



Gimnazija Novo mesto

## **ANALIZA POLHOVE MASTI**

(raziskovalna naloga s področja kemije)

Avtorce:

Nina Pečnik

Lucija Rangus

Neža Rangus

Mentorica:

Janja Pust

Somentorica:

dr. Ema Gričar

Novo mesto, marec 2024

## **IZJAVA**

Izjavljamo, da je raziskovalna naloga rezultat samostojnega raziskovalnega dela, ki smo ga izvedle pod mentorstvom profesorice Janje Pust na Gimnaziji Novo mesto ter somentorstvom dr. Eme Gričar na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

## POVZETEK

Polhova mast se v slovenski ljudski medicini uporablja že stoletja predvsem za zdravljenje kožnih bolezni. Pomagala naj bi tako pri celjenju ran kot tudi pri kroničnih boleznih, kot sta luskavica in dermatitis. To je v nas vzbudilo zanimanje, da bi ugotovile, kaj v polhovi masti prinaša terapevtski učinek. Ugodna maščobna sestava lahko nedvomno vpliva na boljše celjenje ran. Nenasičenost maščobnih kislin v polhovi masti smo določile z jodovim številom, za natančnejše podatke o vsebnosti maščobnih kislin smo izvedle GC analizo, rezultate pa primerjale s standardi maščobnih kislin. Z uporabo metode TLC smo določale tudi vsebnost holesterola; metoda je služila kot pokazatelj nenasičenosti polhove masti, saj je nizka oz. ničelna vsebnost holesterola značilna za nenasičene maščobe. Po analogiji z raziskavami na svižčevi masti pa bi zdravilni (protivnetni) učinek lahko pripisali tudi naravno prisotnim kortikosteroidom, ki pa so v polhovi masti slabo raziskani. Z reakcijo umiljenja in večkratnim ekstrahiranjem ter spiranjem smo iz maščobe pridobile neumiljivi del, ki smo ga uporabile za pripravo vzorcev. Z metodo HPLC smo v vzorcu iz neumiljivega dela masti s primerjavo s standardoma določale kortikosteroida hidrokortizon in kortikosteron. Med raziskovanjem smo spoznale, da je priprava vzorcev zelo zahtevna, ter tako doble ideje, kako bi metodo lahko optimizirale. Pri določitvi peroksidnega števila se je polhova mast izkazala za dobro obstojno, zato smo izvedle poskus za dokazovanje antioksidantov. Nato smo z uporabo HPLC metode ugotavljale tudi prisotnost vitamina E, ki ima vlogo antioksidanta. Tudi to bi lahko bil eden od razlogov, ki prispeva k terapevtskim učinkom polhove masti.

**Ključne besede:** polhova mast, jodovo število, GC, maščobne kisline, holesterol, TLC, kortikosteridi, umiljenje, HPLC, peroksidno število, antioksidanti, vitamin E.

## ABSTRACT

Dormouse fat has been used in Slovenian folk medicine for centuries, mainly for the treatment of skin diseases. It is believed to aid in wound healing as well as in chronic conditions such as psoriasis and dermatitis. This has sparked our interest in determining what contributes to the therapeutic effect of dormouse fat. Undoubtedly, its favourable fatty acid composition may influence better wound healing. We measured the unsaturation of fatty acids in dormouse fat using iodine value, and for more precise data on the fatty acid content, we carried out GC analysis, comparing the results with fatty acid standards. Using TLC method, we also determined the cholesterol content, which served as an indicator of the unsaturation of dormouse fat, as low or zero cholesterol content is characteristic of unsaturated fats. Analogous to research on marmot fat, the healing effect (anti-inflammatory) could also be attributed to naturally occurring corticosteroids, which are poorly researched. By saponification reaction, repeated extraction, and washing, we obtained the unsaponifiable part of the fat, which we used for sample preparation. By using HPLC we determined the corticosteroids hydrocortisone and corticosterone in a sample from the unsaponifiable part of the fat by comparison with standards. During the research, we found that sample preparation is very demanding, thus gaining ideas on how to optimize the method. Dormouse fat showed good stability in determining the peroxide value, so we also determined the presence of vitamin E using the HPLC method, which plays a

role as an antioxidant. This could also be one of the reasons contributing to the therapeutic effects of dormouse fat.

