju [18].

Lutein je polaran stoga se ekstrahira u polarno otapalo. Za njegovu ekstrakciju iz biljnih uzoraka koriste se sljedeća otapala:

- dietil-eter : kloroform (1:2);
- metanol : kloroform : diklormetan (1:2:1);
- metanol : kloroform : aceton (1:2:1);
- diklormetan : kloroform (1:2) [19] .

5.1.2. Ekstrakcija čvrsto-tekuće

Ekstrakcija čvrsto-tekuće predstavlja izdvajanje organskih tvari iz čvrste faze. Maceriranje i perkoliranje se provode pri sobnoj temperaturi. Pri povišenoj temperaturi se može provesti refluksiranje, zagrijavanje tvari otapalom u aparaturi s povratnim hladilom. Uz refluksiranje pri povišenoj temperaturi može se provesti kontinuirana i višekratna Soxhlet-ova ekstrakcija, koja se izvodi u Sokxhlet-ovom aparatu (Slika 8) [16].



Slika 8. Prikaz Soxhlet-ova aparata [20].

Postupak je takav da se tuljac (npr. filter-papir) napuni usitnjenim uzorkom i stavi u unutrašnjost ekstraktora. Tikvica u kojoj se nalazi otapalo za ekstrakciju se zagrijava, otapalo isparava i pare otapala prolaze kroz cijev ekstraktora te se u hladilu kondenziraju. Otapalo nakon kondenzacije kapa na tuljac, puni unutarnji prostor Soxhlet aparata i ekstrahira tvar iz uzorka. Intenzitet boje uzorka postaje sve jači i jači. Prostor s tuljcem i cjevčica se s vremenom napune. Ekstrakt se tada po načelu spojenih posuda preljeva u tikvicu. Postupak se ponavlja sve dok se u prostoru gdje se nalazi tuljac boja ekstrakta ne obezboji. Tada to znači da se tvar potpuno ekstrahirala iz uzorka [16].

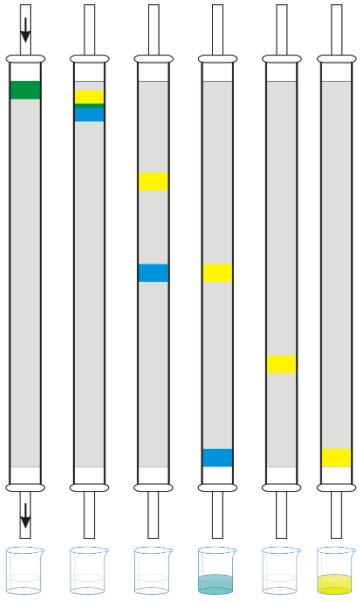
5.2. Kromatografija

Kromatografija je metoda odjeljivanja homogenih smjesa. Dijeli na adsorpcijsku i particijsku kromatografiju. Kod adsorpcijske kromatografije stacionarna faza (SF) je kruta, a mobilna faza (MF, eluens) je tekuća. Ona se temelji na selektivnoj adsorpciji. Tu spadaju kromatografija na stupcu, tankoslojna kromatografija i kromatografija na papiru. Kod

particijske kromatografije stacionarna faza je tekuća, a mobilna faza može biti tekuća ili plinovita. Ona se temelji na parcijalnoj distribuciji kemijskih spojeva s pomoću pogodnih aktivnih tvari. Tu spada plinska kromatografija. Sastojci smjese se razdijele između SF i MF i tako se razdvoje [16].

5.2.1. Kromatografija na stupcu (koloni)

Kromatografija na stupcu je vrsta adsorpcijske kromatografije. Kao stacionarna faza koriste se najčešće aluminijev oksid (Al_2O_3), koji se dodaje u kolonu bez da se suspendira u otapalu, i silikagel, koji se uvijek prvo suspendira u otapalu. Mobilnu fazu predstavljaju polarna i nepolarna otapala koja kroz kolonu teku pod utjecajem gravitacijske sile. Razdvajanje komponenata se temelji na tome da različite tvari putuju kolonom različitom brzinom jer imaju različit koeficijent razdiobe između eluensa i adsorbensa. Na koloni se jedna iza druge formiraju zone čistih spojeva, koje se redom eluiraju (Slika 9) [16].



Slika 9. Prikaz kolone i zona čistih spojeva koje se eluiraju jedna za drugom [21].

