

I. gimnazija v Celju

Vitamin K – nujno zlo

Raziskovalna naloga

Avtor:

Tin Centrih, 4. b

Mentorici:

mag. Lea Glažar, prof. kem.

dr. Helena Prosen

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2015

Zahvala

Posebna zahvala gre najprej moji mentorici, mag. Lei Glažar, profesorici kemije, ki mi je nudila strokovno pomoč in prijazno podporo, mi dajala napotke ter pomagala priti do cilja. Pripravljena je bila prisluhniti mojim željam in žrtvovati veliko svojega prostega časa.

Zahvaljujem se tudi Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, in sicer izr. prof. dr. Heleni Prosen in študentu Stefanu Ognjanoviću, ki sta mi omogočila uporabo kemijskega laboratorija, mi strokovno svetovala in dajala ustrezne usmeritve za pridobivanje izsledkov raziskave.

Iskrena hvala vsem profesorjem, še posebej moji razredničarki Marjetki Pintarič, prof., za razumevanje in podporo mojim aktivnostim.

Za lektoriranje naloge se iskreno zahvaljujem profesorici Juani Robida.

Za spodbudo pri nastajanju naloge se zahvaljujem tudi svojim staršem.

Kazalo

POVZETEK	VI
1 UVOD	1
1.1 SPLOŠNO	1
1.2 NAMEN IN CILJ RAZISKOVALNEGA DELA	1
1.3 HIPOTEZE	2
1.4 RAZISKOVALNE METODE	2
2 TEORETIČNI DEL	3
2.1 VITAMIN K ₁	3
2.1.1 Vitamin K ₁ in fotosinteza	4
2.1.2 Vitamin K ₁ in koagulacija krvi	5
2.1.3 Vitamin K ₁ in mineralizacija kosti	6
3 EKSPERIMENTALNI DEL	8
3.1 PRIPRAVA VZORCEV SADJA IN ZELENJAVE ZA DOLOČITEV KONCENTRACIJE VITAMINA K ₁	8
3.1.1 Kemikalije	8
3.1.2 Inventar in merilni instrumenti	8
3.1.3 Zaščita	9
3.1.4 Postopek	9
3.2 DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE VITAMINA K ₁ V SADJU IN ZELENJAVI	10
3.2.1 Kemikalije	11
3.2.2 Inventar in merilni instrumenti	11
3.2.3 Zaščita	12
3.2.4 Optimizacija metode	12
3.2.5 Postopek	13
3.2.6 Meritve in račun	13
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	16
4.1 ODVISNOST KONCENTRACIJE VITAMINA K ₁ V SADJU IN ZELENJAVI	16
4.1.1 Primerjava domačega sadja in zelenjave	16
4.1.2 Primerjava kupljenega sadja in zelenjave	17
4.2 ODVISNOST KONCENTRACIJE VITAMINA K ₁ GLEDE NA PRISOTNOST PESTICIDOV V SADJU IN ZELENJAVI	18
4.3 ODVISNOST KONCENTRACIJE VITAMINA K ₁ GLEDE NA PIGMENT V SADJU	20
4.4 ODVISNOST KONCENTRACIJE VITAMINA K ₁ GLEDE NA TOPLOTNO OBDELAVO SADJA	22
5 ZAKLJUČEK	24

Seznam slikovnega gradiva

Slika 1: Struktura vitamina K ₁ (14).....	3
Slika 2: Struktura vitamina K ₂ (15).....	4
Slika 3: Fotosistem I (16)	5
Slika 4: Struktura varfarina (17)	6
Slika 5: Shema karboksilacije glutamatskih ostankov (18).....	7
Slika 6: Lij ločnik (foto: Centrih, T., 2014).....	8
Slika 7: Uparevanje heksana s pomočjo plinastega dušika (foto: Centrih, T., 2014)	9
Slika 8: Shema instrumenta HPLC (19)	11
Slika 9: Instrument HPLC (foto: Centrih, T., 2014)	11
Slika 10: Kalibracijska krivulja.....	12
Slika 11: Kromatogram za ekstrakt domače surove rjave čebule	13
Slika 12: Kromatogram za ekstrakt kupljene surove rjave čebule	13
Slika 13: Kromatogram za ekstrakt domačega surovega jabolka granny smith	14
Slika 14: Kromatogram za ekstrakt kupljenega surovega jabolka elstar	14
Slika 15: Kromatogram za ekstrakt domačega kuhanega jabolka granny smith	14

Seznam tabel

Preglednica 1: Koncentracije vitamina K ₁ v vzorcih	16
Preglednica 2: Koncentracija vitamina K ₁ v domačem sadju in zelenjavi	16
Preglednica 3: Koncentracija vitamina K ₁ v kupljenem sadju in zelenjavi.....	17
Preglednica 4: Koncentracija vitamina K ₁ v domačem in kupljenem sadju ter zelenjavi	18
Preglednica 5: Koncentracija vitamina K ₁ glede na pigment v sadju	20
Preglednica 6: Podatki o koncentraciji vitamina K ₁ v živilih z različnimi pigmenti	21
Preglednica 7: Koncentracija vitamina K ₁ glede na toplotno obdelavo sadja	22
Preglednica 8: Literaturni podatki koncentracije vitamina K ₁ v surovem in kuhanem živilu	22

Seznam diagramov

Diagram 1: Koncentracija vitamina K ₁ v domačem sadju in zelenjavi	16
Diagram 2: Koncentracija vitamina K ₁ v kupljenem sadju in zelenjavi	17
Diagram 3: Koncentracija vitamina K ₁ v domačem in kupljenem sadju ter zelenjavi	19
Diagram 4: Koncentracija vitamina K ₁ glede na pigment v sadju.....	20
Diagram 5: Koncentracija vitamina K ₁ glede na toplotno obdelavo sadja	22

Seznam uporabljenih enačb

Enačba 1: Izračun koncentracije vitamina K ₁ v ekstraktu vzorca	15
--	----

Povzetek

V nalogi smo želeli analizirati vsebnost vitamin K_1 v sadju in zelenjavi. Zanimala nas je vsebnost vitamina K_1 v domačem in kupljenem sadju ter zelenjavi glede na prisotnost pesticidov v sadju in zelenjavi, glede na pigment v sadju in glede na toplotno obdelavo sadja.

V dveh različnih vrstah jabolk in eni vrsti čebule smo z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo, ki je potekala na reverzni fazi (HPLC-RP), in z UV-detekcijo določali koncentracijo vitamina K_1 .

Določitev koncentracije vitamina K_1 v domačem in kupljenem sadju ter zelenjavi je pokazala, da ima domača rjava čebula (raste neposredno v zemlji) večjo koncentracijo vitamina K_1 kot domače jabolko granny smith (plod). Kupljena rjava čebula ima manjšo koncentracijo vitamina K_1 kot kupljeno jabolko elstar. Ugotovili smo, da moramo upoštevati tudi druge dejavnike, ki lahko vplivajo na koncentracijo vitamina K_1 v sadju in zelenjavi.

Na podlagi določitve koncentracije vitamina K_1 glede na prisotnost pesticidov v sadju in zelenjavi smo ugotovili, da če sta bila sadje ali zelenjava med svojim razvojem izpostavljena pesticidom, se je koncentracija vitamina K_1 v njiju zmanjšala.

Določitev koncentracije vitamina K_1 glede na pigment v sadju je pokazala, da rastline, ki vsebujejo več klorofila, torej so po videzu bolj zelene, vsebujejo tudi več vitamina K_1 .

Na podlagi določitve koncentracije vitamina K_1 glede na toplotno obdelavo sadja smo ugotovili, da ima pred ekstrakcijo toplotno obdelano jabolko manjšo koncentracijo vitamina K_1 kot surovo jabolko iste vrste. V nasprotju z našim rezultati pa smo v literaturi naleteli na drugačne podatke. Sklepamo lahko, da sta pri toplotni obdelavi pomembna temperatura in čas toplotne obdelave živila.

Z osveščanjem ljudi o pomenu vitamina K_1 , ki sodeluje pri koagulaciji krvi in jo uravnava ter je pomemben tudi v procesu mineralizacije kosti, in s podrobnejšimi podatki o vsebnosti vitamina K_1 v različnih živilih bi lahko poskrbeli za kakovostnejše življenje.

1 Uvod

1.1 Splošno

Leta 1929 so prvič posumili, da obstaja snov, ki deluje antihemoragično, torej proti krvavenju. Istočasno je Dam na Danskem proučeval delovanje holesterola tako, da je opravljal poskus s piščanci, ki jih je hranil s prehrano z malo maščobami. Nekoliko pozneje se je njegovim raziskavam pridružil še Šved Schoneyder. Skupaj sta odkrila obstoj snovi, ki je ob pomanjkanju lipidov oziroma maščob in njim podobnih snovi, izzvala krvavenje veznih tkiv. Leta 1936 sta dokončno izolirala snov filokinon in Dam jo je poimenoval *koagulation vitamin*, od tod tudi ime vitamin K. Od leta 1935 so ga delno izolirali iz raznih rastlin, leta 1939 pa so ga izdelali sintetično (1).

Vitamin K je skupina lipofilnih spojin s podobno strukturo, ki sodelujejo pri strjevanju krvi in metabolizmu kosti. Vsem spojinam je skupna funkcionalna skupina, tj. naftokinonski obroč. Prav zaradi njega je mehanizem delovanja podoben za vse njegove vitamere, saj je obroč pomemben za vezavo na receptor. Njegova glavna vitamera sta vitamin K₁ (filokinon) in vitamin K₂ (skupina menakinonov). Obstaja še vitamin K₃, ampak je zaradi svojih lastnosti strupen. Razlika med K₁ in K₂ je pogojena z lipofilnostjo stranskih verig, ki so vezane na obroč. Različna topnost v maščobah pomeni različno biološko funkcijo v človeškem telesu.

Dnevna potreba po vitaminu je zelo majhna in jo zlahka pokrijemo z uživanjem presne zelenjave, predvsem zelenih listov, kot so solata, špinača in ohrovt. Do sinteze tega vitamina prihaja tudi v debelem črevesju, kjer ga proizvajajo intestinalne bakterije. Zadostna dnevna količina za odraslega znaša 120 mikrogramov na kilogram telesne teže (1).

1.2 Namen in cilj raziskovalnega dela

V okviru svoje raziskovalne naloge smo se namenili raziskati količino vitamina K₁ v sadju in zelenjavi. Zanimala nas je vsebnost vitamina K₁:

- v domačem sadju in zelenjavi,
- v kupljenem sadju in zelenjavi,
- glede na prisotnost pesticidov v sadju in zelenjavi,
- glede na pigment v sadju,
- glede na toplotno obdelavo sadja.

Glavni cilj omenjenih raziskav je bil poiskati odgovor na zastavljeno vprašanje: "Je vitamin K res nujno zlo?"