**Keywords:** dormouse fat, iodine value, GC, fatty acids, cholesterol, TLC, corticosteroids, saponification, HPLC, peroxide value, vitamin E.

## ZAHVALA

Pri oblikovanju raziskovalne naloge smo bile deležne številne pomoči, ki je ne moremo spregledati. Zahvalo tako dolgujemo:

- profesorici kemije Janji Pust, univ. dipl. kem., ki nam je nudila pomoč in podporo pri oblikovanju naše raziskovalne naloge ter nas vodila skozi celoten proces nastajanja le-te;
- Fakulteti za kemijo in kemijsko inženirstvo, kjer smo lahko izvedle del našega eksperimentalnega dela;
- dr. Emi Gričar, ki nas je usmerjala in nam pomagala pri izvedbi eksperimentalnega dela na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo;
- Zdenki Držaj, ki nam je pomagala pri izvedbi eksperimentalnega dela na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo;
- Gimnaziji Novo mesto, zlasti ravnateljici za odobritev in podporo dela, kemijskemu aktivu ter našima razredničarkama za vse opravičene ure;
- profesorici Suzani Krvavici za lektoriranje naloge.

## KAZALO VSEBINE

1	TEORETIČNI UVOD .....	1
1.1	NAVADNI POLH (GLIS GLIS).....	1
1.2	POLHANJE .....	2
1.2.1	POLHARSKA KULTURA.....	2
1.2.2	LOV NA POLHE .....	2
1.2.2.1	ZAKONSKI PREDPISI ZA POLHANJE .....	3
1.3	UPORABA POLHA.....	4
1.3.1	ODIRANJE .....	4
1.3.2	POLH V ZDRAVILSTVU.....	4
1.3.2.1	POLHOVA MAST .....	4
1.3.2.2	PRIPRAVA POLHOVE MASTI.....	5
1.3.2.3	SESTAVA POLHOVE MASTI .....	5
1.4	MAŠČOBNE KISLINE .....	6
1.4.1	STRUKTURA MAŠČOBNIH KISLIN .....	6
1.4.1.1	GLAVNE ZNAČILNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN.....	6
1.4.1.2	POIMENOVANJE MAŠČOBNIH KISLIN .....	6
1.4.1.3	KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN .....	6
1.4.2	VRSTE MAŠČOBNIH KISLIN .....	7
1.4.2.1	Palmitinska kislina .....	7
1.4.2.2	Stearinska kislina.....	7
1.4.2.3	Miristinska kislina .....	7
1.4.2.4	Oleinska kislina.....	8
1.4.2.5	Linolenska kislina .....	8
1.5	STEROIDI .....	8
1.5.1	HOLESTEROL .....	9
1.5.2	KORTIKOSTEROIDI.....	10
1.5.2.1	LOKALNI KORTIKOSTEROIDI.....	10
1.5.2.1	HIDROKORTIZON .....	12
1.5.2.2	KORTIKOSTERON .....	12
1.6	ANTIOKSIDANTI .....	13
1.6.1	VITAMIN E .....	13
1.6.1.1	Stabilnost E-vitamina .....	13
1.6.1.2	Pomanjkanje vitamina E .....	13