Jakost vezanja tvari na SF i topljivost tvari u eluensu određuju brzinu kojom će tvar putovati stupcem, dakle i redoslijed kojim će se tvari eluirati. Polarne tvari, kao što su karboksilne kiseline, amini i alkoholi, se jače adsorbiraju, ostaju vezane na SF jer su aluminijev oksid i silikagel polarni. Stoga nepolarne tvari poput aldehida, ketona, estera i halogenalkana putuju brže i prve eluiraju jer se otapaju u nepolarnom otapalu (MF). Nakon što nepolarne tvari eluiraju, potrebno je koristiti polarna otapala koja će odvojiti polarne tvari od SF i eluirati ih. Osim polarnosti otapala i tvari vrlo je bitna i molekularna masa tvari.

Tvari manje mase eluirati će brže od onih veće molekularne mase. Za dobro odvajanje komponenti vrlo je bitno punjenje cijevi adsorbensom. Adsorbens mora biti jednolično raspoređen u cijevi [16].

5.2.2. Tankoslojna kromatografija - TLC

Tankoslojna kromatografija (eng. *Thin layer chromatography, TLC)* temelji se na adsorpcijskim procesima. Adsorbens se nanosi u tankom sloju na staklenu ploču ili foliju. Adsorbens je najčešće kao i kod kromatografije na stupcu aluminijev oksid ili silikagel. Koristi se za određivanje sastojaka smjesa izoliranog prirodnog materijala ili produkta reakcije. Koristi se i kao metoda kojom se prije kromotagrafije na stupcu određuje otapalo optimalne polarnosti za dobro odvajanje komponenti.

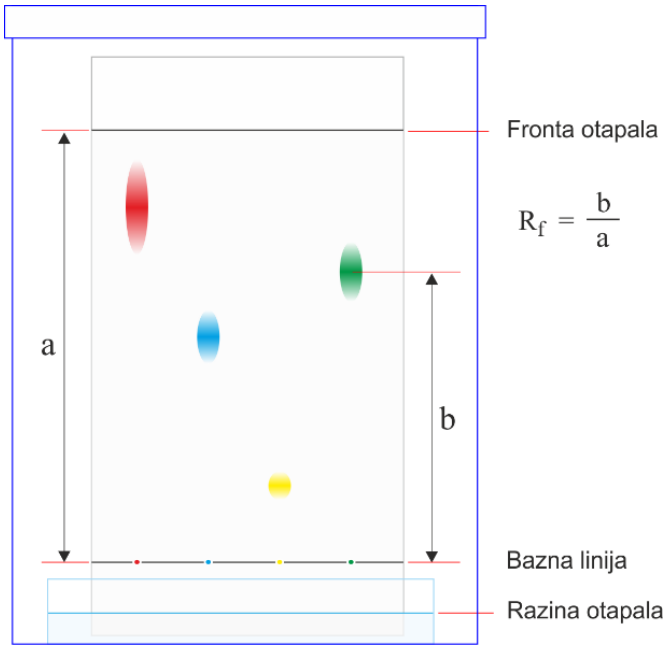
Postupak ide tako da se u posudu s otapalom i filter-papirom, uronjenim u otapalo, stavlja pločica. Filter-papir pomaže da se posuda što više zasiti parama otapala. Otapalo se zbog kapilarnih sila uspinje po krutom adsorbensu. Uzorak se kapilarom u malim količinama nanosi na adsorbens. Startna linija je mjesto gdje se nanosi uzorak. Pločica se izvadi iz otapala prije nego fronta otapala dostigne rub pločice, te se označi frontna linija. To je linija do koje je otapalo stvarno stiglo na pločici. Nakon što se pločica osuši detektiraju se zone i određuju sastojci materijala. Mrlje obojenih tvari se vide na dnevnom svjetlu, dok se one bezbojnih promatraju pod UV-svjetlošću ili ih se prska određenim reagnesima da bi postale vidljive. Primjer takvih reagensa je sumporna kiselina. Pokretljivost spoja na tankom sloju je najvažnija za njegovu identifikaciju. Pokretljivost se izražava pomoću R_f-vrijednosti (Slika 10):

$$R_f = b/a \tag{2}$$

gdje je:

b = udaljenost od startne linije koju je mrlja prošla;