1.3 Hipoteze

Na osnovi svojega predznanja smo postavili naslednje hipoteze:

1. Predvidevamo, da imajo plodovi v primerjavi s podzemnimi deli večjo koncentracijo vitamina K₁.
2. Predvidevamo, da se z uporabo pesticidov koncentracija vitamina K₁ v rastlinah zmanjša.
3. Predvidevamo, da imajo rastline z visoko koncentracijo rdečega pigmenta manjšo koncentracijo vitamina K₁ v primerjavi z rastlinami, bogatimi s klorofilom.
4. Predvidevamo, da se toplotno obdelanim rastlinam koncentracija vitamina K₁ zmanjša.

1.4 Raziskovalne metode

Pri raziskovalnem delu smo uporabili naslednje metode, ki so podrobneje opisane v eksperimentalnem delu:

1. Delo z literaturo.

Pregledali smo razpoložljivo literaturo o vitaminu K. Predvsem nas je zanimalo, kakšen pomen in vpliv ima vitamin K na naš organizem.

2. Priprava vzorcev sadja in zelenjave za določitev vsebnosti vitamina K₁.
3. Določevanje koncentracije vitamina K₁ v sadju in zelenjavi z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo, ki je potekala na reverzni fazi (HPLC-RP) in z UV-detekcijo.
4. Analiza rezultatov.

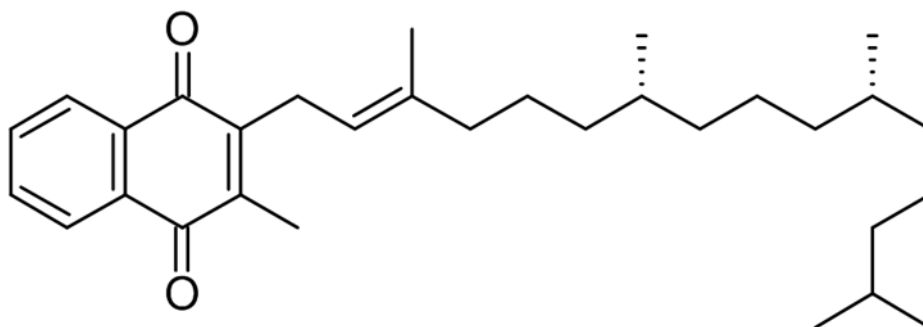
2 Teoretični del

2.1 Vitamin K₁

Vitamin K₁ je enantiomer filokinona, zato si delita enake lastnosti. Filokinon je organska spojina, topna v maščobah in obstojna na zraku in v vodi. Kljub obstojni strukturi je občutljiv na sončno svetlobo in ob izpostavljenosti razpade.

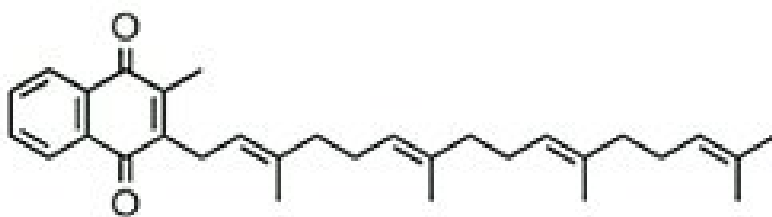
Zgrajen je iz naftokinonskega obroča, na katerega je vezan metil, in iz stranske verige, tvorjene iz štirih ostankov izoprenoida – fiten. Zaradi svoje molekularne strukture je predstavnik policikličnih aromatskih ketonov.

Njegova molska masa znaša 450,70 g/mol z molekulsko formulo $C_{31}H_{46}O_2$. Po IUPAC-poimenovanju je vitamin K₁ (filokinon) še drugače poznan kot 2-metil-3-[(2E)-3,7,11,15-tetrametilheksadek-2-en-1-il]naftokinon.



Slika 1: Struktura vitamina K₁ (14)

V človeškem telesu se filokinon pretvori v menakinon-4 ali menatetrenon. Pri njegovi pretvorbi sta pomembni trebušna slinavka in stena arterij, pri moških ga testisi pretvorijo v menakinon-4 in ne bakterije v debelem črevesju, kot je bilo predhodno domnevano. Res pa je, da vitamin K₂ proizvajajo tudi same intestinalne bakterije. Pomemben je predvsem zaradi svoje sposobnosti pretvarjanja glutamatskega ostanka v Gla-proteine, ki so prisotni v koagulacijskih in antikoagulacijskih faktorjih ter osteokalcinu. Zato je pri strjevanju krvi in mineralizaciji kosti nepogrešljiv (2).



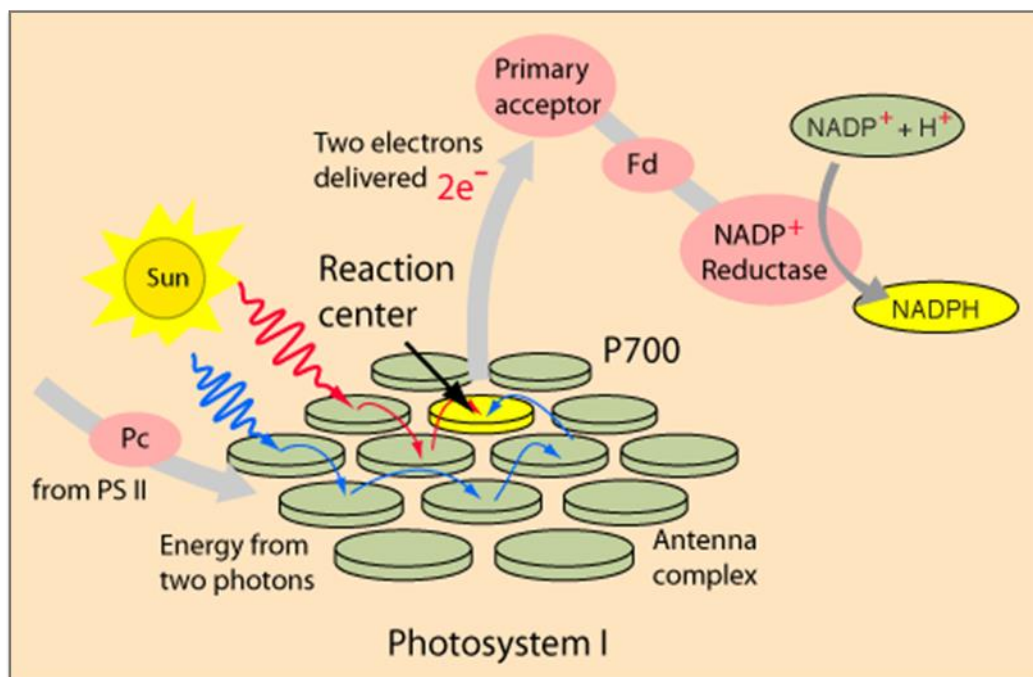
Slika 2: Struktura vitamina K₂ (15)

2.1.1 Vitamin K₁ in fotosinteza

Zaradi svetlobne občutljivosti je vitamin K₁ nepogrešljiv koencim fotosistema I svetlobno odvisnih reakcij, za katere velja, da potekajo v kloroplastih, natančneje na tilakoidni membrani. V reakcijo vstopi po fotovzbujanju pigmentov antena kompleksa (slika 3), ki je kombinacija molekul klorofila A in karotenoidov. Znotraj antena kompleksa je reakcijski center P700, obdan z najmanj petindvajsetimi molekulami klorofila A, za katere so ugotovili, da najbolj absorbirajo svetlobo pri 700 nm. Energija se nato iz antena kompleksa pomakne v njegov center P700 – dimer dveh klorofilov A0 (oksidiran klorofil A), kot je na sliki prikazano s puščicami. Po zvršenih redoks reakcijah v antena kompleksu se dva elektrona preneseta iz klorofila A0 na filokinon. Še preden pa filokinon sprejme elektrona klorofila A0, mora dva tudi oddati, zato reducira železov-žveplov kompleks (Fa in Fb), ki je na sliki označen kot Fd. Tako je filokinon prvi neposredni sprejemnik dveh elektronov v fotosistemu I (3,4).

Problem, s katerim se danes srečujemo, so vsekakor pesticidi in njihova pretirana uporaba. Pesticidi zmanjšujejo koncentracijo klorofila in posledično filokinona. Zaradi rastnih hormonov in zaščite, ki jo nudijo, se rastlinam ni več treba boriti za preživetje, kar zmanjšuje

prisotnost kloroplastov v listih – glavno nahajališče vitamin K₁ (5).



Slika 3: Fotosistem I (16)

2.1.2 Vitamin K₁ in koagulacija krvi

Hemostaza in koagulacija sta zapletena procesa, ki s svojim sodelovanjem ustavita krvavitev iz poškodovane žile tako, da nastane krvni strdek ali tromb. Čez nekaj časa se tromb raztopi, žilni endotelij pa se regenerira. Proces sta pomembna, saj organizem varujeta pred izkrvavitvijo in ohranjata homeostazo.

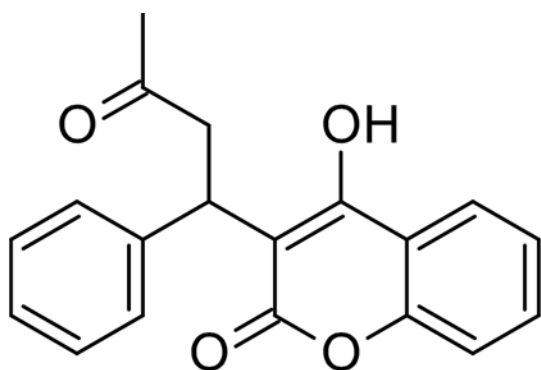
Trombociti vsebujejo zrnca in nekaj faktorjev strjevanja krvi. Razen tkivnega tromboplastina in Ca²⁺ so to še beljakovine plazme. Po poškodbi se faktorji vzbudijo tako, da encimi odcepijo njihov neaktivni del. Aktiviran faktor je hkrati tudi encim, ki aktivira naslednjega. Večina faktorjev se sintetizira v jetrih ob prisotnosti vitamina K₂. Ob pomoči vitamina K₂ nastanejo faktorji II, VII, IX, X in proteini C, S ter Z (6).

Princip delovanja antikoagulantov je dokaj preprost. Zaradi verižnih reakcij faktorjev strjevanja krvi lahko onemogočimo delovanje le enemu, in podrl se bo celoten sistem koagulacije, saj so s svojim delovanjem povezani v kaskado koagulacije. Tako ločimo sredstva proti strjevanju krvi na dve večji skupini glede na to, kako inhibira delovanje faktorja

IV ali vitamina K antagoniste (VKA). Najbolj poznani VKA je varfarin, poznan tudi pod imenom kumadin (7).