---

2	NAMEN DELA .....	14
2.1	CILJI.....	15
2.2	HIPOTEZE.....	15
3	METODE DELA.....	16
3.1	VOLUMETRIJSKE (TITRIMETRIČNE) METODE.....	16
3.1.1	Oksidacijsko-reduksijske titracije .....	16
3.1.1.1	Jodometrija.....	17
3.2	KROMATOGRAFSKE METODE.....	17
3.2.1	Stacionarna faza (SF) .....	18
3.2.2	Mobilna faza (MF) .....	18
3.2.3	Parametri v kromatografskih tehnikah.....	18
3.3	PLINSKA KROMATOGRAFIJA .....	18
3.3.1	Plinski kromatograf.....	18
3.3.1.1	Nosilni plin.....	19
3.3.1.2	Injektor.....	19
3.3.1.3	Kolona.....	19
3.3.1.4	Detektor.....	19
3.4	TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC) .....	20
3.4.1	HPLC kromatograf.....	20
3.4.1.1	Kromatografska kolona (stacionarna faza).....	20
3.4.1.2	Mobilna faza .....	20
3.4.1.3	Črpalka .....	21
3.4.1.4	Injektorji .....	21
3.4.1.5	Detektor .....	21
3.5	TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC).....	21
3.5.1	Stacionarna faza .....	21
3.5.2	Mobilna faza.....	21
3.5.3	Nanos in razvoj vzorcev .....	22
3.5.4	Vizualizacija kromatograma .....	22
4	EKSPERIMENTALNI DEL .....	23
4.1	NAČRT DELA .....	23
4.2	PRIPOMOČKI IN KEMIKALIJE .....	23
4.2.1	Laboratorijski pripomočki in steklovina .....	23
4.2.1.1	Titracije .....	23
4.2.1.2	Ekstrakcija in kromatografske tehnike.....	24

---

4.2.2	Kemikalije .....	24
4.2.3	Standardi.....	25
4.3	DOLOČANJE NEUMILJIVEGA DELA.....	25
4.3.1	Teoretične osnove.....	25
4.3.2	Raztopine reagentov in vzorcev .....	25
4.3.3	Opis postopka z izračunom .....	25
4.4	DOLOČANJE KORTIKOSTEROIDOV Z METODO HPLC IN PREVERJANJE METODE .....	28
4.4.1	Kromatografski parametri.....	28
4.4.2	Priprava raztopin standarda za umeritveno premico in linearnost metode .....	28
4.4.3	Priprava raztopin vzorca polhove masti.....	29
4.4.4	Opis postopka.....	29
4.4.5	Preverjanje HPLC metode za določanje kortikosteroidov.....	29
4.4.5.1	Selektivnost metode .....	29
4.4.5.2	Ponovljivost injiciranja standarda.....	29
4.4.5.3	Določitev LOD in LOQ.....	29
4.4.5.4	Stabilnost raztopin standardov.....	30
4.4.5.5	Linearnost metode .....	30
4.4.5.6	Točnost metode .....	30
4.5	TITRACIJSKO DOLOČANJE JODOVEGA ŠTEVILA.....	30
4.5.1	Teoretične osnove in enačbe reakcij .....	30
4.5.2	Priprava raztopin reagentov in vzorcev .....	31
4.5.3	Standardizacija 0,1 M Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	31
4.5.4	Opis postopka.....	32
4.6	TITRACIJSKO DOLOČANJE PEROKSIDNEGA ŠTEVILA .....	33
4.6.1	Teoretične osnove in enačbe reakcij .....	33
4.6.2	Raztopine reagentov in vzorcev .....	34
4.6.3	Opis postopka z izračunom .....	34
4.7	DOLOČANJE HOLESTEROLA Z METODO TLC .....	36
4.7.1	Priprava TLC plošče.....	36
4.7.2	Priprava vzorca .....	36
4.7.3	Priprava standardov .....	36
4.7.4	Mobilna faza.....	36
4.7.5	Raztopina za razvijanje kromatograma (identifikacijo lis).....	36
4.7.6	Postopek določitve holesterola v polžji masti .....	36
4.8	DOLOČANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE Z METODO GC .....	37

