

# Razvoj i validacija metode za određivanje fosfolipida u sojinom ulju

---

Rogulj, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:390499>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Ivana Rogulj  
652/PI

**RAZVOJ I VALIDACIJA METODE  
ZA ODREĐIVANJE FOSFOLIPIDA  
U SOJINOM ULJU**

Diplomski rad je izrađen u Kabinetu za tehnološko projektiranje na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Sandre Balbino, izv. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sandri Balbino koja mi je svojim znanstvenim i stručnim savjetima pomogla u izradi ovog diplomskog rada.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, **Neni i Vladi**, koji su mi kroz sve godine školovanja pružali neizmjernu ljubav, podršku i razumijevanje.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Kabinet za tehnološko projektiranje

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

## RAZVOJ I VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE FOSFOLIPIDA U SOJINOM ULJU

*Ivana Rogulj 652/PI*

**Sažetak:** U radu je proveden razvoj i validacija HPLC metode za određivanje fosfolipida u sojinom ulju pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) s PDA detektorom. Metodom je uspješno detektirano pet fosfolipida prisutnih u sojinom ulju te je provedena njihova kalibracija i validacija. Koeficijenti korelacije kalibracijskih pravaca u ispitivanom rasponu za sve spojeve bili su 0,999 ili viši, a svi parametri validacije su zadovoljeni. Standardnim metodama određen je udio ulja i vode u sjemenu soje. Kako bi se provjerila efikasnost razvijene analitičke metode i usporedili različiti uvjeti ekstrakcije lecitina iz soje provedene su ekstrakcije lipidne frakcije sjemena soje s ili bez primjene povišene temperature (50 °C) te s ili bez primjene ultrazvuka. Ekstrakcija pod utjecajem ultrazvuka pozitivno utječe na prinos ulja, a time i količinu fosfolipida. S druge strane, temperatura nema pozitivan utjecaj jer pri povišenoj temperaturi dolazi do manjeg prinosa ulja kao i gubitka bioaktivnih komponenti među kojima su i fosfolipidi.

**Ključne riječi:** *fosfolipidi, HPLC analiza, razvoj i validacija metode, sojino ulje, ekstrakcija*

**Rad sadrži:** 45 stranica, 12 slika, 9 tablica, 69 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv.prof.dr.sc. *Dubravka Škevin*
2. Izv.prof.dr.sc. *Sandra Balbino*
3. Izv.prof.dr.sc. *Ksenija Marković*
4. Prof.dr.sc. *Helga Medić* (zamjena)

**Datum obrane:** 26. rujna 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Technology Engineering  
Section for Technology Design

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF PHOSPHOLIPIDS IN SOYBEAN OIL

*Ivana Rogulj 652/PI*

**Abstract:** In this research HPLC method for determination phospholipids in soybean oil by using HPLC with PDA detector has been developed and validated. Five phospholipids in soybean oil have been detected using this method and calibration and validation have been made. Coefficients of correlation of calibration curves were 0,999 or higher, and all parameters of validation have been met. Oil and water content in soy was determined by using standard methods. In order to evaluate the efficiency of developed analytical method and to compare different lecithin extraction conditions, the extractions of soybean lipid fraction with or without the increased temperature (50 °C) and ultrasound treatment have been performed. Ultrasound extraction has a positive effect on yield of oil and on amount of phospholipids. On the other hand, temperature does not have positive effect because higher temperature decreases yield of oil and it causes loss of bioactive compounds including phospholipids.

**Keywords:** *phospholipids, HPLC analysis, method development and validation, soybean oil, extraction*

**Thesis contains:** 45 pages, 12 figures, 9 tables, 69 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Ph.D. *Sandra Balbino*, Associate Professor

#### **Reviewers:**

1. Ph.D. *Dubravka Škevin*, Associate Professor
2. Ph.D. *Sandra Balbino*, Associate Professor
3. Ph.D. *Ksenija Marković*, Associate Professor
4. Ph.D. *Helga Medić*, Full Professor (substitute)

**Theses defended:** 26 September 2016

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                    | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>                          | <b>2</b>  |
| 2.1. LECITIN.....                                      | 2         |
| 2.1.1. Fosfolipidi .....                               | 3         |
| 2.2. PROIZVODNJA LECITINA .....                        | 4         |
| 2.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva lecitina .....      | 8         |
| 2.2.2. Komponente lecitina.....                        | 9         |
| 2.2.2.1. Funkcionalne osobine komponenti lecitina..... | 9         |
| 2.2.3. Primjena lecitina.....                          | 11        |
| 2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE FOSFOLIPIDA .....           | 12        |
| 2.4. RAZVOJ I VALIDACIJA METODE .....                  | 13        |
| 2.4.1. Parametri validacije .....                      | 14        |
| <b>3.EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>                      | <b>16</b> |
| 3.1. MATERIJAL .....                                   | 16        |
| 3.1.1 Biljno ulje i sjeme soje .....                   | 16        |
| 3.1.2.Standardi i reagensi .....                       | 16        |
| 3.1.3. Oprema .....                                    | 17        |
| 3.2. METODE RADA .....                                 | 18        |
| 3.2.1. Određivanje udjela ulja .....                   | 18        |
| 3.2.2. Određivanje udjela vode.....                    | 19        |
| 3.2.3. Ekstrakcija ulja iz soje.....                   | 20        |
| 3.2.4. Priprema uzoraka i standardnih otopina .....    | 20        |
| 3.2.5. HPLC analiza .....                              | 21        |
| 3.2.6. Kvantifikacija .....                            | 22        |
| 3.2.7. Validacija .....                                | 22        |
| 3.2.8. Statistička obrada .....                        | 23        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>                    | <b>24</b> |
| 4.1. KALIBRACIJA .....                                 | 27        |
| 4.2. VALIDACIJA .....                                  | 31        |
| 4.3. ODREĐIVANJE UDJELA ULJA I VODE U SOJI.....        | 33        |
| 4.4. EKSTRAKCIJA .....                                 | 34        |
| <b>5. ZAKLJUČCI .....</b>                              | <b>39</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b>                              | <b>40</b> |

# 1.UVOD

Priroda je bila vrlo inventivna kada je formirala polarne lipide koji čine matriks bioloških membrana. Ti polarni lipidi – fosfolipidi su neophodni za život, a zbog svojih fizikalno-kemijskih osobina koriste se u raznim primjenama. Zbog amfipatskog karaktera sposobni su formirati dvosloj u vodenom okruženju. Budući da ih je teško izolirati kao čisti produkt, dobivaju se kao lecitin – smjesa fosfolipida, triacilglicerola i drugih spojeva.

Upotreba lecitina seže u daleku prošlost. Pronađeno je da su još stari Grci započeli njegovu upotrebu kada su osušeni žumanjak koristili za omekšavanje kože. U 19. stoljeću je po prvi put izoliran lecitin iz biljnog sjemena. Može se dobiti iz raznih ulja kao što su sojino, suncokretovo, repičino, palmينو, ulje kukuruznih klica i dr. Budući da sojino ulje sadrži najveći udio lecitina, sojin lecitin je najdostupniji.

Proučavanje lecitina (fosfolipida) je korisno zbog njegove nutritivne funkcije, tehnoloških svojstava te fiziološke uloge. Fosfolipidi su strukturne komponente organizma, djeluju na metabolizam masti, jetru, neurone i pamćenje. Najpoznatije tehnološko svojstvo lecitina je stabilizacija emulzija pa zato ima široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, kemijskoj i brojnim drugim industrijama. Baš zbog tog svojstva se razvila ideja za ovo znanstveno istraživanje.

Za određivanje fosfolipida upotrebljavane su razne analitičke metode. Sve one imaju pozitivne i negativne strane. Ipak, zbog svoje jednostavnosti, fleksibilnosti i troškova ulaganja, kao najbolja pokazala se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

Cilj ovog rada bio je razviti i provesti validaciju HPLC metode za određivanje pet fosfolipida koji su pronađeni u u sojinom ulju, pomoću kolone povezane online s HPLC sustavom s PDA detektorom.

Također, da bi se provjerila efikasnost razvijene analitičke metode i usporedili različiti uvjeti ekstrakcije lecitina iz soje provedene su ekstrakcije lipidne frakcije sjemena soje s ili bez primjene povišene temperature (50 °C) te s ili bez primjene ultrazvuka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LECITIN

Pod pojmom lecitin misli se na kompleksnu, prirodnu smjesu fosfolipida, triacilglicerola i drugih spojeva. Budući da fosfolipidi nisu dostupni kao čisti proizvod jer ih je kao takve teško izolirati i proučavati, uglavnom se dobivaju kao lecitin - međuprodukt u rafinaciji biljnih ulja, tijekom procesa degumiranja (Zufarov i sur., 2008). Takav lecitin sadrži oko 65% fosfolipida, 30% ostalih prirodnih lipida i male količine glikolipida.

Datum proizvodnje prvog komercijalnog lecitina je vjerojatno izgubljen negdje u antici. Još 1793. Fourcray je dokazao postojanje kompleksnih masnih kiselina. Nakon 19 godina, Vanquelin je izolirao masne sastojke sa sadržajem fosfora iz animalnog mozga, a 1846.-47. Gobley je izolirao smjesu fosfatida iz žumanjka kojeg je nazvao lecitin prema riječi „*lekithos*“ što na grčkom znači žumanjak. U svom istraživanju Gobley je pronašao da su stari Grci stoljećima koristili osušeni žumanjak da bi smanjili površinsku napetost masti i ulja dodanih za omekšavanje kože. Nakon toga, 1891. je po prvi put iz biljnog sjemena izoliran lecitin, točnije masne komponente koje sadrže fosfor. Danas je najdostupniji sojin lecitin (Slika 1), a prvi je proizveden iz taloga prešanog sojinog ulja u kasnim 1920-ima. Talog je bio sastavljen od fosfolipida, fitina, sterola, glicerida, ugljikohidrata, smola i vode. Bilo je potrebno procesirati taj „mulj“ kroz nekoliko ekstrakcija, isparavanja i ostalih koraka da bi se dobio dobar, stabilni lecitin, a cijena mu je bila vrlo visoka, čak i za današnje standarde (Szuhaj i List, 1985).



Slika 1. Soin lecitin (Anonymous 1, 2012)

Lecitin se može dobiti i iz drugih ulja kao što su suncokretovo, repičino, palmino, ulje kukuruznih klica i sl. Udio lecitina (fosfolipida) u tim uljima se razlikuje što se može vidjeti u tablici 1. Žumanjak jajeta je glavni izvor fosfolipida životinjskog podrijetla (Palacios i Wang, 2005). a izvori mogu biti i morske sirovine poput rakova ili nekih riba (Suzumura, 2005). Određivanje i kvantifikacija fosfolipida je bitna da bi se odredila efikasnost dobivanja fosfolipida iz biljnih ulja te da bi se odredila kvaliteta dobivenog lecitina. U tom slučaju bitno je ne samo znati količinu ukupnih fosfolipida, već i količinu različitih prisutnih tipova zato što je dobro znano da su funkcionalne osobine različitih fosfolipida različite (Nollet, 2000).

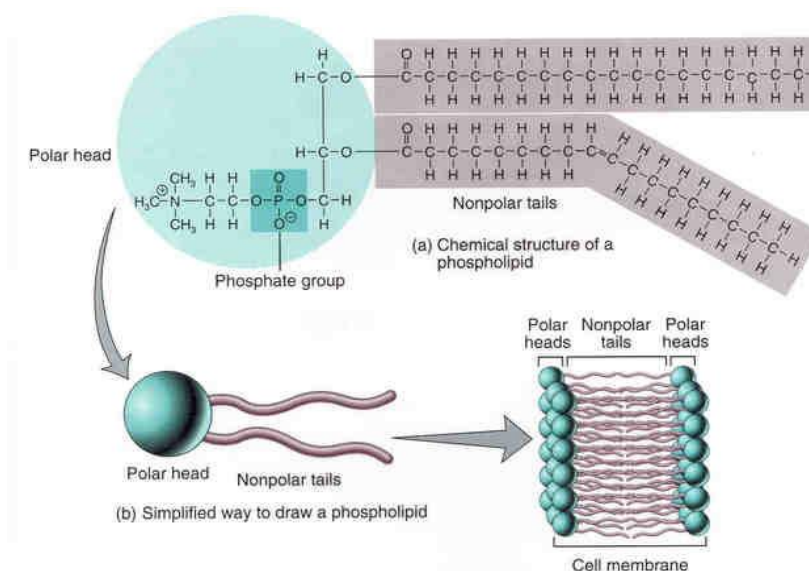
Tablica 1. Udio fosfolipida u uljima prema različitim autorima (Liu, 1997; Gunstone, 2006; Ahmad i sur., 2015; Galhardo i Dayton, 2012)

| Ulje         | Udio fosfolipida (%) |
|--------------|----------------------|
| Sojino       | 1-3                  |
| Repičino     | 0,5-2,3              |
| Suncokretovo | 0,7-0,9              |
| Palmino      | 0,1-0,2              |

### 2.1.1. Fosfolipidi

Fosfolipidi su ubikvitarni spojevi u prirodi. Univerzalan su sastojak u svim živim organizmima. Kao glavni sastojci staničnih membrana i aktivni sudionici u metaboličkim procesima, neophodni su za život. Fosfolipidi su amfipatske molekule što znači da imaju hidrofilnu glavu koja privlači molekule vode (glicerol s fosfatnom grupom) i hidrofobni rep koji ih odbija (lanci masnih kiselina). U vodenom okruženju sposobni su formirati dvosloj. U dvosloju su molekule orijentirane tako da su hidrofilne glave okrenute prema van, odnosno prema vodi, a hidrofobni repovi prema unutra (Slika 2). Spadaju u veliku skupinu lipida koji se dijele na glicerofosfolipide i sfingofosfolipide. Glicerofosfolipidi se sastoje od molekule glicerola gdje se na prve dvije hidroksilne grupe vežu dvije masne kiseline pri čemu se zasićena uglavnom veže na poziciju 1, a nezasićena na poziciju 2. Na treću hidroksilnu skupinu vezan je fosfat koji može biti esterificiran nekom organskom skupinom kao što je kolin, serin, etanolamin ili inozitol pa nastaju fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin i

fosfatidilinozitol. Kod sfingofosfolipida hidrofbni dio sadži ceramid, a hidrofilni organofosfatnu grupu (Dewettinck i sur., 2008). Najpoznatiji predstavnik sfingofosfolipida je sfingomijelin. Sfingomijelin je glavna komponenta lipida životinjskog podrijetla, ali nije prisutan u biljkama ni mikroorganizmima.