Varfarin je bil umetno pridobljen iz dikumarola, ki je prav tako eden izmed VKA. Te učinkovine zmanjšajo koncentracijo aktivne oblike filokinona v telesu, tako da inhibirajo encim vitamina K epoksid reduktazo, ki poskrbi, da se K_1 pretvori v menatetrenon. Po strukturi so si te molekule podobne z vitaminom K, kar VKA omogoča, da se lahko na encim vežejo in preprečijo njegovo nadaljnje delovanje (8).

Varfarin je bil sprva ustvarjen kot strup za podgane, nato pa so ugotovili njegovo antikoagulantno funkcijo. Po zaužitju zdravilo ne začne funkcionirati takoj, temveč potrebuje nekaj dni, da ga jetra shranijo in nato prebavijo ter izločijo z urinom. Prav zato velikokrat poleg kumadina dobijo pacienti še injekcijo heparina, ki pospeši metabolizem v jetrih, in s tem dosežejo skoraj takojšnji učinek zdravila. Kot protistrup pa se še danes uporablja filokinon. Ob prevelikem doziranju varfarina lahko pride do zapletov, kot je hudo krvavenje. Kalcinacija arterij in srčnih zaklopk ter osteoporoza sta še dva od mnogih stranskih učinkov, ki jih pacient lahko doživi (9).



Slika 4: Struktura varfarina (17)

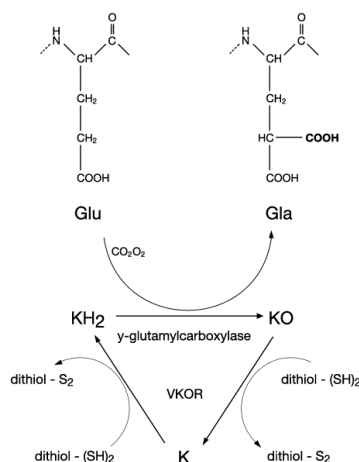
2.1.3 Vitamin K_1 in mineralizacija kosti

Kost ni mrtva, temveč se nenehno obnavlja in preoblikuje, sploh pri otrocih in odraslih. Sestavljena je iz živih celic, proteinov, mineralov in vode. Ena vrsta kostnih celic so osteoblasti, ki gradijo novo kostno tkivo, druga vrsta pa osteoklasti, ki kost razgrajujejo.

Ko se okostje v človeškem plodu šele začne razvijati, so še vse kosti iz čvrstega, a prožnega hrustanca. Pri novorojenčku je večji del hrustanca že otrdel v kostno tkivo. Spreminjanje

hrustanca v kost – okostenitev se začne na primarnih okostenitvenih središčih, ki so na deblu dolgih kosti. Na vsakem koncu kosti so t. i. sekundarna okostenitvena središča, kjer se hrustanec postopno spreminja v kostno tkivo. Med kostnim deblom in orjakom je rastni plošček, kjer kost izdeluje nov hrustanec in se tako podaljšuje (10).

V procesu mineralizacije kosti, ki je del okostenitve, pa je pomemben vitamin K₁. Prej omenjeni osteoblasti izločajo protein osteokalcin, ki povzroči vezavo kalcija v kosti. Protein nastane s pomočjo karboksilacije glutamatskih ostankov, kjer je menakinon-4 nepogrešljiv, saj vstopa v reakcijo kot nekakšen encim.



Slika 5: Shema karboksilacije glutamatskih ostankov (18)

Po funkciji je osteokalcin podoben hormonom. Ob sproščanju proteina se beta celice v trebušni slinavki odzovejo tako, da izločijo več insulina, istočasno pa maščobne celice izločijo adiponektin, ki naredi celice občutljivejše na inzulin. Tako celice prejmejo več glukoze, kar posledično prinese več energije za rast in razvoj. Poleg tega je pomemben pri ohranjanju Ca^{2+} ionov v homeostazi, ki v preveliki količini povzročajo aterosklerozo in kalcinacijo srčnih zaklopk (11).

3 Eksperimentalni del

3.1 Priprava vzorcev sadja in zelenjave za določitev koncentracije vitamina K₁

Izbrali smo dve različni vrsti jabolk in eno vrsto čebule ter jih pripravili za nadaljnjo analizo določitve koncentracije vitamina K₁.

3.1.1 Kemikalije

Ime spojine	Formula spojine
metanol	CH ₃ OH
destilirana voda	H ₂ O
heksan	C ₆ H ₁₄

3.1.2 Inventar in merilni instrumenti

- kuhinjski nož
- kuhinjska deska
- plastična posoda
- epruvete
- stojalo za epruvete
- stojalo za lij ločnik
- lij ločnik
- čaše
- erlenmajerice
- pipete
- žogice za pipete
- lijak
- filtrirni papir
- steklene palčke



Slika 6: Lij ločnik (foto: Centrih, T., 2014)

- reagenčne stekleničke
- Gorenje – hand grinder MPE 400 EA
- merilni valji
- ultrazvočna kopel
- tehtnica
- plinska jeklenka z dušikom



Slika 7: Uparevanje heksana s pomočjo plinastega dušika
(foto: Centrih, T., 2014)

3.1.3 Zaščita

- zaščitna halja
- zaščitna očala

3.1.4 Postopek

Vzorec najprej na deski s kuhinjskim nožem nasekljamo na manjše koščke. Koščke prenesemo v plastično posodo in jih s paličnim mešalnikom homogeniziramo. Vzorc (jabolko), ki mu določamo odvisnost koncentracije vitamina K_1 od temperature, dodamo destilirano vodo, segrevamo 5 minut pri 80 °C. Na avtomatski analizni tehtnici z odstopanjem $\pm 0,0001$ g zatehtamo vzorec, in sicer 10,0000 g homogene pulpe čebule oz. 15,0000 g pulpe jabolka in jo razmešamo v 40 mL metanola. Zmes postavimo na ultrazvočno kopel, da razbijemo celične stene in v topilo prenesemo čim več analizirane snovi. Po 15 minutah vzorec filtriramo. 10 mL vzorca spiramo trikrat s 4 mL heksana v liju ločniku. Lij ločnik zapremo in ga stresamo maksimalno 1 minuto, medtem pa sproščamo tlak, ki nastaja v liju ločniku. Vitamin K_1 se topi v heksanu, saj je nepolarna molekula. Med tekočinama nastane fazna meja zaradi različnih gostot. Mešanica s heksanom plava na metanolu, zato odpremo petelinček, da steče metanol iz lija ločnika v že prej uporabljeno čašo. Spiranje s heksanom ponovimo še dvakrat. Po ponovitvah prenesemo tekočino v novo čašo z izlivom in jo prelijemo v epruveto. Heksan nato uparimo s pomočjo plinastega dušika. Na stenah epruvet se

nabere bela plast, ki vsebuje filokinon. Ponovno vse raztopimo z 2 mL metanola. Zdaj lahko začnemo z analizo in določevanjem koncentracije filokinona v pripravljenih vzorcih.

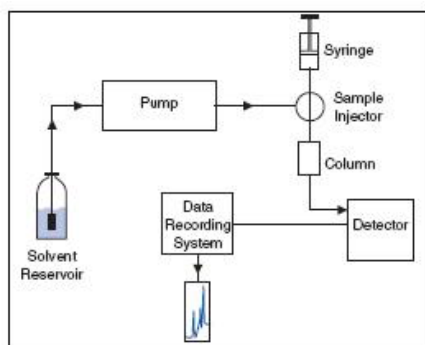
3.2 Določevanje koncentracije vitamina K₁ v sadju in zelenjavi

Koncentracijo vitamina K₁ (filokinona) v sadju in zelenjavi smo določali z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo, ki je potekala na reverzni fazi (HPLC-RP) z UV-detekcijo. Kromatografija je tehnika, pri kateri posamezne komponente neke mešanice separiramo na podlagi njihovega različnega porazdeljevanja med dve fazi: stacionarno in mobilno. Stacionarna faza je trdna snov ali tekočina, nanescena na trden nosilec, in je v kromatografski koloni. Mobilna faza je plin ali tekočina, ki se pomika skozi kolono. Poglavitne lastnosti, ki vplivajo na to, kako se bo neka komponenta v mešanici porazdeljevala med obe fazi, so njena polarnost in prisotnost določenih funkcionalnih skupin, pri nekaterih vrstah kromatografije pa še njena hlapnost in velikost molekul.

Pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (angl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) se kot mobilna faza uporablja tekočina, stacionarna faza je nanescena ali kemično vezana na delce polnila (1,5–20 µm) v kovinskih kolonah premera 1–4 mm in dolžine 5–30 cm. Osnova stacionarnih faz je najpogostejše polarni silikagel (t. i. normalna faza, NP), ki je lahko kemično modificiran, da postane bolj nepolaren (t. i. reverzna faza, RP). To fazo smo uporabili tudi mi. Pri normalni fazi uporabljamo kot mobilno fazo mešanico organskih topil, pri reverzni fazi pa mešanico destilirane vode ali pufrnih raztopin s topili, ki se z vodo mešajo (metanol, acetonitril, tetrahidrofuran ipd.). Mobilna faza lahko ima ves čas analize enako sestavo – izokratska elucija, lahko pa jo med analizo spreminjamo – gradientna elucija, kar je zlasti primerno za mešanice spojin z različno polarnostjo. HPLC je primeren za analizo večine spojin, tudi za termično nestabilne in nehlapne. Pogosto se uporablja v preparativne namene. Glavni deli tekočinskega kromatografa so rezervoar za mobilno fazo, črpalka za črpanje mobilne faze skozi kolono, injektor za vzorec, kromatografska kolona in detektor. Najpogostejša detektorja sta detektor na lomni količnik (refraktometrični) in spektrofotometrični detektor, ki smo ga uporabili tudi mi pri določevanju filokinona v sadju in zelenjavi (12).

Detekcija temelji na dejstvu, da molekule absorbirajo svetlobo, kar pa je odvisno od njihove strukture in okolja, ki jih obdaja. Za molekule, ki absorbirajo svetlobo valovnih dolžin v

območju UV-spektra, uporabljamo kot vir svetlobe emitor, ki oddaja svetlobo teh valovnih dolžin. Za molekule, ki absorbirajo v vidnem delu spektra, pa uporabimo vir vidne svetlobe. Pri analizi smo uporabili valovno dolžino 254 nm in svetilko D2 (13).