---

4.8.1	Kromatografski parametri.....	37
4.8.2	Topilo.....	37
4.8.3	Priprava plinskega kromatografa (GC).....	37
4.8.4	Raztopine reagentov in vzorci: .....	37
4.8.5	Priprava raztopin standarda.....	37
4.8.6	Priprava raztopin vzorcev .....	38
4.8.7	Identifikacija kromatografskih vrhov .....	38
4.8.8	Izbira maščobnih kislin za kvalitativno vrednotenje.....	39
4.8.9	Umeritvene premice estrov maščobnih kislin.....	39
4.8.10	Izračun vsebnosti maščobnih kislin v vzorcih.....	39
4.9	DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV.....	40
4.9.1	Teoretične osnove.....	40
4.9.2	Priprava raztopin .....	41
4.9.3	Opis postopka.....	41
4.10	DOLOČANJE E-VITAMINA Z METODO HPLC.....	41
4.10.1	Kromatografski parametri.....	41
4.10.2	Priprava raztopin standarda za linearnost metode in izračun v vzorcih.....	42
4.10.3	Priprava raztopin vzorca polhove masti.....	42
4.10.4	Opis postopka.....	42
5	REZULTATI S KOMENTARJI .....	44
5.1	DOLOČANJE NEUMILJIVEGA DELA.....	44
5.2	DOLOČANJE KORTIKOSTEROIDOV Z METODO HPLC IN PREVERJANJE METODE .....	46
5.2.1	Kromatogrami standardov obeh kortikosteroidov.....	46
5.2.2	Kromatogram vzorca in vzorca z dodanimi standardoma ter topila .....	47
5.2.3	Umeritveni premici hidrokortizona in kortikosterona ter določitev meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) za oba kortikosteroida .....	50
5.2.4	Določitev ponovljivosti injiciranja.....	54
5.2.5	Določitev stabilnosti raztopin standardov.....	55
5.2.6	Določitev kortikosteronov v vzorcih.....	55
5.3	DOLOČANJE JODOVEGA ŠTEVILA .....	57
5.3.1	Standardizacija 0,1 M Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	57
5.3.2	Določanje jodovega števila .....	57
5.4	TITRACIJSKO DOLOČANJE PEROKSIDNEGA ŠTEVILA .....	58
5.5	DOLOČANJE HOLESTEROLA Z METODO TLC .....	59
5.5.1	IDENTIFIKACIJA LIS IN DOLOČITEV KOLIČINE HOLESTEROLA.....	59

---

5.6 DOLOČANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE Z METODO GC .....	61
5.6.1 Kromatogrami.....	61
5.6.2 Identifikacija kromatografskih vrhov določevanih estrov maščobnih kislin .....	62
5.6.3 Umeritvene premice standardov estrov maščobnih kislin .....	62
5.6.4 Izračun masnih koncentracij estrov maščobnih kislin in masnih deležev maščobnih kislin v vzorcih	64
5.7 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV.....	66
5.8 DOLOČANJE E-VITAMINA Z METODO HPLC .....	66
5.8.1 Kromatogrami.....	66
5.8.2 Umeritvena premica E-vitamina .....	67
5.8.3 Izračun E-vitamina v vzorcih.....	68
6 RAZPRAVA.....	69
7 ZAKLJUČEK.....	71
8 VIRI .....	72
9 VIRI SLIK.....	77
10 PRILOGE .....	78
10.1 SPECIFIKACIJE STANDARDOV.....	78
10.1.1 STANDARD MEŠANICE ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN FAME MIX.....	78
10.1.2 HOLESTEROL .....	82
10.1.3 E-VITAMIN ( $\alpha$ -TOKOFEROL) .....	83
10.1.4 HIDROKORTIZON .....	84
10.1.5 KORTIKOSTERON.....	85