Slika 2. Struktura fosfolipida (Anonymous 2, 2016)

## 2.2. PROIZVODNJA LECITINA

Budući da se lecitin uglavnom dobiva iz sojinog ulja, ovaj postupak je opisan za sojin lecitin.

Soja, *Glycine max* Merrill, jedna je od najstarijih kultiviranih biljaka, uzgaja se preko 4000 godina i potječe iz istočne Azije (Slika 3). Spada u porodicu *Leguminosae* (lepirnjače), a zbog značajnog izvora ulja i bjelancevina uzgaja se sve češće. Postoji mnogo sorata soje koje se razlikuju po obliku zrna, boji, okusu i kemijskim svojstvima.



Slika 3. Soja, *Glycine max* Merrill (Anonymous 3, 2015)

Najveći dio sojinog sjemena koristi se za ishranu stoke, iako je sve veća njegova primjena u prehrambenoj industriji. Koristi se u kemijskoj industriji za proizvodnju sapuna, detergenata, boja, lakova i dr. Sve više se upotrebljava i u proizvodnji pesticida, kao i u pekarskoj, konditorskoj, tekstilnoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji (Vratarić i Sudarić, 2000).

Kvalitetom bjelančevina i visokim udjelom ulja nadomjestak je za meso, a u ljudskoj prehrani zadovoljava oko 30% potreba za bjelančevinama (Vratarić i Sudarić, 2000). Zbog visokog udjela proteina (35%) njen glavni proizvod je sačma.

### *Priprema sjemena i ekstrakcija*

Svi procesi prije i tijekom proizvodnje lecitina utječu na kvalitetu konačnog proizvoda. Najkvalitetniji lecitin dobiva se iz zrelog sjemena s minimalno pregorjelih i oštećenih zrna. Sjemenke oštećene mrazom i sjemenke podvrgnute duljem skladištenju rezultiraju smanjenim prinosima lecitina. Procesiranje nezrelih sjemenki rezultira visokim sadržajem klorofila, kojeg je teško ukloniti uobičajenim metodama izbjeljivanja. Količina nečistoća, kao što su željezo iz tla, egzogene tvari biljaka i biocidi, mora se smanjiti pažljivim čišćenjem i ljuštenjem prije procesiranja. Uklanjanje ovih nečistoća tijekom kasnijih stupnjeva procesiranja je teško. U SAD-u, najčešće korišteno otapalo za ekstrakciju je heksan, iako se može upotrebljavati i smjesa otapala heksan/etanol/voda. Heksan ekstrahira oko polovine ukupnih fosfolipida soje, ali proizvedeni lecitin sadrži male količine ugljikohidrata, gorke sastojke i boju. Kontrola uvjeta ekstrakcije je bitna kako bi se osiguralo minimalno stvaranje boje u lecitinu koja je u velikoj mjeri rezultat zagrijavanja ulja tijekom uklanjanja otapala (Szuhaj i List, 1985; Shurtleff i Aoyagy, 2016).

## *Filtracija*

Sirovo ulje iz kojeg se dobiva lecitin se obično prije degumiranja filtrira da bi se uklonili ostaci sjemenja. Suhi lecitin se isto može filtrirati, iako mnogo teže. Dobro provedena filtracija rezultira visoko klasificiranim lecitinom s malo ili bez rezidualnih tvari netopljivih u heksanu. Postoje dvije metode filtracije miscele. Prva koristi monofilamentni ili pamučni najlon rastegnut preko metalnih okvira kućišta koje ne propušta tekućinu i paru. Budući da se ne koristi filter, dobiveni lecitin je zamućen. Druga metoda koristi žičane filtere pa je lecitin manje zamućen. Ulje se zagrije na 82°C i doda se 0.1% filtracijskog sredstva, uz miješanje. Nakon toga slijedi degumiranje (Szuhać i List, 1985; Shurtleff i Aoyagy, 2016).

## *Degumiranje*

Prvi stvarni korak u proizvodnji lecitina je degumiranje. U sirovo ulje se dodaje voda koja hidratizira fosfolipide, i tako ih čini u netopljivima u ulju. Postoji šaržno i kontinuirano degumiranje. Kod šaržnog se 2% volumena vode dodaje u ulje zagrijano na 70°C i miješa 30-60 min. Kod kontinuiranog se sirovo ulje zagrijano na 80°C miješa s vodom u kontinuiranoj cijevnoj protočnoj miješalici, zadrži kratko vrijeme, i centrifugalno odvoji. (List i sur., 1981). Tvrdća vode za degumiranje je bitna stavka jer fosfatidiletanolamin i fosfatidna kiselina mogu biti flokulirane i inaktivirane visokom koncentracijom kalcijevih i magnezijevih iona (van Nieuwenhuyzen, 1981). Voda uklanja oko 90% fosfolipida prisutnih u sirovom ulju. Fosfolipidi zaostali u ulju, poznati kao ne-hidratibilni fosfolipidi su uglavnom kalcijeve i magnezijeve soli (Szuhać i List, 1985). Dodatak 0,2% 85%-tne fosfatne kiseline u ulje zagrijano na 70-90°C prije degumiranja dovodi do taloženja Ca i Mg kao netopljivih fosfata. Mogu se koristiti i kiseline kao oksalna, octena, citratna, nitrarna i druge. Tako dobiveni lecitin je tamniji nego lecitin degumiran vodom (Szuhać i List, 1985; Shurtleff i Aoyagy, 2016).

Istraživan je i utjecaj vremena, temperature, miješanja i količine vode na kvalitetu dobivenog lecitina (List i sur., 1981). Uočeno je da hidratacija nastupa jako brzo i vrlo malo koristi je dobiveno s vremenom hidratacije iznad 15 minuta. Temperatura ima mali utjecaj na uklanjanje fosfora, iako izgleda da je optimalna temperatura 70°C. Brzina miješanja nema uočeni učinak na uklanjanje fosfora, a optimalna količina vode je 2%.

### *Bijeljenje*

Boja sojinog lecitina nastaje zbog prisutnosti karotenoida, melanoidina i porfirina. Za bijeljenje se koristi 1,5-3,0% vodikovog peroksida (30%-tnog). Postoje 3 razreda lecitina s obzirom na bijeljenje: prirodni, bijeljeni i dvostruko bijeljeni. Bijeljeni se može dobiti bez upotrebe vodikovog peroksida, dok je za dvostruko bijeljeni neophodna njegova upotreba (Szuhaj i List, 1985).

### *Sušenje*

Nakon degumiranja i bijeljenja, slijedi sušenje. Neophodno ga je obaviti čim prije nakon degumiranja jer mikrobiološka aktivnost može nastupiti nakon samo nekoliko sati. Lecitin se suši do sadržaja vlage ispod 1% (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008). Zbog toplinske osjetljivosti lecitina, vrlo je bitna kontrola uvjeta sušenja. Nedugo nakon sušenja, lecitin bi trebao biti ohlađen na 55-60°C ili na 35-50°C ako se neće dalje procesirati.

### *Standardizacija i fluidizacija*

Standardizirani tekući lecitini uglavnom sadrže 62-64% netopivog u acetonu i imaju kiselinski broj 28-32 mg KOH/g. Da bi se dobile ove karakteristike, sojino ulje se miješa sa sirovim lecitinom. Za optimalnu konzistenciju, cilja se na AI od 63% i AV vrijednost 30. Preporučuje se vrijeme miješanja najmanje 2-4 h na 57-60°C. Viskoznost standardiziranog lecitina je 7500-1000 centipoaza na 25°C. Plastični lecitin uglavnom ima 65-68% netopljivog u acetonu. Ostala sredstva za modificiranje viskoznosti lecitina uključuju monovalentne i divalentne ione, fosfatnu kiselinu i acetatne anhidride (Szuhaj i List, 1985; Shurtleff i Aoyagy, 2016).

### *Skladištenje*

Kada se pohranjuje na 20-30°C u zatvorenim spremnicima, tekući lecitin se može čuvati godinama bez utjecaja na kvalitetu i funkcionalnost. (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008). Ovaj raspon temperature je posebno važan za bijeljeni lecitin. Zbog rezidualnog peroksida na višim temperaturama došlo bi do brzog povrata boje. Treba izbjegavati temperature zamrzavanja jer, iako ne utječu na funkcionalnost, može doći do fizičkog razdvajanja ulja i fosfolipida (Szuhaj i List, 1985).

### 2.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva lecitina

Prema fizikalno-kemijskim svojstvima razlikujemo više tipova lecitina. Postoje različite analitičke metode koje se koriste za određivanje i kontrolu kvalitete tijekom proizvodnje i upotrebe lecitina.

#### *Netopljivo u acetonu*

Općenito, proizvodi lecitina su definirani sastavom fosfolipida. Količina tvari netopljivih u acetonu (% AI) približno predstavlja te fosfolipide. Fosfolipidi su netopljivi u acetonu, dok su trigliceridi topljivi. U sirovom lecitinu, AI vrijednost je obično sinonim za aktivnost (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008). Oznaka netopljivo u acetonu je službena metoda American Oil Chemists' Society (AOCS) (Szuhaj i List, 1985).

#### *Kiselinski broj*

Kiselinski broj (AV) je titrabilna kiselost lecitina u mg KOH/g uzorka (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008). Kiselinski broj nekog proizvoda prikazuje kiselost koja potječe od fosfolipida, ali i onu od slobodnih masnih kiselina. On nije mjerilo za pH. Ako mu je vrijednost preko 36, može ukazivati na degradaciju lecitina zbog nepravilnog procesiranja ili nekvalitetne soje. Kiselinski broj ne bi trebalo miješati sa sastavom slobodnih masnih kiselina, pH-om ili mineralnim kiselinama (Szuhaj i List, 1985).

#### *Vlažnost*

Udio vode u lecitinu je obično manji od 1%. Posljedica toga je da lecitin ima vrlo nisku aktivnost vode te to pridonosi negativnom mikrobiološkom profilu hrane u kojoj je lecitin upotrebljen. Mnogi proizvodi s lecitinom su tako dulje sačuvani od narušavanja kvalitete.

Vlaga se određuje Karl Fisher-ovom titracijom. Može se odrediti i azeotropskom destilacijom toluena, no ta metoda je manje točna. Metode s vakuum peći nisu dobre za određivanje udjela vode jer degradiraju lecitin i daju netočne rezultate (Szuhaj i List, 1985).

#### *Netopivo u toluenu*

Količina tvari netopivih u toluenu (TI) je jedna od mjera čistoće lecitina. Uglavnom se sastoji od zaostalih vlakana, ali može biti i određeni materijal nastao tijekom procesiranja. Vrijednost TI u sirovom lecitinu ne bi smjela prijeći 0.3%, ali uglavnom ne prelazi 0.1%.

Količina tvari netopljivih u toluenu je nepoželjna za čistoću i upotrebu u određenim primjenama. U novije vrijeme, prisutnost ovih tvari ukazuje na loše postupke procesiranja (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008).

### *Boja*

Boja lecitina je bitna jedino za estetsku kvalitetu jer mnogi potrošači ne vole tamno obojene namirnice. Iako mnoge primjene zahtijevaju svijetlo obojene sastojke, jantarna boja lecitina zadovoljava većinu primjena. Jantarne nijanse boja lecitina se mjere na Gardnerovoj skali boja. Opseg boja koji obuhvaća lecitin na toj skali je 9-17. (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008).

### *Mikrobiološka kvaliteta*

Za prehrambenu i farmaceutsku industriju potreban je lecitin s niskom mikrobiološkom aktivnosti. Proizvodnja se treba provoditi u zatvorenoj opremi, u skladu sa standardima HACCP-a. Dodatak niske koncentracije, npr 35%-tnog vodikovog peroksida, može dodatno smanjiti ukupnu mikrobiološku aktivnost (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008).