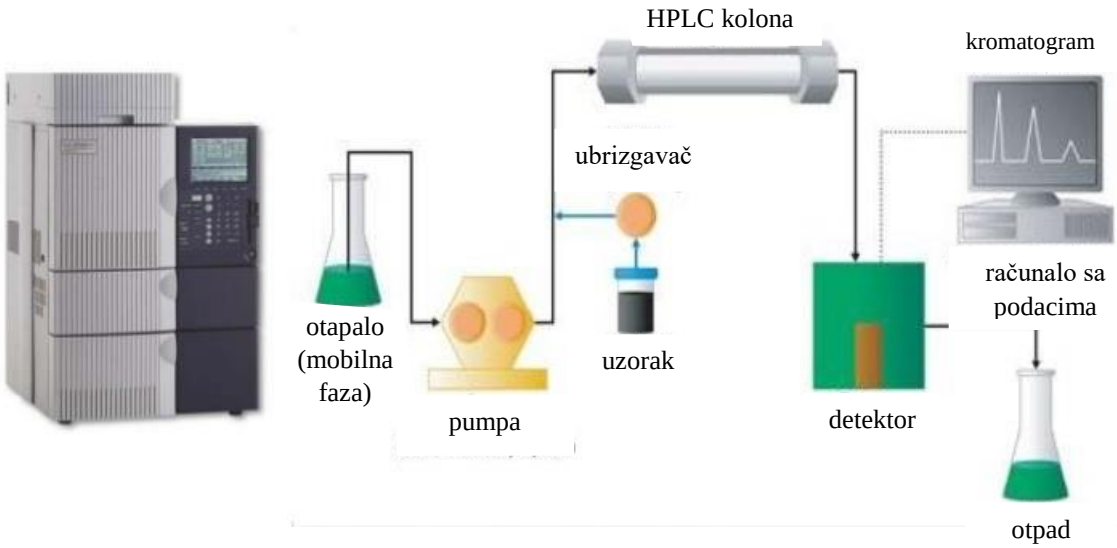
a = udaljenost do koje je stigla fronta otapala [16].



Slika 10. Shema aparature za TLC i prikaz udaljenosti koju su dosegli mrlja tvari i otapalo [22].

5.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je vrsta kromatografije koja se najviše koristi u laboratorijima širom svijeta. Kod komatografije u stupcu otapalo s otopljenom tvari pada kroz kolonu pod utjecajem gravitacijske sile. Kod HPLC-a sila koja tjera otapalo kroz kolonu je pumpa pod tlakom od 400 atmosfera u suprotnom smjeru od smjera gravitacijske sile (Slika 11). SF su obično krute tvari u granulama poput silika gela. Tlak kao pogonska sila, metodu čini puno bržom od kromatografije u stupcu i razdjeljivanje čestica je puno uspješnije. MF čine otapala poput vode, metanola i acetonitrila [23].



Slika 11. HPLC uređaj [24].

Lutein se može razdvojiti iz smjese HPLC uređajem uz mobilnu fazu koju čine acetonitril, metanol, voda i etil-acetat u omjeru 70:9,6:0,4:20. Određivanje je provedeno uz protok od 1.0 mL/min i UV-Vis detekciju pri valnoj duljini od 446 nm [17].

6. PRIMJERI ODREĐIVANJA LUTEINA

6.1.Ekstrakcija luteina iz rajčice i mrkve

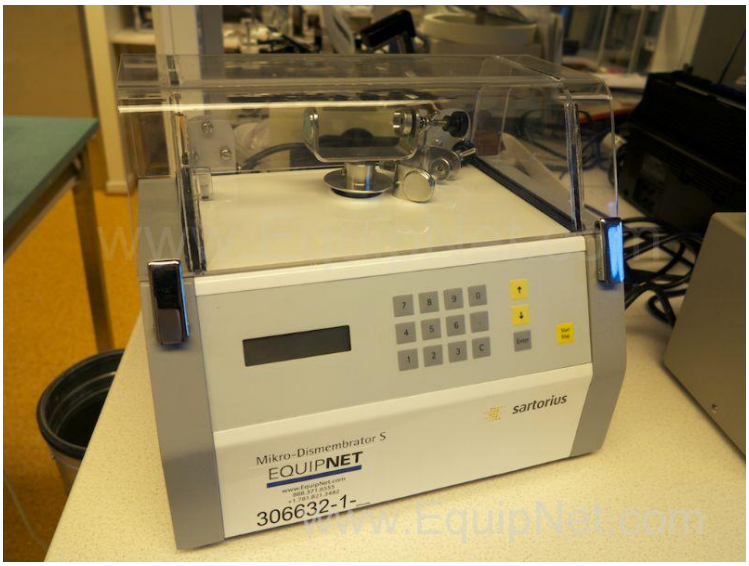
Koncentrat rajčice, metanol i kloroform refluksirani su pod povratnim hladilom u tikvici s okruglim dnom preko vodene kupelji na temperaturi 50 – 55 °C 5 minuta uz povremeno mućkanje. To je ekstrakcija čvrsto-tekuće koja se izvodi u Soxhlet-ovom aparatu. Smjesa je filtrirana preko Buchnerovog lijevka, te je talog ekstrahiran s kloroformom. Smjesa je ponovno filtrirana. Filtrati su tri puta ekstrahirani u lijevku za odjeljivanje s vodom. To je ekstrakcija tekuće-tekuće. Organski sloj koji se nalazi dolje ispusti se u Erlenmeyerovu tikvicu te suši s natrijevim sulfatom. Otopina je zatim filtrirana u tikvicu s okruglim dnom i uparena. Na isti način ekstrahira se i iz mrkve [25].