Slika 8: Shema instrumenta HPLC (19)

3.2.1 Kemikalije

Ime spojine	Formula spojine
metanol	CH_3OH
acetonitril chromosolv, for HPLC	$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$
standard vitamin K ₁	$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_2$
etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

3.2.2 Inventar in merilni instrumenti

- sistem HPLC z dvema črpalkama; ročno injiciranje in UV-vis detekcija
- kromatografska kolona Chromosil-eternity-5-C18; 100 x 4,6 mm; velikost delcev 5µm
- računalnik



Slika 9: Instrument HPLC (foto: Centrih, T., 2014)

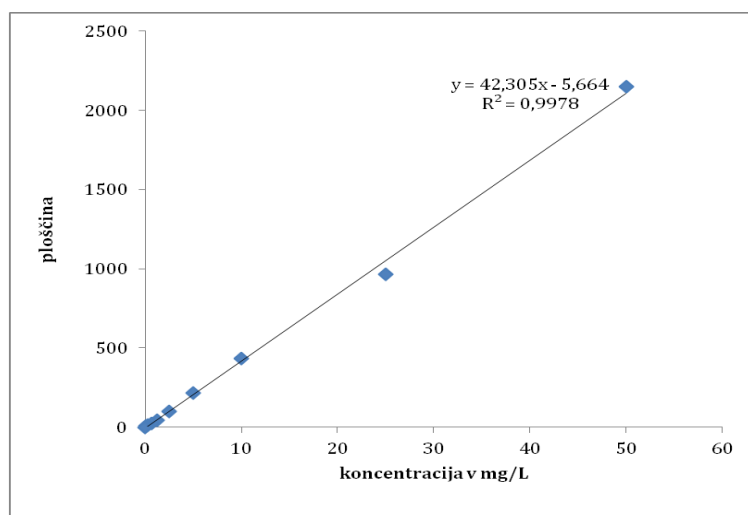
3.2.3 Zaščita

- zaščitna halja
- zaščitna očala

3.2.4 Optimizacija metode

Čas merjenja je bil 15 minut, pretok je bil ves čas 0,7 mL/min. Standardni vzorec smo pripravili iz čistega standarda, ki je rumena, zelo viskozna tekočina. Zatehtali smo vzorec z maso 0,0232 g in ga poskušali raztopiti v 25 mL metanola (topnost vitamina K₁ v metanolu: 11000 mg/L, T = 22 °C), vendar se standard ni popolnoma raztopil, zato smo vse skupaj prelili v 50 mL bučko, dodali 20 mL etanola in dopolnili z metanolom. Končna raztopina je imela koncentracijo 464 mg/L. Ker je vitamin K₁ na svetlobi neobstoje, smo bučko s standardno raztopino zaščitili z alufolijo (v treh dneh je padla koncentracija kontrolne raztopine za 30,3 %).

Iz standardne raztopine smo pripravili 9 raztopin s koncentracijami 50–0,125 mg/L (pod 0,125 mg/L detekcija ni bila izvedljiva), ki smo jih analizirali s HPLC po trikrat (retencijski čas 8,17 min, $\lambda = 254$ nm), in povprečje določitev uporabili za izris kalibracijske krivulje (priloga 1).



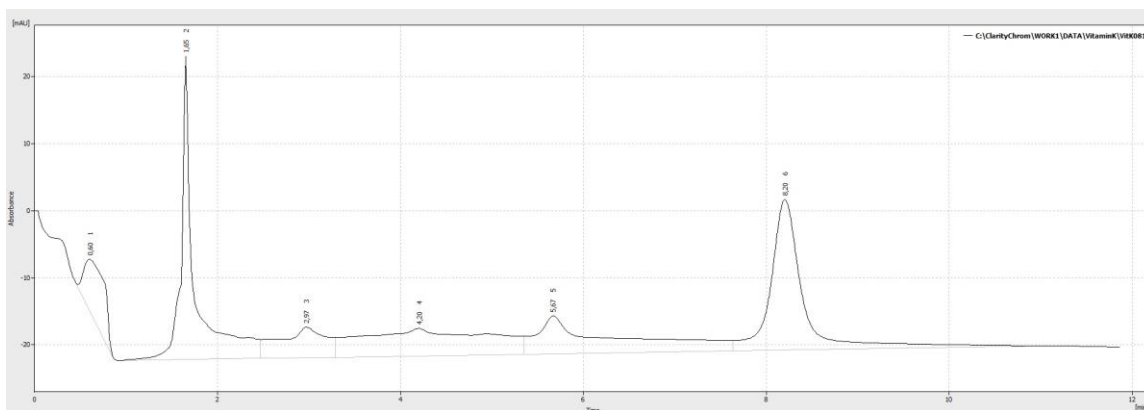
Slika 10: Kalibracijska krivulja

3.2.5 Postopek

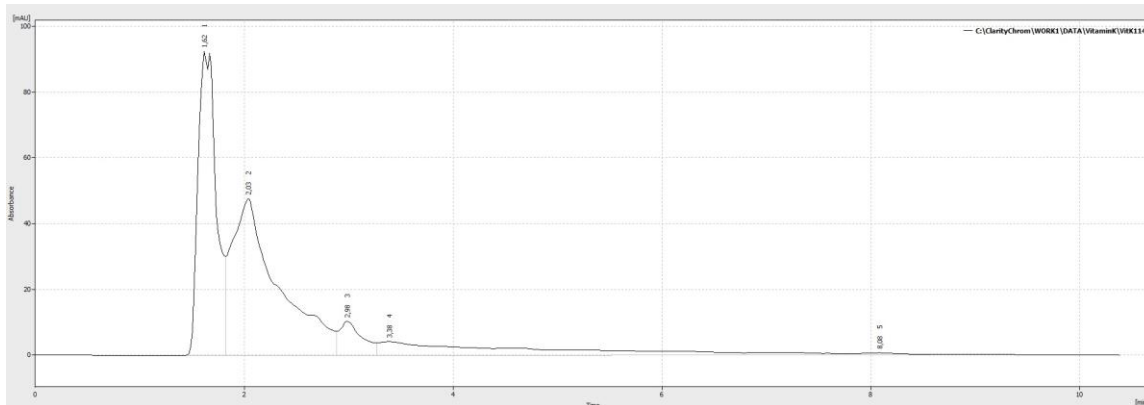
Na računalniku zaženemo program in s tem začnemo analizo. Po dveh minutah v injektorski del tekočinskega kromatografa injiciramo 1 ml pripravljenega vzorca. Ko mobilna faza (mešanica acetonitrila in metanola) teče skozi kolono, gradientno spreminja sestavo iz začetnega razmerja 1 : 1 do končnega 7 : 3. Med tem časom računalnik beleži podatke in riše kromatogram. Po 8 minutah se iz kolone prične izpirati filokinon (retencijski čas 8,17 min). Med analizo smo pripravili metanolno raztopino vitamina K₁ za standardni dodatek (10 mg/L), ki smo ga dodali ekstraktu vzorca v enakem volumnu, kot smo prej raztopili suhi preostanek, in ekstrakt s standardnim dodatkom še trikrat analizirali.

3.2.6 Meritve in račun

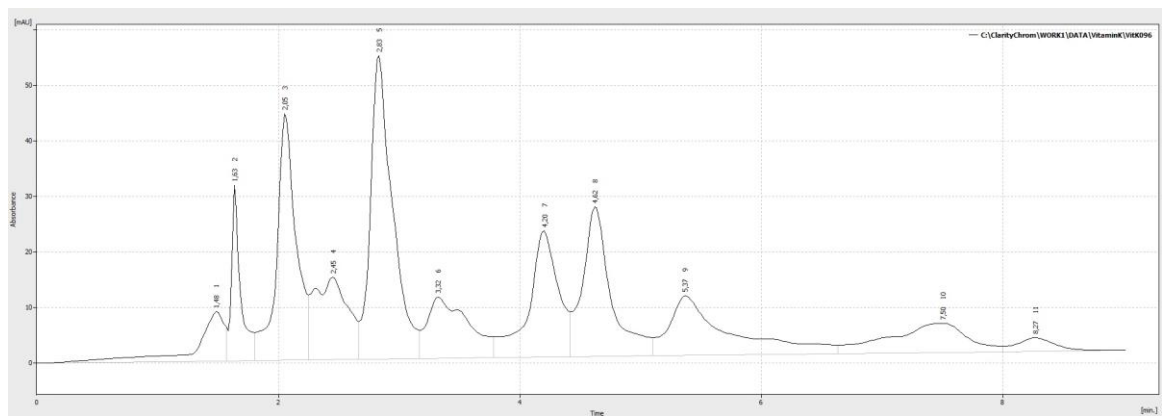
Za določitev koncentracije vitamina K₁ v vzorcih smo uporabili metodo standardnega dodatka (po tri določitve ekstrakta samega vzorca in ekstrakta vzorca s standardom, volumen standarda je bil enak volumnu ekstrakta). Kot meritve smo dobili naslednje kromatograme:



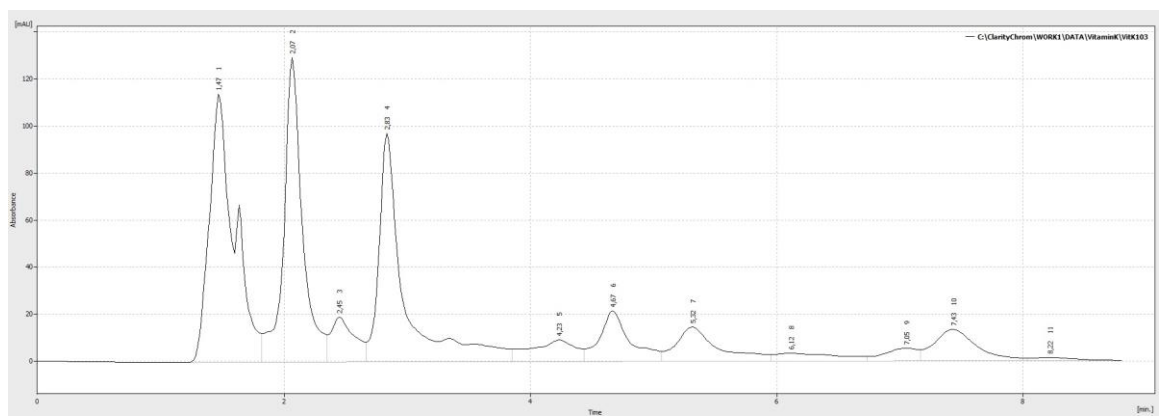
Slika 11: Kromatogram za ekstrakt domače surove rjave čebule