## 2.2.2. Komponente lecitina

Najpoznatije komponente sojinog lecitina su: fosfatidilkolin (PC), fosfatidletanolamin (PE), fosfatidilinozitol (PI). Fosfatidna kiselina (PA) nastaje u prisutnosti fosfolipaze D koja konvertira PC u PA u biljnom lecitinu. Fosfatidilserin (PS), fosfatidilglicerol (PG) i lizofosfatidilkolin su pronađeni u malim količinama. Osim toga, postoje eter fosfolipidi kod kojih su jedna ili obje masne acilne grupe zamijenjene alifatskim ostatkom povezanim eter ili vinil-eter vezom (Nollet, 2000).

### *2.2.2.1. Funkcionalne osobine komponenti lecitina*

#### *Fosfatidletanolamin*

Fosfatidletanolamin, poznat i pod nazivom cefalin, izoliran je još 1884. iz mozga. Čini oko 45% ukupnih fosfolipida mozga. Prekursor je za sintezu anandamida (N-arahidonoiletanolamina) koji je ligand za kanbinoidne receptore u mozgu. Bitan je za srce, što

se vidi iz toga da njegova smanjena količina u srčanim miocitima uzrokuje oštećenja stanica nakon ishemije. Također, on je supstrat za enzim fosfoetanolamin N-metiltransferazu koji osigurava oko jednu trećinu fosfatidilkolina u jetri (Vance i Tasseva, 2012). Regulira i fuziju mitoze Golgijevih membrana (Pecheur i sur., 2002). Dva najpoznatija načina sinteze u stanicama sisavaca su Keneddy-ev put gdje se završna faza odvija na membrani endoplazmatskog retikuluma te dekarboksilacija fosfatidilserina koja se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija.

### *Fosfatidilkolin*

Fosfatidilkolin je jedan od najzastupljenijih razreda fosfolipida. Iako se termin fosfatidilkolin često koristi kao sinonim za lecitin, to su različiti spojevi. Naime, kolin je osnovni sastojak fosfatidilkolina koji je sastojak lecitina. Služi kao prekursor fosfatidne kiseline, fosfatidilserina, lizofosfatidilkolina i faktora koji aktivira trombocite. Neophodan za stvaranje acetilkolina u mozgu pa koristi se za liječenje i prevenciju bolesti kao što su gubitak pamćenja, Alzheimerova bolest, anksioznost, manično-depresivne poremećaji. Također se koristi za liječenje hepatitisa, ekcema, šećerne bolesti, problema cirkulacije, povišenog kolesterola i drugih.

### *Fosfatidilinozitol*

Fosfatidilinozitol je uključen u prijenos informacija u stanicama. Igra bitnu ulogu u provođenju normalnih psihičkih funkcija središnjeg živčanog sustava, posebno u regulaciji homeostaze kalcija. Sojini fosfolipidi su bogati fosfoinozitolom. Topljiv je u vodi, kloroformu i benzenu, slabo topljiv u metanolu, dietil i petrol eteru, netopljiv u acetonu i etanolu. Lako oksidira pri izlaganju zraku (Deng i sur., 2003).

### *Fosfatidilserin*

Fosfatidilserin poboljšava moždane funkcije i mentalnu oštrinu. Usporedbom PS iz biljnih ulja i goveđeg mozga uočava se razlika u sastavu masnih kiselina. PS iz biljnih ulja je bogat linolenskom i palmitinskom masnom kiselinom, dok je iz goveđeg mozga bogat stearinskom i oleinskom masnom kiselinom (Sakai i sur., 1996).

## *Fosfatidna kiselina*

Fosfatidna kiselina je najjednostavniji membranski fosfolipid i intermedijer za sintezu membranskih lipida i pohranu lipida. Njezin metabolizam zauzima ključnu ulogu u metabolizmu glicerolipida i membranskoj biogenezi. Uključena je u brojne stanične procese kao prijenos signala, sekrecija, pregradnja citoskeleta i sl.

### 2.2.3. Primjena lecitina

Iako se koriste u raznim industrijama nama je najzanimljivija prehrambena. Količina fosfolipida koja se nalazi u hrani je obično oko 0.1-0.2% od ukupnih masnoća u hrani. Iako su prirodna komponenta različitih prehrambenih proizvoda, dodaju se i kao funkcionalni sastojci (Nollet, 2000). Kao površinski aktivne tvari mogu imati tehnološku funkciju u svim vrstama emulzija i suspenzija, no njihova upotreba ovisi i o omjeru cijene i učinka u odnosu na druge emulgatore i površinski aktivne tvari (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008). Oni su emulgatori u proizvodnji margarina, majoneze, čokolade, sladoleda, pekarskih proizvoda, prerađene hrane od mesa i morskih plodova, antioksidansi kod proizvodnje biljnih ulja te u brojnim drugim slučajevima. Koriste se kao premazi za limenke, pakiranja juha, crijeva za kobasice. Fosfolipidi doprinose stabilnosti i kvaliteti jestivih ulja kroz njihova antioksidativna svojstva ili doprinose teksturi (Singleton, 1993). Odgovorni su za diskoloraciju ulja tijekom deodorizacije tako da je njihova determinacija neophodna za procjenu efikasnosti degumiranja (Mounts i Nash, 1990).

U posljednje vrijeme, oko 25% primjene neprehrambenih fosfolipida je u farmaceutskoj industriji, posebno primjena liposoma. Budući da tkivo mozga sadrži oko 25% fosfolipida, njihove metaboličke abnormalnosti mogu dovesti do bolesti kao što su rak, Alzheimerova bolest i neke druge. Visoke doze fosfolipida mogu učinkovito liječiti neurološke poremećaje i ostale bolesti nervnog sustava.

U kozmetici se koriste kod proizvodnje šampona, sapuna, pudera, krema za sunčanje, lakova za nokte i kosu. Ako se dodaju u detergente poboljšavanju snagu uklanjanja prljavštine.

Primjenjuju se i u proizvodnji hrane za životinje kao emulgatori, nadomjestak kolina i izvor esencijalnih masnih kiselina (Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008). U poljoprivredi se koriste za inhibiciju rasta praškaste plijesni na krastavcima, patlidžanima, zelenim paprikama i

jagodama. (Liu i Ma, 2011). Jedna od primjena je i u proizvodnji boja, tinte, fotografskih materijala, papira te ostalih industrijskih materijala.

### 2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE FOSFOLIPIDA

Prva od metoda koja se koristila za određivanje fosfolipida bila je tankoslojna kromatografija (TLC). U povijesti se naširoko koristila zbog svoje jednostavnosti i relativno niske cijene (Olsson, 1992) dok je u novije vrijeme zamjenjuju modernije metode. Upotrebom dvodimenzionalne TLC dobivala se dobra separacija. No, veliki problem je predstavljala kvantifikacija. U početku, kvantifikacija je većinom ostvarena determinacijom sadržaja fosfora koji je bio sastrugan s ploče (Christie, 1982). Kasnije se kao mnogo brža metoda pokazalo skeniranje TLC ploče nakon bojenja (Olsson, 1992). Upravo to korištenje sofisticiranih, kompjuterski upravljanih skenera je postalo odgovorno za činjenicu da se moderna TLC više ne može koristiti kao jeftinija alternativa za HPLC.

Kao bolja alternativa predlagana je i nuklearna magnetska rezonanca (P-NMR) jer zahtjeva minimalnu količinu prethodno obrađenog uzorka (Meneses i sur, 1993). Veliko ulaganje i potreba za visoko kvalificiranim operatorima uzrokuju rjeđu upotrebu P-NMR tehnike nego *quality control* metoda. Kakogod, P-NMR je idealno prilagođena kako bi potvrdila sastav standardnih otopina čija kvaliteta uvelike određuje točnost TLC i HPLC rezultata.

Jedna od metoda je i micelarno elektrokinetska kapilarna elektroforeza (MEKC) gdje su otopljene tvari separirane s obzirom na njihovu distribuciju između mobilne (uglavnom vodene) i pseudostacionarne (micelarne) faze. Szucz i sur. (1996) su otkrili da se glavni sojini fosfolipidi razdvoje u samo 7 minuta korištenjem deoksikolne kiseline za formiranje micela u kombinaciji s n-propanolom na 50°C. Ipak, kvantifikacija separiranih sastojaka je ostala problematična. To je zbog toga jer se samo UV detektori mogu koristiti, a i odgovor jako ovisi o stupnju nezasićenosti fosfolipida. Usporedba pikova kod MEKC metode je mnogo kompliciranija nego kod HPLC jer se sastojci kreću različitom brzinom.

Superkritična tekućinska kromatografija (SFC) je također korištena u analizi fosfolipida. Prema Laffose i sur. razredi fosfolipida se mogu separirati upotrebom SFC, korištenjem jednostavnog izokratskog otapala koji sadrži smjesu CO<sub>2</sub> i smjesu metanola, vode i trietilamina

u kombinaciji sa Zorbax Sil stacionarnom fazom. U ovom slučaju detekcija je provedena evaporativnom light-scattering (Lafosse i sur., 1992).

Ipak, sve do sad, HPLC je ostala najviše upotrebljavana metoda. To je uglavnom zbog činjenice da je ova tehnika mnogo jednostavnija za automatizaciju u odnosu na TLC. Osim toga, dostupan je širok izbor stacionarne i mobilne faze pa je tehnika vrlo fleksibilna. U odnosu na P-NMR troškovi ulaganja su mnogo niži. Stoga, sve novije službene metode za određivanje fosfolipida predložene od strane American Oil Chemist Society (AOCS), International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) i International Lecithin and Phospholipid Society (ILPS) koriste HPLC. Što se tiče fosfolipida, zbog navedene osobine amfililnosti, kada se želi separacija različitih razreda fosfolipida, stacionarna faza mora stupati u interakciju s njihovim polarnim dijelom pa se preferira HPLC normalna faza. S druge strane, separacija različitih molekularnih vrsta unutar jednog razreda fosfolipida se ostvaruje HPLC reverznom fazom, uzrokujući eluciju fosfolipida u skladu sa sastavom masnih kiselina.

## 2.4. RAZVOJ I VALIDACIJA METODE

Kod provođenja i razvoja analitičkih metoda bitno je postići brze, točne i vjerodostojne rezultate analiza. Kako bi se osigurala točnost i pouzdanost analitičkih podataka potrebno je provesti validaciju metoda. Ona nam omogućava predvidjeti najčešće probleme koji se pojavljuju tijekom primjene, postupaka razvoja i validacije metode (Kapil, 2011).

Validacija metode je postupak ili studija dokazivanja je li metoda ili proces prihvatljiv za njegovu namjenu (Pravilnik, 2013). Potrebno je utvrditi postupke, tj. isplanirati i provesti eksperimente čije rezultate treba prikupiti i prikazati kao dokaze o validnosti metode. Svakoju se metodi pristupa individualno pa se i postupci validacije razlikuju ovisno o metodi. Od strane struke, regulative i zakonodavstva prihvaćeno je osam osnovnih parametara, čijom se kombinacijom oblikuje plan validacije za pojedinu metodu.

#### 2.4.1. Parametri validacije

##### *Specifičnost/selektivnost*

To je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Specifičnost i selektivnost su dva različita svojstva metode, iako se oni često poistovjećuju. Metoda kojom se može odrediti samo jedan specifični analit je specifična metoda, dok je selektivna metoda ona kojom se može određivati više komponenata istodobno, koje se mogu i ne moraju razlikovati (Kapil, 2011).

Selektivnost se dokazuje usporedbom odziva metode na referencijski materijal i analit u uzorku. Kod kromatografskih metoda, osim usporedbe kromatograma referencijskog materijala i uzorka, potrebno je dokumentirati i parametre koji određuju razdvojenost i simetriju pikova, a kod određenih metoda i prikupiti dokaze o čistoći pikova.

##### *Linearnost*

Linearnost metode je mogućnost metode da unutar danog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku (Toomula, 2011). U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referencijskog materijala (preporučuje se najmanje pet koncentracijskih razina). Za svaku točku linearnosti odredi se srednja vrijednost, te se iz dobivenih podataka izračuna jednadžba pravca, koeficijent regresije, nagib i odsječak pravca.

##### *Područje*

Područje je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost (Kapil, 2011). Za određivanje tog parametra nije potrebno provoditi zasebne eksperimente, nego se zaključci izводе iz studije linearnosti. Sužavanjem područja na koncentracijski raspon uzoraka postižu se bolja točnost i preciznost metode. Ipak, kad se očekuju uzorci sa širokim rasponom koncentracija, isplati se definirati maksimalno područje metode.

##### *Preciznost*

Preciznost se definira kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka (Toomula, 2011).

Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikuje se:

- preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost - uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, kratko razdoblje.
- međupreciznost – preciznost se ostvaruje unutar istog laboratorija kroz dulje razdoblje uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, kolone, reagensi iz različitih boca i različitih dobavljača).

### *Istinitost*

Istinitost metode se definira kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta. Numerički pokazatelj istinitosti eksperimentalno je utvrđeno sustavno odstupanje metode, a dobiven je kao razlika aritmetičke sredine rezultata i referencijske vrijednosti ili kao njihov odnos. Eksperimenti se provode nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti, najmanje tri puta za najmanje tri koncentracijske razine raspoređene unutar radnog područja metode. Raspon koncentracija treba odgovarati stvarnom uzorku.