6.2. Ekstrakcija luteina iz mljevene paprike

Mljevena paprika sadrži veliku količinu pigmenta pa proces ne zahtjeva refluksiranje, dovoljno je otopiti ih u kloroformu te profiltrirati i isprati s vodom. Slijedi sušenje s natrijevim sulfatom i uparavanje [25].

6.3. Ekstrakcija luteina iz dodataka prehrani

Šest različitih vrsta dodataka prehrani kupljeni su u trgovini s dodatcima prehrani. Uzorci 1, 2, 4 i 5 bili su u obliku tvrdih želatinskih kapsula popunjenih prahom, dok su uzorci 3 i 6 bili u obliku tableta. U svim uzorcima lutein je deklariran kao slobodni lutein. Uzorci su izvađeni iz kapsula, smrznuti s tekućim dušikom i usitnjeni homogenizatorom (Slika 12) korištenom frekvencijom od 1700 min^{-1} u vremenu od 1 min. Oko 8-32 mg svakog sastojka je izvagano i preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL. Lutein je ekstrahiran i tretiran etil acetatom koji sadrži 0,1% BHT u ultrazvučnoj kupelji 30 min. Uzorak je zatim nanesen na ploče koje se koriste kod tankoslojne kromatografije visokog učinka (HPTLC) [26].



Slika 12. Mikro-Dismembrator S [27].

6.4. Kromatografija na stupcu (koloni)

Na dno kromatografske kolone stavljen je svitak vate te je kolona ispunjena petroleterom i aluminijevim oksidom. Na vrh je nanesen ekstrakt pigmenta luteina koji se upije na adsorbens. Nakon toga eluiran je smjesom acetona i petroletera u omjeru 10 : 90. Lutein se hvata u tikvicu od pojave prve obojene kapljice do gubitka boje [25].

6.5. Tankoslojna kromatografija

Kapljica ekstrakta luteina i kapljica smjese prije odvajanja stavljene su na pločicu s tankim slojem silikagela. Kapljice su stavljene na startnu liniju. Pločica je stavljena u posudicu sa kloroforom, pritom se pazi da mrlja nije uronjena u otapalo. Eluens se pomoću kapilarnih sila diže uz pločicu i eluira sastojke. Označena je frontna linija te se pločica stavi sušiti [25].

6.6.Tankoslojna kromatografija visokog učinka

15 ng luteina postavljeno je u dvije dužine po 6 mm, 12 mm udaljene od lijeve i desne stranice ploče te 10 mm udaljene od donje stranice ploče. Ploče su stajale 30 min u 5 mL

otapala metanol-aceton u omjeru 1:1. Dokazana je prisutnost luteina u dodacima prehrani. HPTLC je odlična metoda za određivanje luteina (Slika 13). Masenom spektrometrijom određena je količina luteina u uzorcima [26].



Slika 13. Uređaj za izvođenje HPTLC metode [28].