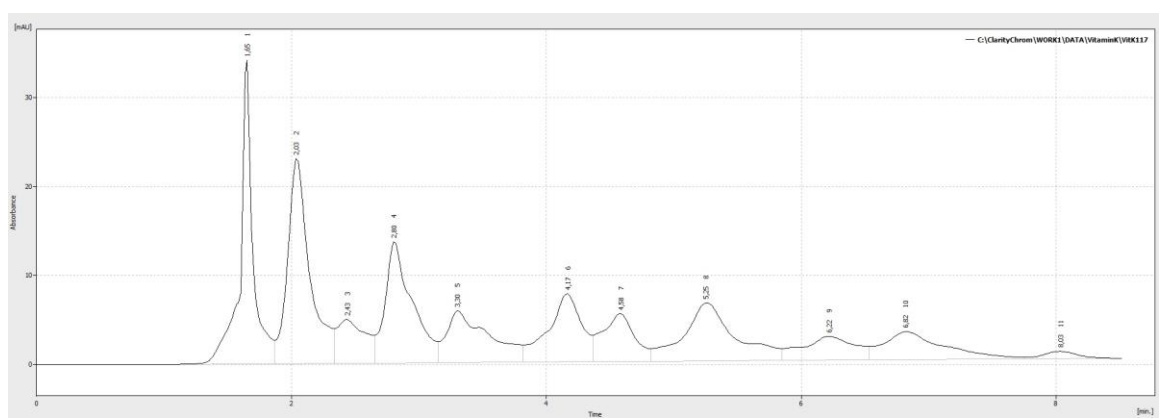
Slika 12: Kromatogram za ekstrakt kupljene surove rjave čebule



Slika 13: Kromatogram za ekstrakt domačega surovega jabolka granny smith



Slika 14: Kromatogram zaekstrakt kupljenega surovega jabolka elstar



Slika 15: Kromatogram za ekstrakt domačega kuhanega jabolka granny smith

Koncentracijo vitamina K₁ v ekstraktu vzorca smo izračunali po naslednji enačbi:

Enačba 1: Izračun koncentracije vitamina K₁ v ekstraktu vzorca

$$c(x) = \frac{c(st)}{2 \frac{A(skupni)}{A(x)} - 1}$$

c(x)..... koncentracija vitamina K₁ v ekstraktu vzorca

c(st).....koncentracija standarda vitamina K₁ (10 mg/L)

A(x)..... instrumentalni signal (ploščina kromatografskega vrha) za ekstrakt vzorca

A(skupni)..... signal za ekstrakt vzorca z dodanim standardom

Izračunano koncentracijo vitamina K₁ v ekstraktu c(x) pomnožimo z volumenom ekstrakta (0,002 L), da dobimo maso vitamina K₁ v ekstraktu. Maso delimo z izkoristkom ekstrakcije (0,768), da dobimo maso v ekstrahirani pulpi, nato pa še množimo z 2 (ker smo za ekstrakcijo uporabili le polovico pulpe). Končno maso vitamina K₁ v vzorcu delimo z maso vzorca, da dobimo koncentracijo vitamina K₁ v vzorcu v ppm oziroma mg/kg ali µg/g.

4 Rezultati in razprava

S prej opisanim postopkom smo pripravili različne vzorce. V njih smo določili vsebnost vitamina K₁. S pomočjo kromatogramov (slike 11–15) in z enačbo 1 smo nato izvedli preračun dobljenih rezultatov v koncentracijo vitamina K₁. Rezultati so za vzorce navedeni v preglednici 1. Koncentracija je podana v ppm, kar po angleško pomeni *parts per million*, in je enakovredna enotama 1 mg/kg = 1 µg/g.

Preglednica 1: Koncentracije vitamina K₁ v vzorcih

	domača surova rjava čebula	kupljena surova rjava čebula	domače surovo jabolko granny smith	kupljeno surovo jabolko elstar	domače kuhano jabolko granny smith
koncentracija [ppm]	0,602	0,144	0,309	0,215	0,174

4.1 Odvisnost koncentracije vitamina K₁ v sadju in zelenjavi

4.1.1 Primerjava domačega sadja in zelenjave

Preglednica 2: Koncentracija vitamina K₁ v domačem sadju in zelenjavi

Živilo	Koncentracija vitamina K ₁ [ppm]
surova rjava čebula	0,602
surovo jabolko granny smith	0,309

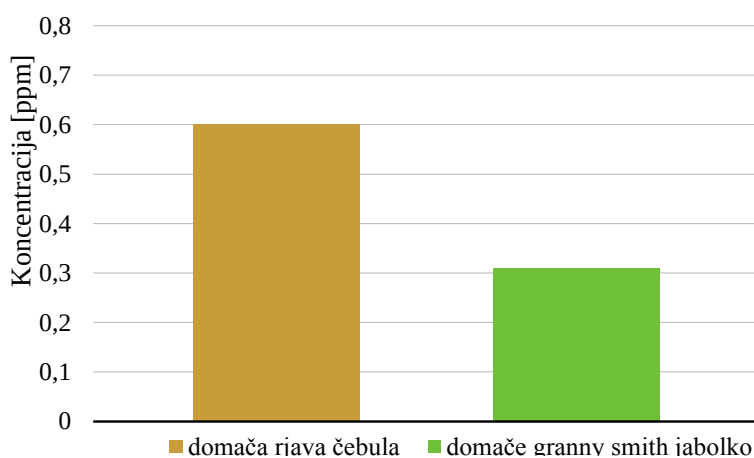


Diagram 1: Koncentracija vitamina K₁ v domačem sadju in zelenjavi

Iz podatkov v preglednici 2 in prikaza na diagramu 1 je razvidno, da ima domača surova rjava čebula skoraj dvakrat večjo koncentracijo vitamina K₁ v primerjavi z domačim surovim

jabolkom granny smith. Čebula raste v zemlji, medtem ko je jabolko plod. To bi lahko pojasnili tudi z vsebnostjo škroba, ki je pri čebuli prisoten v večji količini. Škrob se shranjuje v celičnih organelih, imenovanih amiloplasti. Tudi kloroplasti so celični organeli in jih uvrščamo med plastide, ki vsebujejo klorofil in predstavljajo glavni vir vitamina K₁. Po nekaj časa rastlina ne potrebuje več toliko kloroplastov zaradi različnih razlogov, npr. premalo svetlobe, shranjevanje rezervne hrane ... Ravno kloroplasti se nato pretvorijo v amiloplaste, kjer je poleg škroba vitamin K₁, ki se pri pretvorbi ohrani.

4.1.2 Primerjava kupljenega sadja in zelenjave

Preglednica 3: Koncentracija vitamina K₁ v kupljenem sadju in zelenjavi

Živilo	Koncentracija vitamina K ₁ [ppm]
surova rjava čebula	0,144
surovo jabolko elstar	0,215

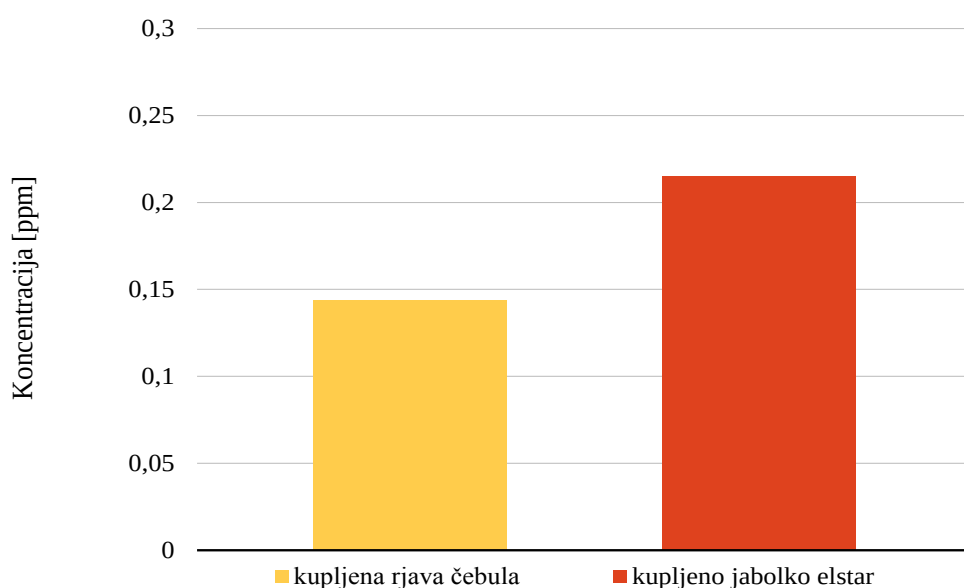


Diagram 2: Koncentracija vitamina K₁ v kupljenem sadju in zelenjavi

Iz podatkov v preglednici 3 in prikaza na diagramu 2 je razvidno, da je koncentracija vitamina K₁ večja pri jabolku. To razliko lahko pojasnimo s prisotnostjo težkih kovin v zemlji in izpostavljenostjo svetlobi. Težke kovine v zemlji škodujejo rastlinam. S tem ko jih rastlina vnese v organizem, se jih poskuša znebiti. Vso energijo, ki bi jo drugače porabila za izvajanje

fotosinteze in izgradnjo novih kloroplastov, kjer je vitamin K₁, nameni za izločanje težkih kovin iz organizma oz. njihovo skladiščenje v vakuoli (odpadnem mehurčku rastlinskih celic).

Na čebulo tako težke kovine vplivajo močnejše kot na jabolko, saj neposredno raste v zemlji, medtem ko jabolka utrgamo z drevesa, zato jih prisotnost težkih kovin ne prizadene tako močno.

Pomembni faktor, zakaj je prisotnega manj vitamina K₁ v čebuli kot v jabolku, v nasprotju s prejšnjo ugotovitvijo, je vsekakor svetloba, ki je glavni vir energije. Vzrok izvajanja fotosinteze leži v svetlobi in njenih fotonih, ki predstavljajo nekakšno aktivacijsko energijo in sprožijo delovanje fotosintetskih pigmentov in njihovih kompleksov. Večja kot bo izpostavljenost svetlobi, več kloroplastov bo rastlina proizvedla, kar pomeni, da bo potrebnih več fotosintetskih kompleksov, katerih del je tudi vitamin K₁. Ponovno je ta dejavnik v korist jabolku, saj so plodovi v večji meri izpostavljeni svetlobi kot pa čebula, ki uspeva neposredno v zemlji.

Na podlagi zbranih rezultatov lahko ugotovimo, da postavljena hipoteza 1 drži le delno. Upoštevati moramo tudi druge dejavnike, ki lahko vplivajo na koncentracijo vitamina K₁ v sadju in zelenjavi.