### *Limit detekcije i kvantifikacije*

Limit detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja je se može detektirati, ali ne i kvantificirati. Limit kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost te se određuje kod kvantitativnih analiza gdje je nivo koncentracije analita koji se određuje nizak (Kapil, 2011). Parametar granice kvantifikacije iznimno je važan kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš.

### *Robusnost*

Robusnost analitičkog postupka je mjera njegove sposobnosti da ostane nepromijenjen na male, ali namjerne varijacije u parametrima metode. Ispitivanje robusnosti provodi se da bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe metode utječu na rezultat analize. (Toomula, 2011). Važan su dio razvoja metode jer pomažu otkriti optimalne uvjete izvedbe metode te upućuju na to što treba nadzirati.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1 Biljno ulje i sjeme soje

U svrhu kalibracije i validacije metode za određivanje fosfolipida iz biljnih ulja korišteno je biljno ulje proizvođača Zvijezda d.d. proizvedeno kao mješavina suncokretovog i sojinog ulja. Za provedbu laboratorijske ekstrakcije sojinog lecitina korišteno je sjeme soje uzgojeno na pokusnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2015. godine.

##### 3.1.2. Standardi i reagensi

Otapala korištena za pripremu uzoraka bila su *pro analysis* čistoće:

- Metanol
- Etanol
- Heksan
- Petroleter
- Dietil eter
- Voda (laboratorijska, demineralizirana)

Otapala korištena za HPLC analizu bila su *pro chromatography* stupnja čistoće, što je potrebno kod kromatografskih analiza:

- Heksan
- Izopropanol

U radu je korišteno 5 standarda (Larodan AB/ 66 Guiden court, Toronto, Canada):

- fosfatidiletanolamin (PE),
- fosfatidna kiselina (PA),
- fosfatidilinozitol (PI),
- fosfatidilserin (PS)
- fosfatidilkolin (PC).

Bili su otopljeni u kloroformu, a koncentracija im je bila  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 3.1.3. Oprema

U ovom radu korišteni su:

- HPLC sustav koji se sastoji od Varian 9010 gradijentne pumpe i Variant Pro Star PDA detektora spojenih s računalom (Slika 4). HPLC gradijentna pumpa opremljena petljom od 20  $\mu$ L služila je za nanošenje uzorka na kolonu. Analitička kolona održavana je na sobnoj temperaturi.



Slika 4. HPLC sustav s PDA detektorom (vlastita)

- Rotavapor (BUCHI B-490, Švicarska) je korišten za uklanjanje para otapala iz sadržaja tikvice pomoću vakuuma (Slika 5).



Slika 5. Rotavapor (Anonymous 4, 2016)

- Ultrazvučna kupelj je korištena za ekstrakciju pod utjecajem ultrazvuka i temperature od 50°C.

### 3.2. METODE RADA

#### 3.2.1. Određivanje udjela ulja

Udio ulja u soji određen je standardnom HRN EN ISO 665 (2010) metodom ekstrakcije ulja po Soxhletu, uz otapalo petroleter. Aparatura za ekstrakciju sastoji se od tikvice, ekstraktora i hladila. U osušenu i odvagano tikvicu po Soxhletu dodane su tri kuglice za vrenje. U tuljak za ekstrakciju odvagano je na analitičkoj vagi 10 g uzorka samljevene soje, nakon čega je uzorak zatvoren vatom i stavljen u ekstraktor koji se spoji sa hladilom i tikvicom. Ekstrakcija je trajala oko 8h. Po završetku ekstrakcije, otapalo je predestilirano u istoj aparaturi, a zaostalo ulje u tikvici je odvagano i osušeno do konstantne mase.

Udio ulja u uzorku računao se prema sljedećem izrazu:

$$\text{Udio ulja} = \frac{(a-b)}{c} \times 100$$

gdje je:

a – masa tikvice sa uzorkom (g);

b – masa prazne tikvice (g);

c – masa ispitivanog uzorka (g).

Kao rezultat uzeta je srednja vrijednost dva paralelna ponavljanja.

### 3.2.2. Određivanje udjela vode

Udio vlage u soji određen je prema standardnoj HRN EN ISO 659 metodi (2004). U prethodno osušenu, u eksikatoru ohlađenu i izvaganu posudicu izvagano je 5 g mljevene soje, nakon čega je posudica s podignutim poklopcem stavljena u sušionik na sušenje tijekom 2h pri 103° C. Poslije sušenja posudica s poklopcem je stavljena u eksikator na hlađenje do sobne temperature te nakon hlađenja izvagana. Ponovno je stavljena u sušionik s podignutim poklopcem 1h, nakon čega je opet proveden postupak hlađenja i vaganja. Sušenje se ponavljalo do konstantne mase, odnosno dok je razlika između dva uzastopna mjerenja bila manja od 0,005 g.

Udio vode u uzorku računao se prema sljedećem izrazu:

$$\text{Udio vode} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

gdje je:

m<sub>0</sub> – masa prazne posudice (g);

m<sub>1</sub> – masa posudice sa uzorkom prije sušenja (g);

m<sub>2</sub> – masa posudice sa uzorkom nakon sušenja (g).

Kao rezultat uzeta je srednja vrijednost dva paralelna ponavljanja.

### 3.2.3. Ekstrakcija ulja iz soje

Ekstrakcija je provedena dodatkom smjese otapala u 50 g mljevene soje, gdje je omjer otapala i soje bio 1,8:1. Otapalo se sastojalo od heksana, etanola i vode u omjeru 64% : 26% : 10%. (Muller i Schweiger, 1973). Kako bi se vidjelo kojim se načinom dobije najveća količina fosfolipida, ekstrakcija je provedena pri 4 različitim uvjeta (tablica 2).

Temperatura je održavana pomoću vodene kupelji na 50°C, a utjecaj ultrazvuka ispitan je pomoću ultrazvučne kupelji. Ekstrakcija se provodila u trajanju od 2 sata. Nakon toga se sve profiltrira preko sinter lijevka, prebaci u tikvicu s ravnim dnom i otpari. Slijedi kasnije opisani postupak dobivanja fosfolipida.

Tablica 2. Uvjeti provođenja ekstrakcije

| Uzorak * | Temperatura 50°C | Ultrazvuk |
|----------|------------------|-----------|
| SU 1     |                  |           |
| SU 2     | +                |           |
| SU 3     |                  | +         |
| SU 4     | +                | +         |

\* SU – lipidni ekstrakt soje

Kontrolni uzorak dobiven je standardnom ekstrakcijom po Soxhletu. Ekstrakcija po Soxhletu se provodila 8h.

### 3.2.4. Priprema uzoraka i standardnih otopina

Kako bi se mogla provesti analiza fosfolipida na HPLC-u, potrebno je prije toga provesti njihovu izolaciju iz ulja.

Fosfolipidi se izoliraju iz 1 g uzorka ulja upotrebom silika gel SPE kolone volumena 3 mL (Bond Elut Straight Barrel, USA) (Slika 6). Ulje se dodaje kao 10% otopina u smjesi petroletera i dietil etera (PE-DEE) (95:5, v/v). Dobivanje fosfolipida se odvija kroz nekoliko koraka, a postupak se provodi korištenjem vakuuma:

1. Ispiranje kolone s 5 mL otopine PE-DEE
2. Nanošenje 10 mL uzorka

3. Nanošenje 10 mL otopine PE-DEE – elucija neutralnih lipida
4. Nanošenje 20 mL DEE – elucija neosapunjivog
5. Nanošenje 10 mL metanola – dobivanje fosfolipida. (Nash i Frankel, 1986).



Slika 6. SPE kolona (Anonymous 5, 2016)

Dobiveni fosfolipidi se skupljaju te otpare na rotavaporu, otope u 1 mL mobilne faze (heksan:izopropanol:voda – 8:8:1) i spremni su za nanošenje na kolonu (HPLC). Ako je bilo potrebno, uzorak je prije nanošenja na kolonu profiltriran kroz 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filter.

### 3.2.5. HPLC analiza

Analiza fosfolipida u uzorcima sojinog ulja provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz PDA detektor.

Kolona (Poroshell 120 HILIC, 4,6x150mm, 4-micron; USA) je bila spojena na HPLC sustav opremljen s petljom od 20  $\mu\text{L}$  koja je služila za nanošenje pripremljenog uzorka ulja na kolonu. Ulje je eluirano mobilnom fazom koja se sastojala od heksana, izopropanola i acetatnog pufera (omjer 8:8:1), pri protoku 2  $\text{mLmin}^{-1}$  kroz 8 minuta. Acetatni pufer (pH 4.2), korišten kao pufer u HPLC mobilnoj fazi, dobiven je mješanjem 26.5 mL otopine natrijeva acetata (0.2M) i 73.5 mL ledene octene kiseline (0.2M). Korištena je i laboratorijska, demineralizirana voda.

Svaki dan kad se provodila analiza, prije i nakon upotrebe kolone, ista je pročišćena izopropanolom pri protoku  $1 \text{ mLmin}^{-1}$  kroz 15 minuta. Detekcija pojedinih eluiranih fosfolipida je provedena na valnoj duljini od 206nm na PDA detektoru.

Standardi fosfolipida, kojima je uklonjen kloroform i otopljeni su u mobilnoj fazi bez pufera, razrijeđeni su kako bi se dobile željene koncentracije. Različite koncentracije standarda korištene su u svrhu kalibracije.

### 3.2.6. Kvantifikacija

Za dobivanje kalibracijske krivulje standardi fosfolipida su razrijeđeni u mobilnoj fazi (heksan:izopropanol:voda- 8:8:1) na različite koncentracije. Za PE, PA, PS i PC koristio se raspon od 5 točaka kalibracije: 10, 50, 100, 500 i  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Za PI, zbog nižeg odgovora na PDA detektoru, je korišten raspon od 4 točke, počevši od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ .

### 3.2.7. Validacija

Metoda je validirana na linearnost, limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ), točnost i preciznost prema ICH postupcima za validaciju analitičkih metoda (ICH, 2005), u skladu s međunarodnim zahtjevima.

U svrhu validacije korišteno je rafinirano ulje u koje je dodana utvrđena koncentracija standarda.

Linearnost je uspostavljena kroz koeficijent korelacije ( $r^2$ ) kalibracijske krivulje za opisani raspon točaka.

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) su određeni analizom standarda fosfolipida u najnižoj koncentraciji kalibracije od  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  za PE, PA, PC i PS, te  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  za PI u 7 injektiranja. Otopine standarda su analizirane, a navedeni parametri izračunati su iz nagiba kalibracijske krivulje (S) i odaziva standardne devijacije ( $\sigma$ ) na sljedeći način:

$$\text{LOD}=3.3 \sigma\text{S}^{-1}$$

$$\text{LOQ}=10 \sigma\text{S}^{-1}$$

Preciznost je procijenjena kao relativna standardna devijacija (RSD%) kod koncentracije 500 mg kg<sup>-1</sup> za sve fosfolipide, mjereno u 7 ponovljenih injektiranja tijekom istog dana.

Točnost je procijenjena injektiranjem uzoraka pročišćenog ulja s dodatkom standarda fosfolipida u koncentraciji 200 mg kg<sup>-1</sup>.

### 3.2.8. Statistička obrada

Analize su provedene kroz više injektiranja te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost i standardna devijacija paralelnih određivanja koje su izračunate u računalnom programu Microsoft Excel 2013.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu razvijena je metoda za određivanje fosfolipida u sojinom ulju. Upotreba fosfolipida, zbog emulgirajućih svojstava, je široko rasprostranjena u brojnim industrijama, prvenstveno u prehrambenoj. U prehrambenoj industriji glavni razlog zbog kojeg se upotrebljavaju fosfolipidi je to što djeluju kao emulgatori i stabilizatori emulzija, olakšavaju disperziju čvrstih čestica u vodenoj fazi, poboljšavaju teksturu prehrambenih proizvoda. Baš zbog tog razloga cilj je bio razviti i validirati metodu za njihovo određivanje. Razvoj metodologije za kvantitativnu analizu fosfolipida je važan kako bi se moglo utjecati na kvalitetu nerafiniranih ulja te ocijeniti efikasnost procesa degumiranja, postupka kojim se fosfolipidi uklanjaju (Carelli i sur., 1997). U prošlosti se kvantifikacija fosfolipida provodila prvenstveno TLC-om, ali ta metoda ima nekoliko nedostataka kao što je separacija pojedinih razreda koja je bila vrlo teška i dugotrajna te nije uvijek bila točna. S druge strane, masena spektrometrija se pokazala kao jako dobra tehnika za određivanje sastava fosfolipida zbog visoke osjetljivosti, specifičnosti i jednostavnosti u analizi lipida dobivenih iz kompleksnog biološkog matriksa (Herchi i sur., 2011). Ipak, kao najjeftinija metoda pomoću koje se relativno brzo dolazi do rezultata koristi se HPLC metoda. Ona je u zadnja 2 desetljeća postala glavna metoda za separaciju i kvantitativnu determinaciju razreda fosfolipida (Zhang i sur., 2005).