7. ZAKLJUČAK

Lutein je žuti pigment iz skupine karotenoida, podskupine ksantofili. Lutein se određuje iz raznih vrsta povrća i voća te žumanjka jajeta. Nalazi se i u raznim dodacima prehrani. Razlog zašto ga se određuje je da bi se pokazalo koliki je udio luteina u određenim prehrambenim namirnicama, te gdje je njegova bioiskoristivost najveća. Lutein se i kemijski, umjetno dodaje namirnicama ili se dodaje prehrani koju konzumira perad, kako bi jaja imala veći udio luteina. Svemu tome su razlozi veliki utjecaj luteina na zdravlje očiju i njegovo antioksidativno djelovanje. Lutein, odnosno ksantofili se iz uzorka prvo ekstrahiraju korištenjem polarnih organskih otapala, jer se ubrajaju u polarne spojeve zbog prisustva kisika u svojoj strukturi. Otapala za ekstrakciju luteina su dietil-eter : kloroform (1:2), metanol : kloroform : diklormetan (1:2:1), metanol : kloroform : aceton (1:2:1) i diklormetan : kloroform (1:2). Zatim se udio luteina najčešće u modernim laboratorijima u svijetu određuje HPLC i HPTLC metodama. Mobilne faze kod tih metoda mogu biti acetonitril, metanol, voda i etil-acetat. Za kvantificiranje svih karotenoida i ksantofila koristi se HPLC metoda odvajanja sastojaka, dok se za kvantificiranje luteina koriste HPLC ili HPTLC sa spektroskopskom metodom određivanja sastojaka pri valnoj duljini 446 nm. Ta valna duljina odgovara apsorpcijskom spektru luteina. Lutein je vrlo bitno konzumirati u svakodnevnoj prehrani, u proljeće i ljeto kroz svježe povrće i voće zelene do narančaste boje, a u jesen i zimu konzumiranjem jaja.

8. LITERATURA

1. H. Tesso, Isolation and structure elucidation of natural product from plants, dissertation, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry Hamburg, 2005.
2. http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture13/terpene01.jpg (17.09.2018.)
3. http://www.ochempal.org/index.php/alphabetical/i-j/isoprene-rule/ (03.09.2018.)
4. A. V. Rao, L. G. Rao, Carotenoids and human health, Pharm. Res. 55 (2007) 207.
5. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S10436618070 00357 (03.09.2018.)
6. C. R. Noller: Kemija organskih spojeva, Tehnička knjiga, Zagreb, 1967.
7. https://io9.gizmodo.com/5849745/the-chemical-reaction-that-causes-leaves-to-change-color-in-fall (04.09.2018.)
8. https://io9.gizmodo.com/5849745/the-chemical-reaction-that-causes-leaves-to-change-color-in-fall (04.09.2018.)
9. G. Kerep, Z. Škrtić, G. Kralik, Z. Kralik, I. Križek, M. Grčević, Lutein u hranidbi kokoši, Krmiva 54 (2013) 195.
10. Z. Kralik, M. Lovreković, Utjecaj hranidbe na kvalitetu i obogaćivanje jaja funkcionalnim sastojcima, Meso XX (2018) 58.
11. http://www.inpharma.hr/index.php/news/131/19/Uloga-luteina-i-zeaksantina-u-zdravlju-ociju (03.09.2018.)
12. G. Kralik, Z. Janječić, Z. Kralik, Z. Škrtić, Current state of poultry breeding and it's future trends, Poljoprivreda 19 (2013) 49.
13. http://xbodyconcepts.com/lutein-boosts-becoming-an-athlete/ (17.09.2018.)
14. B. Vojniković, D. Kovačević, S. Njirić, M. Čoklo**,** Long term results of age-related macular degeneration therapy with prednisolone acetate – special refer to peripheral visual field changes, Coll. Antropol. 32 (2008) 351.
15. http://www.businessessentials.co.za/2017/12/11/dietary-carotenoidslutein-and-zeaxanthin-against-amd/ (04.09.2018.)
16. D. Gašo-Sokač, V. Bušić: Praktikum iz organske kemije 1, Osijek, 2014.
17. H. U. Bhuyian, A. F. M. A. Islam, I. Tareque, Dr. H. A. Rashid, Development and validation of method for determination of lutein by HPLC, WJPR 4 (2015) 145.
18. http://mcat-review.org/separations-purifications.php (05.09.2018.)

19. https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/FinRep-FAD-2010-0372.pdf (18.09.2018.)
20. https://www.researchgate.net/profile/Noor_Morad/publication/275480639/figure/fig1/AS:294638448594948@1447258688395/Schematic-diagram-of-soxhlet-extractor-7.png (05.09.2018.)
21. https://www.periodni.com/gallery/column_chromatography.png (07.09.2018.)
22. https://www.periodni.com/gallery/papirna_kromatografija.png (07.09.2018.)
23. https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC.html (05.09.2018.)
24. https://www.slideshare.net/anuguleria3/anu-ppt (05.09.2018.)
25. https://zir.nsk.hr/islandora/object/kemos:11 (06.09.2018.)
26. Z. Rodić, B. Simanovska, A. Alberht, I. Vovk, Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening od major dietary carotenoids in food supplements, J. Chromatogr. A. 1231 (2012) 59.
27. http://pics.equipnet.com/mp_data/images/largepic/Jul/201271855735_332423_1.jpg (17.09.2018.)
28. https://www.camag.com/en/home.cfm (08.09.2018.)