4.2 Odvisnost koncentracije vitamina K₁ glede na prisotnost pesticidov v sadju in zelenjavi

Preglednica 4: Koncentracija vitamina K₁ v domačem in kupljenem sadju ter zelenjavi

Živilo	Koncentracija vitamina K ₁ [ppm]
jabolko granny smith (domače)	0,309
jabolko elstar (kupljeno)	0,215
rjava čebula (domača)	0,602
rjava čebula (kupljena)	0,144

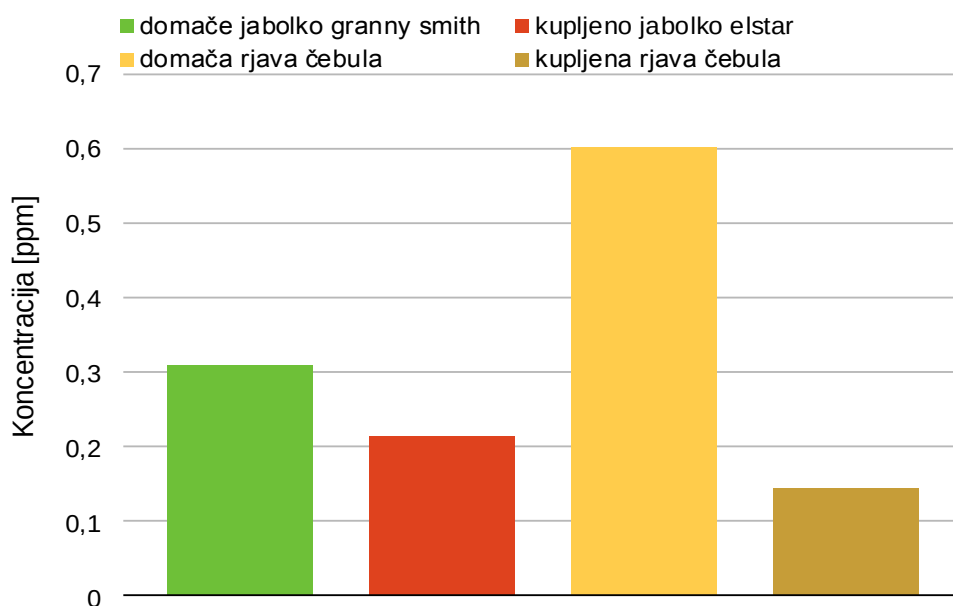


Diagram 3: Koncentracija vitamina K₁ v domačem in kupljenem sadju ter zelenjavi

Iz podatkov v preglednici 4 in prikaza na diagramu 3 je razvidno, da domača jabolka granny smith v primerjavi s kupljenimi jabolki elstar vsebujejo več vitamina K₁. Podobne rezultate opazimo tudi pri domači in kupljeni rjavi čebuli.

V zakup moramo vzeti, da sta jabolki, ki smo ju analizirali, različnih vrst in da imata drugačno vsebnost barvil. Še vedno lahko trdimo, da je v domačem jabolku, ki ni bilo izpostavljeno pesticidom, prisotnega več vitamin K₁ kot v kupljenem jabolku.

Nekateri pesticidi uničujejo mikroorganizme in s tem na neki način ovirajo ter uničujejo razvoj rastlin. Za to je krivo njihovo delovanje na dušikove bakterije (cianobakterije) v zemlji, ki pretrgajo trojno vez med dvema atomoma dušika in jih nato uporabijo za sintezo nitritov, nitratov in aminov (5). Prav te bakterije so pomembne za razvoj višjih rastlin, kot so v našem primeru jablane, plod katerih so jabolka. Vpliv prisotnosti pesticidov v jabolkih se kaže v manjši koncentraciji vitamina K₁ v kupljenih plodovih, če jih primerjamo z domačimi.

Še očitnejše razlike v koncentracijah vitamina K₁ lahko opazimo pri primerjavi domače in kupljene čebule. Podzemni deli so neposredno izpostavljeni pesticidom v zemlji. Uničenje mikroorganizmov v zemlji se pri rastlinah kaže v manjši zastopanosti kloroplastov, ki imajo sposobnost prevajanja v amiloplaste, bogate z rezervno hrano – škrob. Čebula, izpostavljena

pesticidom, ni sposobna sintetizirati toliko kloroplastov, kot jih je domača čebula. To pojasni dvakrat večjo koncentracijo vitamina K₁ v domači rjavi čebuli.

Uporaba pesticidov pa omogoča rastlini večjo zaščito pred zunanjimi vplivi žuželk in drugimi zajedavci. Organizem tako ni primoran pospešiti sinteze kloroplastov, v katerih nastaja glukoza in je vitamin K₁. Glukoza je sestavni del celičnega dihanja, ki je pomembno za sintezo ATP – molekule, kjer se shranjuje energija. Ta energija se porablja za vse celične procese, ki vključujejo tudi obrambo organizma. S tem ko je rastlina zaščitena s pesticidi, ni potrebe po dodatni sintezi snovi, saj ne potrebuje dodatne obrambe pred zunanjimi vplivi, ker ji jo dajejo že pesticidi. V zunanji zaščiti, prisotnosti pesticidov, se kaže koncentracija vitamina K₁. Domača čebula, ki med rastjo ni bila izpostavljena pesticidom, vsebuje veliko večjo koncentracijo kot tista, ki smo jo kupili v trgovini.

Hipotezo 2 potrjujemo. Če sta bilo sadje ali zelenjava med svojim razvojem izpostavljena pesticidom, se je koncentracija vitamina K₁ v njem zmanjšala.

4.3 Odvisnost koncentracije vitamina K₁ glede na pigment v sadju

Preglednica 5: Koncentracija vitamina K₁ glede na pigment v sadju

Živilo	Koncentracija vitamina K ₁ [ppm]
jabolko granny smith (domače)	0,309
jabolko elstar (kupljeno)	0,215

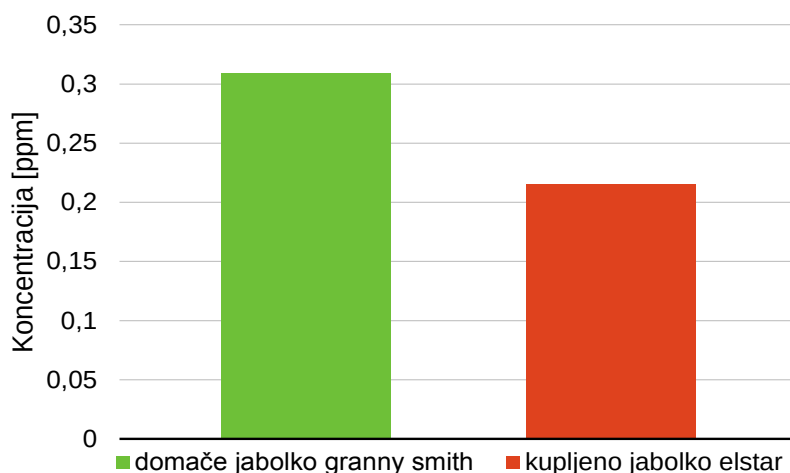


Diagram 4: Koncentracija vitamina K₁ glede na pigment v sadju

Pri primerjavi jabolk vrst granny smith in elstar moramo upoštevati različno prisotnost pigmenta, ki jih plodovi vsebujejo. Domača jabolka granny smith so zelene barve, kar nakazuje prisotnost klorofila v večini ovoja. Na drugačen pigment naletimo pri kupljenih jabolkih elstar, za katere je glavni pigment v olupku antocianidinskega tipa. Rdeči pigment deluje kot pomožen fotosintetski pigment klorofilu, ki pa je v večinskem delu prisoten pri jabolkih granny smith, v jabolkih elstar ga je bistveno manj. Kot je bilo omenjeno že v teoretičnem delu, sta klorofil in vitamin K₁ povezana, natančneje v fotosistemu I (slika 3). Pri pregledu rezultatov ugotovimo, da vzorec zelenega jabolka granny smith vsebuje večjo koncentracijo vitamina K₁ kot vzorec rdečega jabolka elstar. Glavni razlog za te rezultate je klorofil, ki ga je v granny smith veliko več, zato sta klorofil in vitamin K₁ v premem sorazmerju.

Ugotovitev lahko potrdimo tudi s podatki iz preglednice 6 (priloga 2), ki podajajo koncentracijo vitamina K₁ v živilih z različnimi barvili oz. fotosintetskimi pigmenti. Če primerjamo zgornja tri živila (blitva, ohrovt, špinača) s spodnjima dvema (paradižnik, jagode), jasno vidimo, da je koncentracija vitamina K₁ veliko večja pri rastlinah, ki so listnate oz. so zelene in imajo veliko kloroplastov ter posledično klorofila. Jagode se v koncentraciji vitamina K₁ razlikujejo od blitve za triinosemdesetkrat, kar potrjuje zgornjo ugotovitev.

Preglednica 6: Podatki o koncentraciji vitamina K₁ v živilih z različnimi pigmenti

Živilo	Koncentracija vitamina K ₁ [ppm]
blitva	8,30
ohrovt	8,17
špinača	4,00
paradižnik	0,25
jagode	0,10

Hipotezo 3 potrujemo. Rastline, ki vsebujejo več klorofila, torej so po videzu bolj zelene, vsebujejo tudi več vitamina K₁.

4.4 Odvisnost koncentracije vitamina K₁ glede na toplotno obdelavo sadja

Preglednica 7: Koncentracija vitamina K₁ glede na toplotno obdelavo sadja

Živilo	Koncentracija vitamina K ₁ [ppm]
jabolko granny smith (surovo)	0,309
jabolko granny smith (kuhano)	0,174

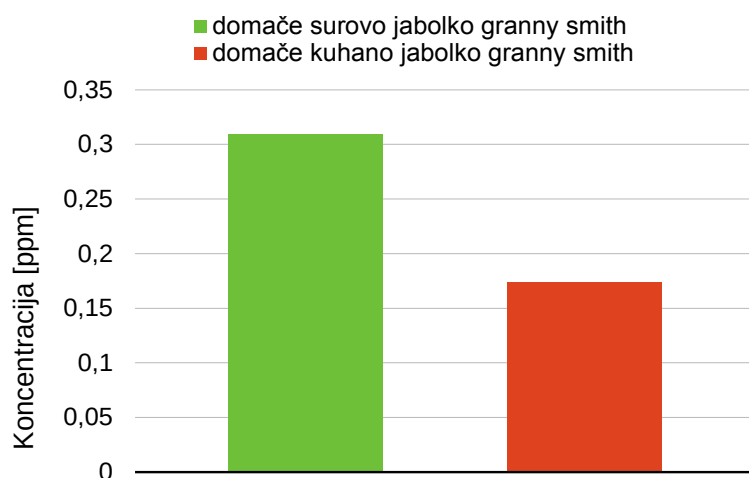


Diagram 5: Koncentracija vitamina K₁ glede na toplotno obdelavo sadja

Iz podatkov v preglednici 7 in prikaza na diagramu 5 je razvidno, da ima manjšo koncentracijo vitamina K₁ jabolko, ki je bilo pred ekstrakcijo toplotno obdelano. Če natančneje primerjamo, vidimo, da je vsebnost vitamina K₁ pri surovem jabolku večja za skoraj polovico od kuhanega jabolka granny smith.

V nasprotju z našimi rezultati pa v literaturi naletimo na drugačne podatke. Toplotno obdelanim živilom se koncentracija vitamina K₁ poveča, to je razvidno tudi iz preglednice 8 (priloga 2).