Utjecaj fosfolipida na zdravlje ljudi je velik. Brojna istraživanja su provedena s ciljem da se dokaže njihova sposobnost da inhibiraju rast stanica raka. Jedna *in vitro* studija sa staničnom linijom karcinoma jetre prikazala je ovisnost doze i rasta raka kada su stanice kultivirane u prisutnosti sojinog PC i PC žumanjka jajeta (96,5% čistog PC od soje i 99% PC od žumanjka) s vitaminom K2 (Sakakima i sur., 2007). Suplementacija je provedena i na štakorima gdje se vidi jasna supresija stvaranja prekursora raka i lezija jetre. Iako je utjecaj veći kod kombinacije PC i vitamina K2 zbog sinergističkog djelovanja, i sam PC dovodi do značajnog smanjenja broja stanica raka (Küllenberg i sur., 2012). Idući cilj je primjena na ljude s karcinogenezom jetre.

Fosfolipidi se propisuju za liječenje problema s jetrom, uključujući virusni hepatitis ili oštećenja jetre uzrokovana alkoholom. U kliničkom ispitivanju, kod bolesnika s kroničnom konzumacijom alkohola i oštećenjima jetre uzrokovanih alkoholom, liječenje sojinim PC se pokazalo učinkovitim. Došlo je do povlačenja simptoma, kao i do poboljšanja antioksidativnog statusa (Tsyркunov i sur., 1992). Također do poboljšanja dolazi i kod bolesnika čija oštećenja jetre nisu uzrokovana zbog konzumacije alkohola. (Küllenberg i sur., 2012).

Budući da su fosfolipidi glavne komponente membrana, njihovom promjenom dolazi i do promjena osobina i funkcija membrana. Omjer kolesterola i fosfolipida raste s godinama što dovodi do smanjenja imunološke funkcije. Ipak, porastom sadržaja fosfolipida u membranama limfocita može dovesti do obnove imunološke funkcije kod starijih (Maczek i sur., 1998).

Saznanja o pozitivnim djelovanjima fosfolipida temelje se na medicinskim dokazima te je potrebno više kontroliranih kliničkih ispitivanja kako bi se točno utvrdile prednosti (Küllenberg i sur., 2012).

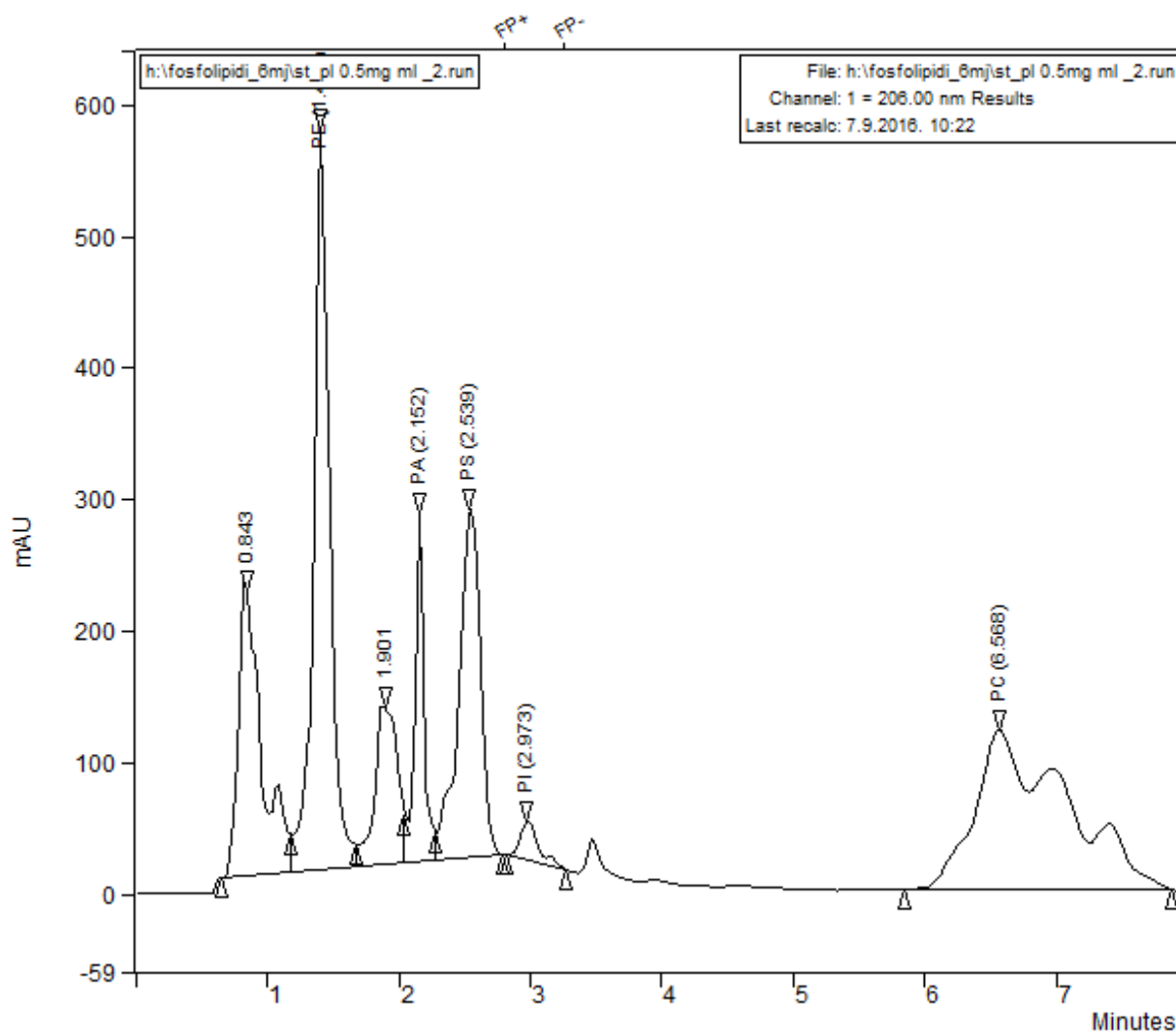
Glavni cilj ovog istraživanja bio je razviti HPLC metodu kako bi se uspješno kvantificirali fosfolipidi prisutni u sojinom ulju te primjeniti metodu na proučavanje utjecaja ultrazvuka i temperature tijekom ekstrakcije na količinu fosfolipida u ulju. Za detekciju fosfolipida mogu se koristiti različiti detektori, a kao najbolji se pokazao detektor raspršenja evaporativnog svjetla (eng. evaporative light-scattering detektor - ELSD). Stoga se on najčešće koristi, a njegove glavne prednosti su kompatibilnost s brojnim eluentima te činjenica da daje ujednačene odgovore. UV detektor je također popularan za detekciju razreda fosfolipida jer je UV detekcija jednostavna i jeftina. Unatoč tome, problem UV detekcije predstavlja kvantifikacija što opet smanjuje njegovu upotrebu (Nollet, 2000). U ovom radu, zbog dostupnosti i veće osjetljivosti na fosfolipide od UV detektora, detekcija je provedena pomoću PDA detektora. Detektirano je svih pet fosfolipida prisutnih u sojinom ulju.

Nadalje u tekstu, grafički biti će prikazane kalibracijske krivulje određenih fosfolipida, dok će pripadajući koeficijenti korelacije ( $r^2$ ) biti prikazani tablično kao i svi ostali dobiveni rezultati. Kroz istraživanje su kao parametri validacije izmjereni: limit detekcije i kvantifikacije, točnost i preciznost. Ekstrakcija otapalom je provedena pri 4 različita uvjeta te će biti prikazani rezultati dobiveni praćenjem utjecaja temperature i ultrazvuka na količinu dobivenih fosfolipida. Provedena je i ekstrakcija po Soxhletu te je taj uzorak korišten kao kontrolni. Osim toga, standardnim metodama određeni su udio ulja i vode u sjemenu soje.

Novom metodom je detektirano pet fosfolipida prikazanih na kromatogramu (Slika 7), a eluirali su redom prikazanim u tablici 3. Koristeći navedene koncentracije standardnih otopina postignut je sljedeći raspon linearnosti metode.

Tablica 3. Retencijska vremena i raspon linearnosti pojedinih standarda fosfolipida

| Fosfolipid | Retencijsko vrijeme (min) | Raspon linearnosti metode (mg kg <sup>-1</sup> ) |
|------------|---------------------------|--------------------------------------------------|
| PE         | 1,408                     | 10-1000                                          |
| PA         | 2,080                     | 10-1000                                          |
| PS         | 2,595                     | 10-1000                                          |
| PI         | 2,819                     | 50-1000                                          |
| PC         | 7,653                     | 10-1000                                          |

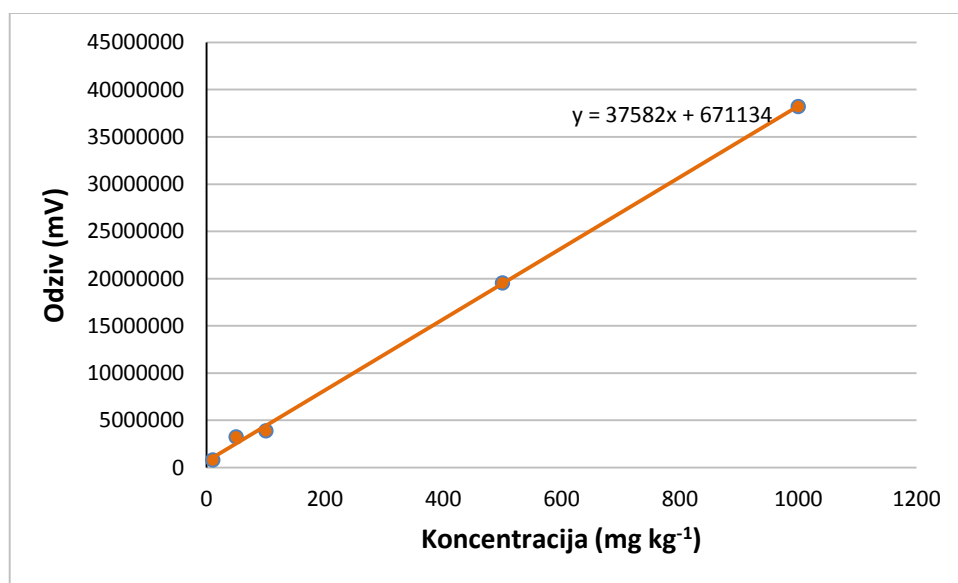


Slika 7. HPLC kromatogram s 5 fosfolipida detektiranih razvijenom metodom

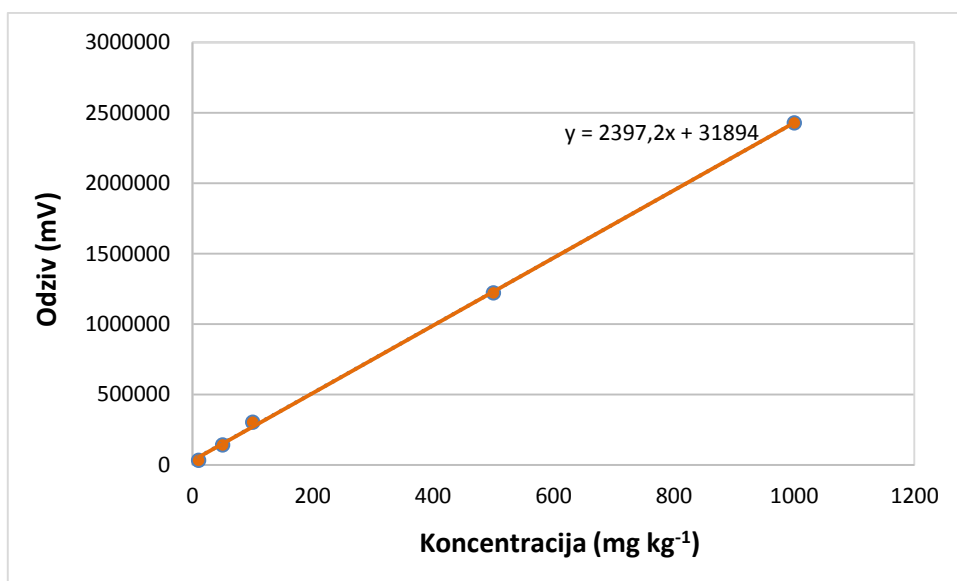
Na slici 7 možemo vidjeti kako su pikovi za PE, PA, PI i PS dobro razdvojeni. Pik PC-a je razdvojen na 3 dijela, a mogući razlog tomu je hidroliza.