Preglednica 8: Literaturni podatki koncentracije vitamina K₁ v surovem in kuhanem živilu

Živilo	Koncentracija vitamin K ₁ v surovem živilu [ppm]	Koncentracija vitamin K ₁ v kuhanem živilu [ppm]
koriander	3,10	15,10
peteršilj	5,40	9,00

Do različnih rezultatov je mogoče lahko prišlo, ker smo vzorec premalo segrevali. Morda 5-minutno segrevanje na 80 °C ni bilo dovolj za vzorec in zato nismo dobili enakih rezultatov, kot jih navaja literatura.

V skladu z rezultati in literaturo moramo hipotezo 4 ovreči. Pri toplotni obdelavi sta pomembna temperatura in čas toplotne obdelave živila.

5 Zaključek

Vitamin K₁ je pomemben za človeški organizem. Sodeluje pri koagulaciji krvi in jo uravnava ter je pomemben tudi v procesu mineralizacije kosti.

V nalogi smo z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo, ki je potekala na reverzni fazi (HPLC-RP), in z UV-detekcijo določali vsebnost vitamin K₁ v sadju in zelenjavi. Prvo hipotezo smo delno potrdili. Domača rjava čebula (raste neposredno v zemlji) ima večjo koncentracijo vitamina K₁ kot domače jabolko granny smith (plod). Kupljena rjava čebula pa ima manjšo koncentracijo vitamina K₁ kot kupljeno jabolko elstar. Ugotovili smo, da moramo upoštevati tudi druge dejavnike, ki lahko vplivajo na koncentracijo vitamina K₁ v sadju in zelenjavi.

HPLC-RP z UV-detekcijo smo uporabili tudi za določanje koncentracije vitamina K₁ glede na prisotnost pesticidov v sadju in zelenjavi. Ugotovili smo, da če sta bila sadje ali zelenjava med svojim razvojem izpostavljena pesticidom, se je koncentracija vitamina K₁ v njiju zmanjšala. Drugo hipotezo smo s tem potrdili.

Zopet smo uporabili isto metodo določevanja koncentracije vitamina K₁ glede na pigment v sadju. Tretjo hipotezo potrjujemo. Rastline, ki vsebujejo več klorofila, torej so po videzu bolj zelene, vsebujejo tudi več vitamina K₁.

Koncentracijo vitamina K₁ glede na toplotno obdelavo sadja smo tudi določali z zgoraj omenjeno metodo. Ugotovili smo, da ima pred ekstrakcijo toplotno obdelano jabolko manjšo koncentracijo vitamina K₁ kot pa surovo jabolko iste vrste. V nasprotju s svojimi rezultati pa smo v literaturi naleteli na drugačne podatke, zato je treba hipotezo štiri ovreči. Sklepamo lahko, da sta pri toplotni obdelavi pomembna temperatura in čas toplotne obdelave živila.

Raziskovalno delo bi v prihodnje lahko nadgradili še z večjim izborom sadja in zelenjave, ki bi jima določili koncentracijo vitamina K₁, in morda preverili še vpliv zamrzovanja na vsebnost vitamina K₁ v sadju in zelenjavi. Z objavo rezultatov bi lahko bili v pomoč bolnikom, ki morajo jemati antikoagulate, da bi si lažje sestavili jedilnik in s tem poskrbeli za kakovostnejše življenje.

6 Viri in literatura

1. Mathieu, G. (1998). *Ni zdravja brez vitaminov*. Ljubljana: Tomark d.o.o.
2. Wikipedia, *Vitamin K*, (prebrano 25. 2. 2015). Dostopno na naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_K
3. Pulido, P. idr. (2012). *New Insights into Plant Isoprenoid Metabolism*, (prebrano 1. 3. 2015). Dostopno na naslovu: [http://www.cell.com/molecular-plant/abstract/S1674-2052\(14\)60062-9](http://www.cell.com/molecular-plant/abstract/S1674-2052(14)60062-9)
4. Hastings, G. idr. (2008). *Time-Resolved FTIR Difference Spectroscopy in Combination with Specific Isotope Labeling for the Study of A1, the Secondary Electron Acceptor in Photosystem 1*, (prebrano 1. 3. 2015). Dostopno na naslovu: [http://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495\(08\)70093-6](http://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495(08)70093-6)
5. Komat, A. (1995). *Pesticidi, ubijalci življenja*. Ljubljana: Založba Tangram
6. Jančar, J. (2009). *Osnove patologije*. Radovljica: Didakta d.o.o.
7. Barovič, V. (1999). *Patologija, patološka fiziologija in osnove interne medicine*. Ljubljana: DZS d.d.
8. Pivk, B. (2003). *Laboratorijska hematologija*. Velike Lašče: Elanda
9. Wikipedia, *Warfarin*, (prebrano 21. 2. 2015). Dostopno na naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Warfarin>
10. Pucer, M. (ur.) (2008). *Človek - Velika ilustrirana enciklopedija*. Ljubljana: Založba Mladinska knjiga
11. Wikipedia, *Osteocalcin*, (prebrano 22. 2. 2015). Dostopno na naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Osteocalcin>
12. Prosen, H. idr. (2014). *Praktikum iz analize kemije*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
13. Anderluh, G. idr. (2009). *Eksperimentalne metode v biokemiji*. Ljubljana: Študentska založba

SLIKE:

14. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1e/Vitamin_K1.png (Google, 10. 3. 2015)
15. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8e/Vitamin_K_structures.jpg (Google, 10. 3. 2105)
16. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/biology/imgbio/ps1ncyc.gif> (Google, 10. 3. 2015)
17. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d6/Warfarin2DACS.svg> (Google, 10. 3. 2015)
18. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Carboxylation_reaction_vitamin_K_ccycle.png (Google, 10. 3. 2015)
19. http://www.pall.com/images/Laboratory/06.1339_fig1.JPG (Google, 10. 3. 2015)

Priloge

Priloga 1: Poročilo o določitvi vitamina K1 v sadju in zelenjavi z tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV-detekcijo

Univerza v Ljubljani

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo



Univerzitetni študijski program Kemija

Izbirni sklop analizna in anorganska kemija

Mentor: prof. dr. Helena Prosen

Gradivo predstavljeno v tem delu je avtorska lastnina, oziroma last navedenih virov, iz katerih je bilo povzeto.

DOLOČITEV VITAMINA K₁ V SADJU IN ZELENJAVI Z TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI Z UV DETEKCIJO

Stefan Ognjanović

Mentor: prof. dr. Helena Prosen

UVOD

Vitamin K1 (filokinon) je v maščobah topni vitamin, v telesu shranjen v maščobnih tkivih in jetrih, ki je pomemben za posttranslacijske modifikacije nekaterih proteinov, najboljše znan po vlogi, ki jo ima pri sintezi koagulacijskih proteinov. Črka K prihaja iz nemškega imena *Koagulationsvitamin* (1).

Dnevne potrebe po vitaminu K so majhne (2 µg novorojenčki – 120 µg odrasli) zato le redko pride do pomanjkanja pri odraslih (posledica nekontrolirano krvavenje), pogostejše pa pri dojenčkih, saj materino mleko ne vsebuje znatnih količin vitamina K (2).

Ker je spojina topna v nepolarnih topilih (3) in absorbira UV svetlobo (4), sem se odločil za uporabo RP-HPLC z UV detekcijo pri 254 nm.

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

OPTIMIZACIJA METODE

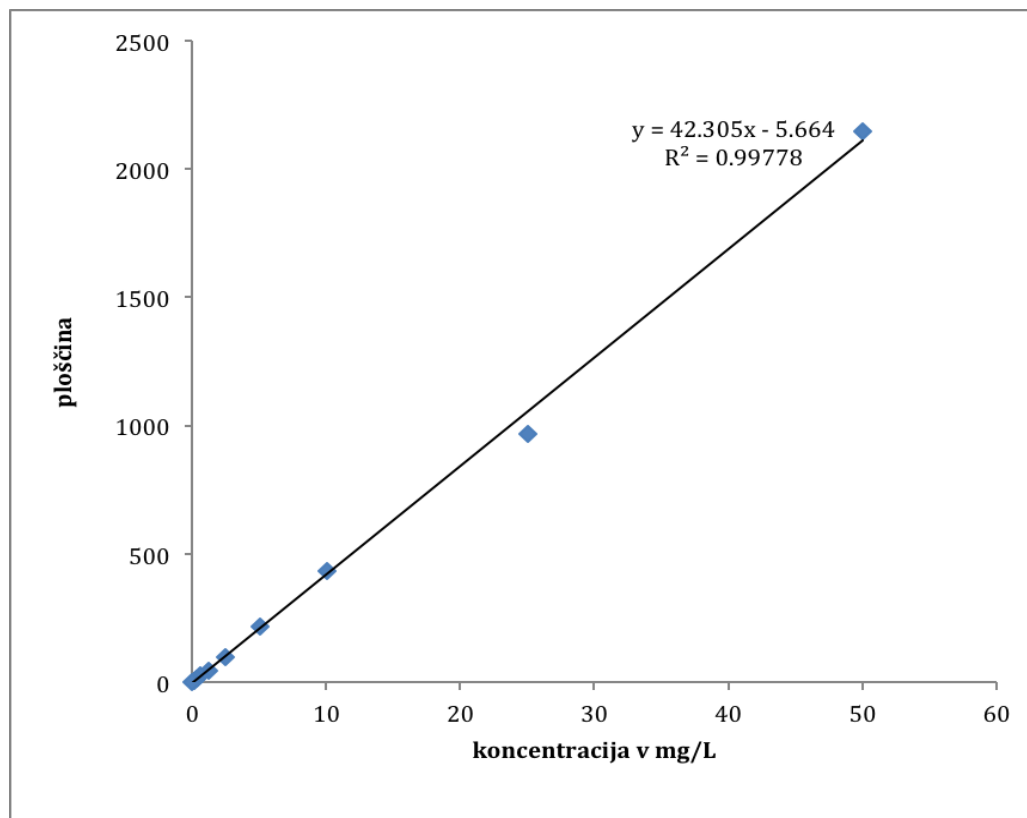
Kot že prej omenjeno, sem za določitev koncentracij vitamina K1 uporabil visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo, ki je potekala na reverzni fazi (kolona: Chromosil-eternity-5-C18, 100 x 4,6 mm, velikost delcev 5µm) z UV detekcijo pri 254 nm (HPLC sistem z dvema črpalkama, ročno injiciranje in UV-vis detekcija). Mobilna faza je bila mešanica acetonitrila in metanola, katere sestava se je gradientno spreminjala:

	acetonitril	metanol
$t=0$	50%	50%
$t=15$ min	70%	30%

Čas merjenja je bil 15 min, pretok je bil ves čas 0,7 mL/min.