#### 4.1. KALIBRACIJA

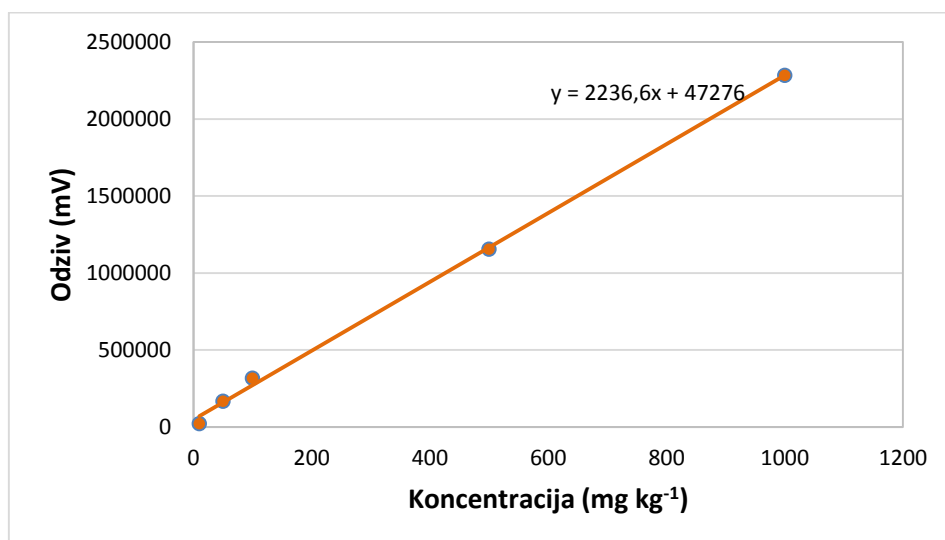
Kalibracija je provedena injektiranjem razrijeđenog standarda, pripremljenog u pet različitih koncentracija. Za stvaranje baždarnih pravaca koristio se raspon od 5 točaka za PE, PA, PS i PC, odnosno 4 točke za PI. Slike 8-12 prikazuju kalibracijske krivulje tj. baždarne pravce u navedenim rasponima te njihove pripadajuće jednačbe. Tablica 4 prikazuje koeficijente korelacije za sve detektirane fosfolipide.



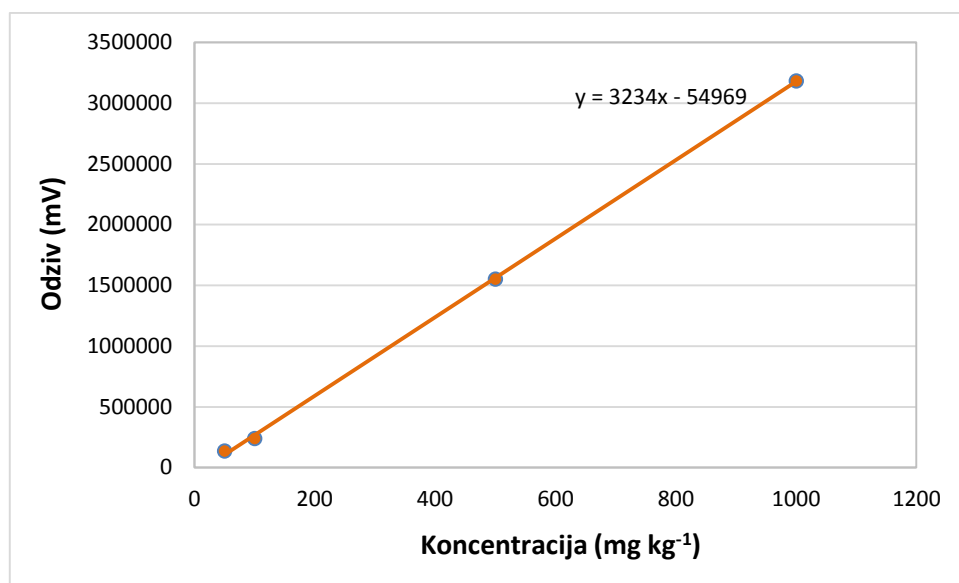
Slika 8. Baždarni pravac fosfatidiletanolamina



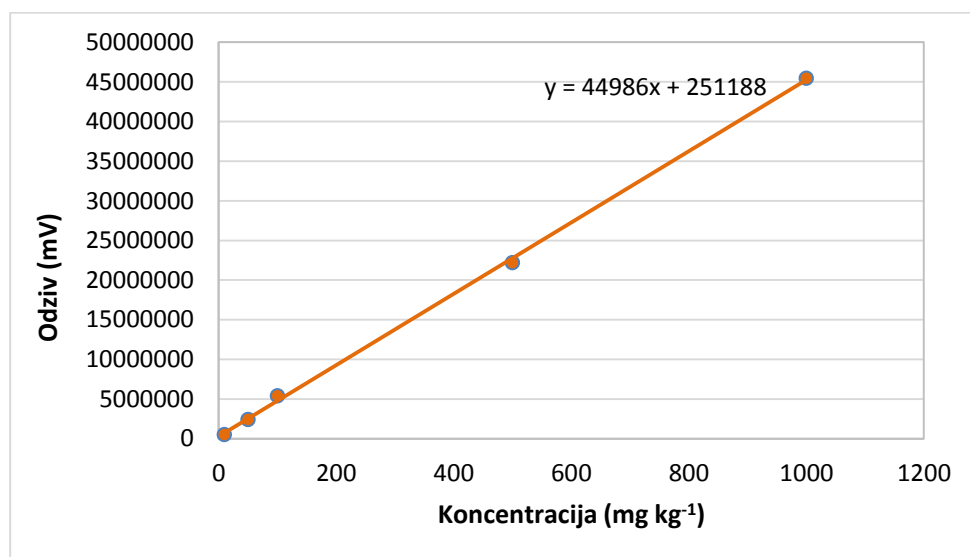
Slika 9. Baždarni pravac fosfatidne kiseline



Slika 10. Baždarni pravac fosfatidilserina



Slika 11. Baždarni pravac fosfatidilinozitola



Slika 12. Baždarni pravac fosfatidilkolina

Tablica 4. Koeficijenti korelacije za pojedine fosfolipide

| Fosfolipid | Koeficijent korelacije $R^2$ |
|------------|------------------------------|
| PE         | 0,9991                       |
| PA         | 0,9996                       |
| PS         | 0,9987                       |
| PI         | 0,9997                       |
| PC         | 0,9994                       |

U jednadžbi ( $y = \alpha x + \beta$ ) kalibracijske krivulje, „y“ označava površinu ispod pika standarda, a „x“ koncentraciju analita. Kalibracijska krivulja standarda PS imala je koeficijent kalibracije 0,9987, dok je za kalibracijske krivulje ostalih standarda bio veći od 0,999. Zbog slabije osjetljivosti PDA detektora na PI, raspon koncentracija za utvrđivanje linearnosti bio je od 50-1000 mg kg<sup>-1</sup>. Ostali standardi pripremljeni su u rasponu od 10-1000 mg kg<sup>-1</sup>.

Kang i sur. (2002) su za kalibraciju PE i PC pomoću ELSD detektora koristili mnogo niži raspon koncentracija. Za PE je bio između 3-10 mg kg<sup>-1</sup>, a za PC između 10-25 mg kg<sup>-1</sup>. Iz toga se vidi da za razliku od PDA detektora, ELSD ima mnogo veću osjetljivost. Također, koeficijent korelacije za PC bio je znatno niži od vrijednosti dobivenih u ovom radu. Za utvrđivanje linearnosti kod određivanja fosfolipida u suncokretovom ulju, uz UV detektor, Carelli i sur. (1997) su koristili viši raspon koncentracija, od 200 do 4500 mg kg<sup>-1</sup>. Prema tome se vidi da se PDA detektor, prema osjetljivosti, nalazi između UV i ELSD detektora. Dobivene vrijednosti koeficijenata korelacije su bile između 0,995 i 0,999. Lee i sur. (2010) su određivali fosfolipide pomoću tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom te za PE, PC i PI dobili vrijednosti koeficijenata korelacije iznad 0,990. Uspoređujući rezultate za koeficijente korelacije u ovom radu s rezultatima navedenih radova, potvrđuje se dobra preciznost metode.

## 4.2. VALIDACIJA

U svrhu validacije nove metode utvrđeni su sljedeći parametri: limit detekcije, limit kvantifikacije, točnost i preciznost provjerena kao relativna standardna devijacija (RSD). Rezultati validacije metode razvijene u ovom radu prikazani su u tablicama 5 i 6.

Tablica 5. Parametri validacije za 5 fosfolipida (LOD - limit detekcije; LOQ - limit kvantifikacije)

| Fosfolipid | LOD (mg kg <sup>-1</sup> ) | LOQ (mg kg <sup>-1</sup> ) |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| PE         | 3,53                       | 10,70                      |
| PA         | 3,86                       | 11,71                      |
| PS         | 3,64                       | 11,03                      |
| PI         | 15,09                      | 45,71                      |
| PC         | 1,75                       | 5,29                       |

Kako bi se utvrdili limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ), sedam puta je injektirana najniža koncentracija pojedinog standarda fosfolipida. LOD i LOQ su izračunati na temelju standardne devijacije (3,3 i 10 puta na izračunat iznos od uzoraka ulja obogaćenog s fosfolipidima), podijeljene s nagibom regresijske linije. Rezultati osjetljivosti metode prikazani su u tablici 5. Najniži limit detekcije i limit kvantifikacije zabilježen je za PC i iznosio je 1,75 mg kg<sup>-1</sup> odnosno 5,29 mg kg<sup>-1</sup> iz čega se može zaključiti da je osjetljivost PDA detektora za ovaj spoj najveća. Najviši limit detekcije i limit kvantifikacije očekivano je imao PI, a iznosio je 15,09 mg kg<sup>-1</sup> odnosno 45,71 mg kg<sup>-1</sup>. LOD i LOQ za PI su vrlo visoki, pri čemu su od vrijednosti LOD i LOQ za PC viši oko 9 puta, a od vrijednosti LOD i LOQ za ostale fosfolipide 4-5 puta. CAD (Charged Aerosol Detector) detektor isto bilježi najviši LOD i LOQ za PI, pri čemu je najviša razlika bila od LOD i LOQ za PE. Razlika je bila 3 puta što je dosta manje nego što je slučaj u ovom radu. LOD i LOQ vrijednosti za PI se neznatno razlikuju od onih za PC i

PA (Damnjanović i sur., 2013). U radu Narváez-Rivas i sur. (2011), uz upotrebu ELSD detektora, najviši LOD je zabilježen za PC.

Vrijednosti limita detekcije i kvantifikacije su dosta visoke i kada bi se gledale za neke štetne spojeve sigurno ne bi bile u okvirima dozvoljenih granica. No, budući da fosfolipidi nemaju nikakav štetan utjecaj na zdravlje i okoliš, dapače, djeluju pozitivno, ne postoje nikakvi navedeni kriteriji za dopuštene vrijednosti LOD i LOQ.

Kada bi se uspoređivao LOD dobiven  $^{13}\text{P}$  NMR, TLC i HPLC metodama,  $^{13}\text{P}$  NMR bi dao najviše vrijednosti, u rasponu  $1\text{--}5\text{ mg mL}^{-1}$  (Helmerich i Koehler, 2003). Oni su, u suncokretovom ulju, pomoću  $^{13}\text{P}$  NMR dobili čak i 30 puta veće LOD vrijednosti nego s TLC i HPLC.

Lee i sur. (2010) su određivali PE, PC i PI u kultivarima soje pomoću tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom. Dobili su dosta veće vrijednosti za LOD i LOQ. LOD je bio  $50\text{ mg kg}^{-1}$  za PC odnosno  $100\text{ mg kg}^{-1}$  za PE i PI, a LOQ  $160\text{ mg kg}^{-1}$  za PC, odnosno  $300\text{ mg kg}^{-1}$  za PE i PI.

Prema rezultatima za LOD vrijednosti u ovom radu, vidi se da je HPLC zadovoljavajuća metoda.

Tablica 6. Parametri validacije za 5 fosfolipida (točnost, RSD - relativna standardna devijacija)

| Fosfolipid | Točnost (%) | Preciznost RSD (%) |
|------------|-------------|--------------------|
| PE         | 97,09       | 3,85               |
| PA         | 97,10       | 3,31               |
| PS         | 100,28      | 1,81               |
| PI         | 100,44      | 5,42               |
| PC         | 99,50       | 4,36               |

Za utvrđivanje točnosti, ulje je obogaćeno sa standardima fosfolipida u koncentraciji 200 mg kg<sup>-1</sup>, a rezultati su prikazani u tablici 6. Rezultati za točnost se kreću od 97,09% za PE do 100,44% za PI što pokazuje općenito dobru točnost metode.

Preciznost je ispitana kao ponovljivost s uljem obogaćenim koncentracijom fosfolipida od 500 mg kg<sup>-1</sup> ulja, provođenjem analize 7 puta u istom danu, a prikazana je kao RSD (%) u tablici 6. Dobiveni rezultati, s najvećom vrijednosti od 5,42% za PI, pokazuju dobru preciznost metode. Slične rezultate su dobili i Damnjanović i sur. (2013) u svom istraživanju uz CAD detektor. Za PA i PE, rezultati su bili jednaki kao u ovom radu, dok su za PI i PC bili niži, i to 3,62% za PI te 3,01% za PC.

U svom radu, Grizard i sur. (2000) su zabilježili RSD vrijednosti od 3% za PC do 8% za PS.

Navedenim rezultatima zadovoljeni su parametri validacije predložene metode. Metoda omogućava detekciju i određivanje fosfolipida prisutnih u sojinom ulju, te relativno jeftino provođenje analize u kratkom vremenskom roku.

#### 4.3. ODREĐIVANJE UDJELA ULJA I VODE U SOJI

Udio ulja i vode u mljevenoj soji određeni su prema standardnim metodama. Udio ulja je određen standardnom HRN EN ISO 659 (2010) metodom ekstrakcije ulja po Soxhletu, a udio vode prema standardnoj HRN EN ISO 665 metodi (2004). Rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Udio ulja i vode u soji

| %         |       |
|-----------|-------|
| Udio vode | 7,01  |
| Udio ulja | 16,95 |

Na udio ulja u sjemenu utječu brojni faktori, počevši od uvjeta tijekom uzgoja i skladištenja do načina ekstrakcije. Postoji pozitivna korelacija između temperature i udjela ulja, pri čemu je optimalna temperatura 25-28°C, iznad koje taj udio počinje padati (Gibson i Mullen, 1996). Neki istraživači su prikazali utjecaj dnevne i noćne temperature uzgoja na količinu dobivenog ulja. Kada se uspoređi udio ulja od 16.95% s rezultatima koje su dobili Wolf i sur. (1982), može se zaključiti da je ispitivana soja bila izložena dnevnoj temperaturi od oko 25°C i noćnoj od oko 20°C. Također, prisutnost šećera u sjemenu utječe na količinu ulja i to pozitivno (Hymowitz i sur., 1972). Jedan od faktora je i suša, a takvo sjeme može sadržavati čak 12% manje ulja (Dornbos i Mullen, 1992).

Tacarindua i sur. (2013) su testirali toleranciju japanske vrste soje Enrei na toplinu, u kontroliranim uvjetima. Stvoren je toplinski gradijent korištenjem 3 različite temperature, ambijentalna temperatura u kontrolnom redu i temperatura povišena za 1 i 3°C u narednim redovima usjeva. Povišenje temperature je uzrokovalo je smanjenje količine ljuske i broja zrna te povećanje veličine sjemena. Prinos ulja je bio znatno smanjen povišenjem temperature i to se nije moglo nadoknaditi dodatkom vode.

Povišenje temperature tijekom razvoja sjemena dovodi do pada udjela vlage (Chapman i sur., 1976). Udio vlage može uvelike biti pod utjecajem uvjeta skladištenja nakon žetve. (Wolf i sur., 1982). Udio od 7,01% se podudara s rasponom 3-12% vlage koji su dobili Snyder i sur. (1984) u svom istraživanju.

#### 4.4. EKSTRAKCIJA

Na količinu fosfolipida u ulju dobivenom ekstrakcijom utječu različiti faktori. U ovom radu ekstrakcija je provedena pri 4 različita uvjeta, uz otapalo sastavljeno od heksana, etanola i vode. Kao kontrola provedena je ekstrakcija po Soxhletu. Pri tome se pratio utjecaj temperature i ultrazvuka, a rezultati su prikazani u tablici 9. Rezultati dobiveni za iskorištenje su prikazani u tablici 8.

Uzorak SU1 dobiven je ekstrakcijom na sobnoj temperaturi, bez djelovanja ultrazvuka. Uzorak SU2 je podvrgnut djelovanju temperature od 50°C, SU3 djelovanju ultrazvuka, dok se kod SU4 gledao utjecaj temperature od 50°C i ultrazvuka.

Tablica 8. Iskorištenje

| Uzorak | Iskorištenje (%) |
|--------|------------------|
| SU1    | 64,62            |
| SU2    | 40,41            |
| SU3    | 64,81            |
| SU4    | 53,68            |

Dobiveni rezultati za iskorištenje nisu visoki. Najviše iskorištenje postignuto je kod uzorka SU3 gdje je ekstrakcija provedena primjenom ultrazvuka pri sobnoj temperaturi. Temperatura ima negativan utjecaj na iskorištenje, jer je ono niže kod uzorka SU2 i SU4, podvrgnutih djelovanju temperature od 50 °C.

Tablica 9. Količina i udio fosfolipida u uzorcima lipidnog ekstrakta (sojinog ulja) dobivenog pri različitim uvjetima ekstrakcije

| Fosfolipidi | SU1                    |      | SU2                    |      | SU3                    |      | SU4                    |      | Soxhlet                |      |
|-------------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
|             | (mg kg <sup>-1</sup> ) | %    | (mg kg <sup>-1</sup> ) | %    | (mg kg <sup>-1</sup> ) | %    | (mg kg <sup>-1</sup> ) | %    | (mg kg <sup>-1</sup> ) | %    |
| PE          | 1937,3                 | 0,19 | 1302,7                 | 0,13 | 2326,2                 | 0,23 | 1926,4                 | 0,19 | 161,2                  | 0,02 |
| PA          | 4598,3                 | 0,46 | 3186,4                 | 0,32 | 5121,3                 | 0,51 | 3010,7                 | 0,30 | 613,8                  | 0,06 |
| PS          | 68,2                   | 0,01 | 123,7                  | 0,01 | 59,0                   | 0,01 | 55,0                   | 0,01 | 115,9                  | 0,12 |
| PI          | 1105,3                 | 0,11 | 590,8                  | 0,06 | 1309,7                 | 0,13 | 398,9                  | 0,04 | 0                      | 0    |
| PC          | 3054,3                 | 0,31 | 1718,4                 | 0,17 | 3755,6                 | 0,38 | 2479,3                 | 0,25 | 195,9                  | 0,02 |
| Ukupno      | 10763,3                | 1,08 | 6922,1                 | 0,69 | 12571,8                | 1,26 | 7870,3                 | 0,79 | 1087,0                 | 0,11 |

\* SU – lipidni ekstrakt soje

Najmanja količina ukupnih fosfolipida dobivena je u uzorku SU2 i to 6 922,1 mg kg<sup>-1</sup>, dok je najveća bila u uzorku SU3 te iznosi 12 571,8 mg kg<sup>-1</sup>. Kada ove vrijednosti usporedimo s količinom fosfolipida u uzorcima SU1 i SU2, očito je da temperatura ima negativan, a ultrazvuk pozitivan utjecaj na tu količinu. To nije iznenađujuće jer se vidi da se isto događa i s iskorištenjem prikazanim u tablici 8. Što se tiče pojedinačnih fosfolipida, i njihova je količina u skladu s ovim rezultatima. Izuzetak je PS kojeg najviše ima u SU2, iako je to vrlo niska vrijednost naspram količine ostalih fosfolipida, a iznosi 123,7 mg kg<sup>-1</sup>. U ovom slučaju temperatura djeluje pozitivno. S druge strane, kombinacija ultrazvuka i temperature tijekom ekstrakcije nema pozitivan učinak na količinu PS.

U svim uzorcima najmanje ima PS, a najviše PA, iako je za očekivati bilo da to bude PC, budući da je on najzastupljeniji fosfolipid u lecitinu. Mobilna faza korištena u radu je ista kao u AOAC (1993) metodi za određivanje fosfolipida. AOAC metoda „ignorira“ prisutnost PS, vjerojatno zbog male količine pronađene u sojinom lecitinu. Zato ovaj rezultat za PS nije iznenađujući.

Kontrolni uzorak je bio uzorak ulja dobiven ekstrakcijom po Soxhletu, pri čemu se dobila vrlo mala količina ukupnih fosfolipida od 1 087,0 mg kg<sup>-1</sup>. Količina pojedinačnih fosfolipida pratila je slijed kao i u ostalim uzorcima, izuzev PI koji ovim postupkom nije određen. S obzirom na rezultate, ova metoda nije poželjna za određivanje fosfolipida.

Prema rezultatima za količinu fosfolipida u uzorcima ulja, izračunat je i udio pojedinačnih i ukupnih fosfolipida. Prema Liu (1997) udio fosfolipida u sojinom ulju iznosi 1-3%. U ovom radu je najveći udio ulja zabilježen u SU3 te iznosi 1,28%. To je relativno niska vrijednost, a razlozi mogu biti nedovoljno miješanje tijekom ekstrakcije, duljina ekstrakcije i slično.

Erickson i sur. (2015) su prikazali udio sojinog ulja i fosfolipida u sojinom lecitinu. Najviši udio zabilježen je za PC i iznosi 16%. Slijede ga PE (14%) i PI (10%). U ovom radu, u svim uzorcima sojinog ulja, najveći udio zabilježen je za PA, dok ostali prate navedeni slijed. To je neočekivano, budući da je u ostalim radovima PA pronađen u vrlo maloj količini.

Relativna koncentracija fosfolipida u uljima ovisi o metodi ekstrakcije i tipu degumiranja. Količina fosfolipida je u korelaciji s prinosom ulja dobivenog ekstrakcijom s koeficijentom korelacije  $r^2 = 0,83$ .

Ekstrakcija heksanom je jedan od najčešćih postupaka dobivanja sojinog ulja. Jedan od načina je i prešanje, čime se dobije ulje visoke kvalitete, ali znatna količina ulja zaostane u kolaču. S druge strane, heksan koji se koristi, zaostaje u ulju što nije poželjno. Zato se u posljednje vrijeme traži se alternativa za heksan, a zbog ekoloških i sigurnosnih mjera jedna od mogućih

bi mogla biti superkritični CO<sub>2</sub>. Ipak, u industriji, CO<sub>2</sub> nije zamijenio ekstrakciju heksanom, uglavnom zbog visoke cijene takvog postrojenja (Jokić i sur., 2012).

De Moura Bell i sur. (2013) su uspoređivali udio ulja dobiven ekstrakcijom heksanom i enzimatskom vodenom ekstrakcijom te dobili puno veće vrijednosti za ulje ekstrahirano heksanom, što opet potvrđuje ovu metodu.

Jokić i sur. (2012) su određivali utjecaj načina ekstrakcije na udio ulja u sojinom ulju. Prvi način je bio metoda po Soxhletu gdje su kao otapalo koristili heksan za razliku od petroletera korištenog u ovom radu, dok je u drugom ekstrakcija provedena pomoću superkritičnog CO<sub>2</sub>. U oba slučaja su dobili veće vrijednosti od 16,95%. Pri tome je u prvom načinu udio ulja bio 20,08%, a u drugom 19,33%. Kada navedene rezultate usporedimo s vrijednosti od 16,95%, uočava se poprilična razlika. Iz toga se može zaključiti da petroleter korišten kao otapalo nije zadovoljavajuća opcija.

Nova potencijalna tehnologija za unaprijeđenje ekstrakcije je ultrazvuk. U biljnim tkivima ultrazvuk razara stanične stijenke čime se olakšava otpuštanje ekstraktibilnih spojeva i olakšava ulazak otapala u stanicu (Vinatoru, 2001). Nedavna istraživanja su pokazala da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom dovodi do veće efikasnosti ekstrakcije kroz akustičku kavitaciju i neke mehaničke učinke (Li i sur., 2004). Glavna prednost je to što skraćuje vrijeme ekstrakcije i smanjuje utrošak otapala. (Wu i sur., 2001). Tada je potrebna i manja temperatura pa se sprječava toplinsko oštećenje i gubitak bioaktivnih komponenti.

Wang i Weller (2006) su uspoređivali kako različite metode ekstrakcije utječu na dobivenu količinu bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Količina tokoferola od 63,7 mg kg<sup>-1</sup>, dobivena pomoću UAE (vodene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom), je dosta manja nego količina dobivena pomoću konvencionalne ekstrakcije otapalom (76,32 mg kg<sup>-1</sup>) ili SCF (129,27 mg kg<sup>-1</sup>). Također su pratili količinu karvona dobivenog UAE metodom, provedenom pri 69°C i pri 20-38°C. U prvom slučaju količina karvona bila je 14,45 mg kg<sup>-1</sup>, a u drugom 17,16 mg kg<sup>-1</sup>. To još jednom potvrđuje negativan utjecaj temperature tijekom ekstrakcije na količinu bioaktivnih komponenti.

Zhang i sur. (2008) su proučavali utjecaj temperature i ultrazvuka na prinos lanenog ulja. Kod UAE, porastom temperature prinos je bio manji. Kada usporedimo s našim rezultatima za količinu fosfolipida u uzorcima sojinog ulja vidimo da se isto događa.

Uspoređujući dobivene rezultate u ovom radu i rezultate drugih autora da se zaključiti

kako ekstrakcija pod utjecajem ultrazvuka pozitivno utječe na prinos ulja, a time i fosfolipida. S druge strane, temperatura nema pozitivan utjecaj. Dapače, tada je prinos manji zbog već spomenutog djelovanja na gubitak bioaktivnih komponenti među kojima su i fosfolipidi.