Standardni vzorec sem napravil iz čistega standarda, ki je rumena, zelo viskozna tekočina. Natehtal sem maso 0,0232g in jo poskušal raztopiti v 25 mL metanola (topnost vitamina K1 v metanolu: 11000 mg/L, $T=22^{\circ}\text{C}$ (3)), vendar se standard ni popolnoma raztopil, zato sem vse skupaj prelil v 50 mL bučko, dodal 20 mL etanola in dopolnil z metanolom. Končna raztopina je imela koncentracijo 464 mg/L. Ker je vitamin K1 na svetlobi neobstoje, sem bučko s standardno raztopino zaščitil z alufolijo (v treh dneh je padla koncentracija kontrolne raztopine za 30,3 %).

Iz standardne raztopine sem pripravil 9 raztopin z koncentracijami 50-0,125 mg/L (pod 0,125 mg/L detekcija ni bila izvedljiva), katere sem analiziral s HPLC po trikrat (retencijski čas 8,17 min, $\lambda=254$ nm) in povprečje določitev sem uporabil za izris kalibracijske krivulje.



Slika 1 Umeritvena krivulja za vitamin K1.

Po vzoru nekaterih predhodnih raziskav (5,6) sem želel izolirati in skoncentrirati vitamin K1 iz vzorcev s pomočjo ekstrakcije na trdno fazo (SPE). Tako sem najprej poskusil na že uporabljeni C18 kolonici (Supelco, 1 g). Kolonico sem najprej spral s 3 mL metanola in še s 3 mL deionizirane (DI) vode, za tem sem prečrpal skozi kolono 25 mL raztopine vit. K1 (50 mg/L), elucijo sem izvedel s 5 mL metanola, celoten postopek sem ponovil še dvakrat. Izkoristek ekstarakcije $\eta=7,96\%$.

Po začetnem neuspehu sem poskusil ekstrakcijo še na kolonicah z drugimi sorbenti z malo spremenjenim postopkom: spiranje s 4 mL metanola in 4 mL DI vode, prečrpavanje 50 mL raztopine (25 mg/L) in elucija z 10 mL metanola. Novi rezultati prav tako niso bili optimalni:

- Supelco Supelclean LC18 (1 g): $\eta=29,6\%$
- Supelco Supelclean Envi-carb 1 mL: $\eta=1,6\%$
- J.T. Baker C18 polar plus: $1,8\%$
- Discovery DSC-PH: $\eta=2,4\%$
- Supelco Supelclean LC8 (0,5 g): $\eta=4\%$
- AccuBond SPE ODS-C18 (200 mg): $\eta=6,5\%$
- Discovery DSC-18 LT: $\eta=10,3\%$

V naslednjem koraku sem preizkusil še elucijo z manj polarnimi topili: najprej sem poskusil elucijo na Supelco Supelclean LC-18 kolonici z 10 mL etil acetata, ker pa bi mi s tem topilom imel težave pri mešanju z mobilno fazo, sem topilo najprej uparil in potem preostanek ponovno raztopil v 5 mL metanola pred injiciranjem v HPLC. Izkoristek $17,4\%$. Celoten postopek sem ponovil še s heksanom: $\eta=11\%$.

Po neuspehih z ekstrakcijo na trdno fazo sem poskusil še z ekstrakcijo tekoče-tekoče: 10 mL vodne raztopine vitamina K1 ($c=1 \text{ mg/L}$) sem v 100 mL liju ločniku ekstrahiralo trikrat s 4 mL heksana, heksan sem uparil in preostanek raztopil v 1 mL metanola ($c(\text{teor})=10 \text{ mg/L}$) pred injiciranjem v HPLC. Izkoristek je bil 48,9 %.

Celoten postopek ekstrakcije tekoče-tekoče sem ponovil še iz metanolne raztopine vitamina K1 in dobil izkoristek, s katerim sem bil zadovoljen ($\eta=76,8 \%$).

EKSTRAKCIJA IZ SADJA IN ZELENJAVE

Vitamin K1 sem določeval z metodo standardnega dodatka v domačem brstičnem ohrovtu, v domači in kupljeni čebuli ter v kupljenih, domačih in kuhanih jabolkih (glede na nekatere nepreverjene vire kuhana jabolka vsebujejo več vitamina K).

Postopek je bil za vse vzorce približno enak. Najprej sem vzorec fino nasekljal z nožem in potem dodatno homogeniziral (Gorenje – hand grinder MPE 400 EA). 5 g homogene pulpe sem suspendiral v 20 mL metanola (pri čebuli sem suspendiral 10 g v 40 mL in pri jabolku 15 g pulpe v 40 mL metanola) in suspenzijo postavil v ultrazvočno kopel, po 15 min sem jo filtriral in 10 mL filtrata ekstrahiralo trikrat s 4 mL heksana v liju ločniku. Heksansko fazo sem nato uparil in preostanek ponovno raztopil v 4 mL metanola (oz. v 2 mL metanola pri čebuli in jabolku). Vsak ekstrakt sem analiziral trikrat. Med analizo sem pripravil metanolno raztopino vitamina K1 za standardni dodatek (10 mg/L), ki sem ga dodal v enakem volumnu, kot sem prej raztopil suhi preostanek, in ekstrakt s standardnim dodatkom še trikrat analiziral.

REZULTATI

Za določitev koncentracij vit. K1 v vzorcih sem uporabljal metodo standardnega dodatka (po tri določitve ekstrakta samega vzorca in ekstrakta vzorca s standardom, volumen standarda je bil enak volumnu ekstrakta). Koncentracija v ekstraktu:

$$c(x) = \frac{c(st)}{2 \frac{A(skupni)}{A(x)} - 1}$$

Izračun koncentracije v vzorcu:

- Po sušenju sem ekstrakt raztopil v 2 mL MeOH, zato pomnožim z 0,002
- Delim z izkoristkom (0,768)
- Pomnožim z 2 (ker sem ekstrahiralo iz polovičnega volumna suspenzije pulpe v MeOH)
- Delim z maso vzorca

Tabela 1: Koncentracija vitamina K1 v izbranih vzorcih v ppm

	brstični ohrovt	domača čebula	avstrijska čebula	domača jabolka	kupljena jabolka	kuhana jabolka
koncentracija /ppm	0,871	0,602	0,144	0,309	0,215	0,174
RSD	0,166	0,091	0,074	0,085	0,008	0,009

V primerjavi z internetnim virom (7) so rezultati za koncentracijo vitamina K v zelenjavi malo nižji (še posebej v primeru kupljene čebule avstrijskega porekla). Če primerjam jabolka z drugim virom (8), sem pa dobil zelo podobne rezultate in tudi po pričakovanju manjše vsebnosti v kuhanih jabolkih.

Viri in literatura

1. University of Maryland Medical Center.; 2013 [cited 2014 Feb 20. Available from: [HYPERLINK "http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/vitamin-k"](http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/vitamin-k)
<http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/vitamin-k>.
2. WebMD.; 2013 [cited 2014 Jan. Available from: [HYPERLINK "http://www.webmd.com/vitamins-and-supplements/lifestyle-guide-11/supplement-guide-vitamin-k"](http://www.webmd.com/vitamins-and-supplements/lifestyle-guide-11/supplement-guide-vitamin-k)
<http://www.webmd.com/vitamins-and-supplements/lifestyle-guide-11/supplement-guide-vitamin-k>.
3. Products SCoC. Opinion on Vitamin K1 Phytonadione (INCI name). European Commission, Health and Consumer Protection; 2007.
4. Nakamura T. LipidBank.; 2007 [cited 2014 Jan. Available from: [HYPERLINK "http://lipidbank.jp/cgi-bin/detail.cgi?id=VVK0008"](http://lipidbank.jp/cgi-bin/detail.cgi?id=VVK0008)
<http://lipidbank.jp/cgi-bin/detail.cgi?id=VVK0008>.
5. Booth SL, Davidson KW, Sadowski JA. Evaluation of an HPLC Method for the Determination of Phylloquinone (Vitamin K1) in Various Food Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994; 42: 295-300.
6. Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Papadoyannis IN. Development of validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*. 2004; 805: 289-296.
7. weight chart.[cited 2014 Feb 20. Available from: [HYPERLINK "http://www.weightchart.com/nutrition/food-nutrient-highest-lowest.aspx?nn=430&h=True"](http://www.weightchart.com/nutrition/food-nutrient-highest-lowest.aspx?nn=430&h=True)
<http://www.weightchart.com/nutrition/food-nutrient-highest-lowest.aspx?nn=430&h=True>.
8. Vitamin k content of common foods. [cited 2014 Feb 20. Available from: [HYPERLINK "http://www.med.unc.edu/im/files/patient-education-handouts/nutrition-and-diet-files/Vitamin%20K%20%20Content%20of%20Common%20Foods.pdf"](http://www.med.unc.edu/im/files/patient-education-handouts/nutrition-and-diet-files/Vitamin%20K%20%20Content%20of%20Common%20Foods.pdf)
<http://www.med.unc.edu/im/files/patient-education-handouts/nutrition-and-diet-files/Vitamin%20K%20%20Content%20of%20Common%20Foods.pdf>.

Priloga 2: Navodila, ki jih dobi bolnik v antikoagulacijski ambulanti

PREHRANA IN ANTIKOAGULANTNA TERAPIJA

Hrana bogata z **vitaminom K oslabi učinek antikoagulantne terapije.**

Ne spreminjajte prehrabnih navad takrat, ko je gostota krvi (antikoagulantna terapija) stabilno urejena. V kolikor načrtujete dieto, nas je potrebno obvestiti.

Uravnotežena prehrana z vnosom določene količine vitamina K, je nujno potrebna, zato se priporoča nadzorovan **vnos vitamina K v količini od 70 do 140 mikrogramov dnevno.**

Urejenost terapije najbolj motijo nihanja pri vnosu vitamina K.

Odsvetujemo uživanje jetrc, krvavic.

Izogibajte se uživanju alkohola. Večja količina popita naenkrat, zmanjša metabolizem zdravila in s tem poveča protrombinski čas-INR.

Kronično vsakodnevno pitje alkohola pa pospeši metabolizem varfarina in s tem zniža protrombinski čas-INR. Tabela prikazuje količino vitamina K v mikrogramih v 100 gramih živil in začimb **od najvišje do najnižje vrednosti.**

Koriander kuhan	1510
Zeleni čaj	1428
Morske alge – vijolične	1385
Peteršilj kuhan	900
Meta listi, kuhani	860
Blitva	830
Ohrovt	817
Repa	650
Peteršilj surov	540
Koleraba, zeleni deli	440
Brstični ohrovt, kuhani	438
Špinača	400
Kumara, samo lupina	360
Krizantema, cvet surov	350
Koriander surov	310
Brokoli kuhan	270
Črni čaj	262
Vodna kreša	250
Endivija	231
Meta listi, surovi	230
Spomladanska solata	210
Spomladanska čebula	207
Brokoli surov	205
Jetra (sv., gov., pišč.)	100
Paradižnik	25
Kivi	25
Leča	22
Artičoka	14
Zelena	12
Jagode	10
Kava	10