Fosfolipidi su ubikvitarni spojevi u prirodi i jedni od glavnih komponenti ljudskog organizma bez kojih on ne bi mogao normalno funkcionirati. Sastojak su biljnih ulja te se uklanjaju tijekom rafinacije postupkom degumiranja. Pri tome se dobije smjesa fosfolipida-lecitin koji u vodenom okruženju formira dvosloj pa se koristi kao stabilizator emulzija. U ovom radu razvijena je metodologija za kvantitativnu analizu fosfolipida što je važno kako bi se moglo utjecati na kvalitetu nerafiniranih ulja te ocijeniti efikasnost procesa degumiranja. Pratio se i utjecaj temperature i ultrazvuka tijekom ekstrakcije otapalom na količinu fosfolipida u dobivenom ulju. Ovaj rad ima znanstveni doprinos zato što je razvijena i validirana HPLC metoda primjenjiva za određivanje fosfolipida u sojinom ulju.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Metoda razvijena u ovom radu je pogodna za određivanje pet fosfolipida (fosfatidiletanolamin, fosfatidna kiselina, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol i fosfatidilkolin) u sojinom ulju.
2. Linearnost je uspostavljena kroz koeficijente korelacije kalibracijske krivulje, koji je u određenom rasponu za PI bio iznad 0,998, a za sve ostale iznad 0,999.
3. Vrijednosti za limit detekcije i limit kvantifikacije su zadovoljavajuće u analitičkom smislu, a budući da određivani spojevi nisu toksični ne postoje propisane granice za dopuštene vrijednosti LOD i LOQ.
4. Vrijednosti za točnost i preciznost pokazuju općenito dobru točnost i preciznost metode.
5. Analizirani uzorak soje sadrži približno 17% ulja i 7% vode soje je u skladu s literaturnim navodima za ovu kulturu.
6. Uzorak SU3 dobiven ekstrakcijom ultrazvukom pri sobnoj temperaturi sadrži najveću količinu ukupnih fosfolipida te ima najveće iskorištenje iz čega se može zaključiti da ultrazvuk ima pozitivan učinak.
7. Djelovanje temperature na količinu fosfolipida je negativno, što se vidi iz toga da uzorak SU2 podvrgnut djelovanju temperature tijekom ekstrakcije sadrži najmanju količinu ukupnih fosfolipida i ima najmanje iskorištenje.
8. Ulje dobiveno ekstrakcijom po Soxhletu sadrži vrlo malo fosfolipida pri čemu PI uopće nije detektiran pa se ova metoda ne preporuča za određivanje istih.

## 6. LITERATURA

Anonymous 1 (2012) Sojin lecitin, <<http://christinescozycorner.ca/soy-lecithin-as-an-emulsifier/>>. Pristupljeno 12. svibnja 2016.

Anonymous 2 (2016) Struktura fosfolipida, <[http://homepage.smc.edu/wissmann\\_paul/anatomy2textbook/phospholipids.html](http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/phospholipids.html)>. Pristupljeno 15. svibnja 2016.

Anonymous 3 (2016) Soja, *Glycine max* Merrill, <[http://www.obeabadosertao.com.br/v3/cientistas\\_pedem\\_a\\_suspensao\\_dos\\_transgenicos\\_em\\_todo\\_o\\_mundo\\_8309.html](http://www.obeabadosertao.com.br/v3/cientistas_pedem_a_suspensao_dos_transgenicos_em_todo_o_mundo_8309.html)>. Pristupljeno 1. srpnja 2016.

Anonymous 4 (2016) Rotavapor, <<http://www.meadowshplc.com/products/buchi-rotary-evaporators/complete-systems/buchi-r-205-rotary-evaporator-b-490-heating-bath>>. Pristupljeno 13. svibnja 2016.

Anonymous 5 (2016) SPE kolona, <<http://www.appliedseparations.com/solid-phase-extraction.html>>. Pristupljeno 2. srpnja 2016.

Ahmad, M.U., Xuebing, X. (2015) Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology, 1. izd., American Oil Chemists' Society, Urbana, str. 81.

Carelli, A. A., Brevedan, M. I. V., Crapiste, G. H. (1997) Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *J. Am. Oil Chem Soc.* **74**(5), 511–514.

Chapman, G. W. J., Robertson, J. A., Burdick, D., Parker, M. B. (1976) Chemical composition and lipoxygenase activity in soybeans as affected by genotype and environment. *J. Am. Oil Chem Soc.* **53**(2), 54–56.

Christie, W. W. (1982) Lipid Analysis. Isolation: Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids, 2. izd., Pergamon Press, Oxford.

Damnjanović, J., Nakano, H., Iwasaki, Y. (2013) Simple and Efficient Profiling of Phospholipids in Phospholipase D-modified Soy Lecithin by HPLC with Charged Aerosol Detection. *J Am Oil Chem Soc* **90**, 951–957.

De Moura Bell, J. M. L. N., Maurer, D., Yao, L., Wang, T., Jung, S., Johnson, L. A. (2013) Characteristics of Oil and Skim in Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Soybeans. *J. Am. Oil Chem Soc.* **90**(7), 1079–1088.

Deng, Q.G. Qi, L., An, H. (2003) Study On Separating Technique of Soybean Lipositol. *Chem. Eng.* **6**, 1002-1124.

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., Van Camp, J. (2008) Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* **18**, 436–457.

Dornbos, D. L., Mullen, R. E. (1992) Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *J. Am. Oil Chem Soc.* **69**(3), 228–231.

Erickson, D. R. (2015) Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization, 1.izd., Elsevier, Amsterdam, str.174.

Galhardo, F., Dayton C. (2012) Enzymatic Degumming, <<http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40324>>. Pristupljeno 15. lipnja 2016.

Gibson, L. R., Mullen, R. E. (1996) Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. *J. Am. Oil Chem Soc.* **73**(6), 733–737.

Grizard, G., Sion, B., Bauchart, D., Boucher, D. (2000) Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **740**(1), 101-107.

Gunstone, D. F. (2006) Modifying Lipids for Use in Food, 1. izd., Woodhead Publishing, Abington, str. 19.

Hymowitz, T., Collins, F. I., Panczner, J., Walker, W. M. (1972) Relationship Between the Content of Oil, Protein, and Sugar in Soybean Seed. *Agron. J.*, **64**, 613–616.

Herchi, W., Sakouhi, F., Khaled, S., Xiong, Y., Boukhchina, S., Kallel, H., Curtis, J. M. (2011) Characterisation of the glycerophospholipid fraction in flaxseed oil using liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **129**(2), 437–442.

Helmerich, G., Koehler, P. (2003) Comparison of Methods for the Quantitative Determination of Phospholipids in Lecithins and Flour Improvers. *J. Agr. Food Chem.* **51**(23), 6645–6651.

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice -- Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

HRN EN ISO 659:2010, Uljarice -- Određivanje udjela ulja (Referentna metoda).

ICH (2005) Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation, Geneva, Switzerland.

Jokić, S., Nagy, B., Zeković, Z., Vidović, S., Bilić, M., Velić, D., Simándi, B. (2012) Effects of supercritical CO<sub>2</sub> extraction parameters on soybean oil yield. *Food Bioprod. Process.* **90(4)**, 693–699.

Kapil K. (2011) Method Development and Validation of Analytical Procedures. U: Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, (Shoyama, Y., ured.), InTech, Shanghai.

Kang, D. H., Lee, S. K., Row, K. H. (2002) Separation of phospholipids from soybean by NP-HPLC with ELSD. *Korean J. Chem. Eng.* **19(5)**, 818–820.

Küllenberg, D., Taylor, L. A., Schneider, M., Massing, U. (2012) Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* **11**, 3-10.

Lafosse, M., Elfakir, C., Morin-Allory, L., Dreux, M. (1992) The advantages of evaporative light scattering detection in pharmaceutical analysis by high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *J. High Res. Chromatog.* **15(5)**, 312–318.

Lee, S. J., Choi, J. Y., Park, S., Chung, J. Il, Jin, J. S., Lee, S. J., Sung, N. J., Bae, D. W., Shin, S. C. (2010) Determination of phospholipids in soybean (*Glycine max* (L.) Merr) cultivars by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* **23(4)**, 314–318.

Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J. (2004) High Intensity Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Soybeans. *Food Rest. Int.* **37(7)**, 731-738.

List, G.R., Avellaneda J. M., Mounts T. L. (1981) Effect of degumming conditions on removal and quality of soybean lecithin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 892-898.

Liu K. (1997) Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization, 1.izd., Chapman & Hall, London, str.32.

Liu, J., Ma, J. (2011) Fates-shifted is an F-box protein that targets Bicoid for degradation and

regulates developmental fate determination in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell Biol.* **13**(1), 22-29.

Maczek, C., Bock, G., Jurgens, G., Schonitzer, D., Dietrich, H., Wick, G. (1998) Environmental influence on age-related changes of human lymphocyte membrane viscosity using severe combined immunodeficiency mice as an in vivo model. *Exp. Gerontol.* **33**(5), 485–498.

Meneses, P., Navarro, J. N., Glonek, T. (1993) Algal phospholipids by <sup>31</sup>P NMR: comparing isopropanol pretreatment with simple chloroform/methanol extraction. *Int. J. Biochem.* **25**(6), 903–910.

Mounts, T. L., Nash, A. M. (1990) HPLC analysis of phospholipids in crude oil for evaluation of soybean deterioration. *J. Am. Oil Chem Soc.* **67**(11), 757–760.

Muller, S., Schweiger, R. (1973) Process for extracting full fat soybean flakes or meal. US Patent 3714210 A.

Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Ríos, J. J., León-Camacho, M. A new high-performance liquid chromatographic method with evaporative light scattering detector for the analysis of phospholipids. Application to Iberian pig subcutaneous fat. *J. Chromatogr. A* **1218**, 3453–3458.

Nash, A.M., Frankel, E. N. (1986) Limited extraction of soybeans with hexane. *J. Am. Oil Chem Soc.* **63**, 244-246.

Nollet, L. M. L. (2000) *Food Analysis by HPLC, Second Edition* [online] Taylor & Francis, New York. Pristupljeno 15. ožujka 2016.

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (1993) The American Oil Chemists' Society, Urbana.

Olsson, N. U. (1992) Advances in planar chromatography for the separation of food lipids. *J. Chromatogr.* **624**(1-2), 11–19.

Palacios, L. E., Wang, T. (2005) Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *J. Am. Oil Chem Soc.* **82** (2), 571–578.

Pecheur, E.-I., Martin, I., Maier, O., Bakowsky, U., Ruyschaert, J.-M., Hoekstra, D. (2002) Phospholipid species act as modulators in p97/p47-mediated fusion of Golgi membranes. *Biochemistry-US* **41(31)**, 9813–9823.

Sakai, M., Yamatoya, H., Kudo, S. (1996) Pharmacological effects of phosphatidylserine enzymatically synthesized from soybean lecithin on brain functions in rodents. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **42(1)**, 47–54.

Sakakima, Y., Hayakawa, A., Nagasaka, T., Nakao, A. (2007) Prevention of hepatocarcinogenesis with phosphatidylcholine and menaquinone-4: In vitro and in vivo experiments. *J. Hepatol.* **47(1)**, 83–92.

Singleton, J. A. (1993) Enrichment of phospholipids from neutral lipids in peanut oil by high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem Soc.* **70(6)**, 637–638.

Shurtleff, W., Aoyagi, A. (2016) *History of Soybeans and Soyfoods in Germany* [online] Soyinfo Center, Lafayette. Pristupljeno 20.svibnja 2016.

Snyder, J. M., Friedrich, J. P., Christianson, D. D. (1984) Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Am. Oil Chem Soc.* **61(12)**, 1851–1856.

Suzumura, M. (2005) Phospholipids in marine environments: a review. *Talanta*, **66(2)**, 422–434.

Szücs, R., Verleysen, K., Duchateau, Guus S. M. J. E., Sandra, P., Vandeginste, B. G. M. (1996) Analysis of phospholipids in lecithins comparison between micellar electrokinetic chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **738(1)**, 25–29.

Szuhaj, B. F., List, G. R. (1985) *Lecithins*, 1. izd., American Oil Chemists' Society, Urbana.

Tacarindua, C. R., Shiraiwa, T., Homma, K., Kumagai, E., Sameshima, R. (2013) The effects of increased temperature on crop growth and yield of soybean grown in a temperature gradient chamber. *Field Crop. Res.* **154**, 74–81.

Toomula, N., Kumar, A., Kumar, S., Bheemidi, V. S. (2011) Development and Validation of Analytical Methods for Pharmaceuticals. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2**, 127.

Tsyркunov, V. M. (1992) Lipostabil in the treatment of viral hepatitis B in subjects who abuse alcohol. *Klin. Med. Moscow* **70(1)**, 75-78.

Vance, J. E., Tasseva, G. (2013) Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **1831(3)**, 543-554.

Van Nieuwenhuyzen, W. (1981) The industrial uses of special lecithins: A review. *J. Am. Oil Chem Soc.* **58**, 886-888.

Van Nieuwenhuyzen, W., Tomás, M. C. (2008) Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **110(5)**, 472-486.

Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8(3)**, 303-313.

Vratarić, M., Sudarić, A. (2000) Soja *Glycine max* (L.) Merr. Poljoprivredni institut Osijek, Osijek.

Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 300-312.

Wolf, R. B., Cavins, J. F., Kleiman, R., Black, L. T. (1982) Effect of temperature on soybean seed constituents: Oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. *J. Am. Oil Chem Soc.* **59(5)**, 230-232.

Zufarov O., Schmidt Š., Sekretár S. (2008) Degumming of rapeseed and sunflower oils. *Acta Chim. Slov.* **1**, 321-328.

Wu, J., Lin, L., Chau, F. T. (2001) Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason. Sonochem.* **8(4)**, 347-352.

Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu *Narodne novine* **81**, 2013.

Zhang, Y., Yang, Y., Ren, Q., Jiang, H. (2005) Quantification of Soybean Phospholipids in Soybean Degummed Oil Residue by HPLC with Evaporative Light Scattering Detection. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **28(9)**, 1333-1343.

Zhang, Z.-S., Wang, L.-J., Li, D., Jiao, S.-S., Chen, X. D., Mao, Z.-H. (2008) Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Sep. Purif. Techno.* **62(1)**, 192-198.