## KAZALO SLIK

Slika 1: Navadni polh (Navadni polh) .....	1
Slika 2: Globalna razširjenost polha Glis Glis (GBIF - Global Biodiversity Information Facility, 2024) .....	1
Slika 3: Pasti za polhe (Ogorelec, Dormouse trapping in southern Slovenia, 2022) .....	3
Slika 4: Odiranje polha (osebni arhiv) .....	4
Slika 5: Pridobivanje polhove masti. (osebni arhiv) .....	5
Slika 6: Racionalna formula palmitinske kisline (Merck, 2024) .....	7
Slika 7: Racionalna formula stearinske kisline (Merck, 2024) .....	7
Slika 8: Racionalna formula miristinske kisline (Merck, 2024) .....	8
Slika 9: Racionalna formula oleinske kisline (Merck, 2024) .....	8
Slika 10: Racionalna formula linolenske kisline (Merck, 2024) .....	8
Slika 11: Osnovni steroidni skelet (The Free Encyclopedia, 2024) .....	9
Slika 12: Skeletno racionalna formula holesterola (Merck, 2024) .....	10
Slika 13: Formula hidrokortizona (Merck, 2024) .....	12
Slika 14: Vitamin E (Merck, 2024) .....	13
Slika 15: Delitev kromatografskih tehnik na podlagi kemizma (Štrancar, 1998) .....	17
Slika 16: Shema plinskega kromatografa (Boris Pihlar, 2019) .....	19
Slika 17: Shema HPLC kromatografa, prirejeno po (Aryal, 2023) .....	20
Slika 18: Tankoplastna kromatografija (prirejeno po (The Arena Group Holdings, 2023)) .....	22
Slika 19: Identifikacija komponent na TLC kromatogramu, prirejeno po (Baniya, 2023) .....	22
Slika 20: Načrt dela naše raziskovalne naloge .....	23
Slika 21: Potek umiljenja in ekstrakcije .....	27
Slika 22: Neumiljivi ostanek po prvi in tretji analizi .....	27
Slika 23: Paralelki polhove masti 2023 po prekiniti rekciji pred titracijo .....	33
Slika 24: Raztopina vzorca, kalijevega jodida, kloroform in ocetne kisline pred začetkom titracije .....	34
Slika 25: Raztopina vzorca (polhova mast 2013) med titracijo po dodatku indikatorja škrobovice .....	35
Slika 26: Raztopina vzorca (polhova mast 2013) po končani titraciji .....	35
Slika 27: Nastanek emulzije pri spiranju .....	45
Slika 28: Kromatograma osnovnih raztopin standardov hidrokortizona ( $R_t = 3,744$ min) in kortikosterona ( $R_t = 5,065$ min) .....	46
Slika 29: Kromatogram vzorca iz prve analize neumiljivega dela z retencijskimi časi in pripadajočimi ploščinami (Area) .....	47
Slika 30: Kromatogram vzorca po prvi analizi neumiljivega dela z dodanimi standardoma, s pripadajočima ploščinama vrhov kortikosteroidov .....	48
Slika 31: Kromatogram topila .....	48
Slika 32: Primerjalna slika kromatogramov obenih standardov in vzorca prve analize neumiljivega dela .....	49
Slika 33: Podatki (retencijski časi in ploščine) vrhov kortikosteroidov .....	50
Slika 34: Kromatogram raztopine $S_{5,H}$ , ki ustreza LOD (zgornja slika) in kromatogram raztopine $S_{4,H}$ , ki ustreza LOQ (spodnja slika) .....	51
Slika 35: Umeritvena premica hidrokortizona z enačbo premice in korelacijskimi koeficientom, $R^2$ .....	52
Slika 36: Kromatogram raztopine $S_{5,K}$ , ki ustreza LOD (zgornja slika), in kromatogram raztopine $S_{4,K}$ , ki ustreza LOQ (spodnja slika) .....	53
Slika 37: Umeritvena premica kortikosterona z enačbo premice in korelacijskimi koeficientom, $R^2$ .....	54
Slika 38: Primerjalni kromatogram vzorca iz druge analize neumiljivega dela z retencijskimi časi in pripadajočimi ploščinami (Area) .....	56
Slika 39: Obdelana fotografija razvitega kromatograma .....	59

Slika 40: Kromatogram mešanice standarda Fame Mix z integriranimi odzivi izbranih maščobnih kislin .....	61
Slika 41: Kromatogram vzorca polhove masti iz leta 2013 .....	61
Slika 42: Kromatogram vzorca polhove masti iz leta 2020 .....	61
Slika 43: Kromatogram vzorca polhove masti iz leta 2023 .....	62
Slika 44: Umeritvene premice izbranih maščobnih kislin.....	64
Slika 45: Primerjalna epruveta ter epruvete s polhovimi mastmi (2013, 2020, 2023).....	66
Slika 46: Kromatogram topila, standarda in vzorca.....	67
Slika 47: Umeritvena premica E-vitamina .....	68

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Primera poimenovanja nasičene in nenasičene MK .....	6
Tabela 2: Jakost nekaterih lokalnih kortikosteroidov po ATC klasifikaciji, povzeto po (Medately, brez datuma) .....	11
Tabela 3: Pregled hidrokortizona v kremah ali mazilih .....	13
Tabela 4: Tipični reagenti pri redoks reakcijah (Helena Prosen, Praktikum iz analizne kemije, 2018)...	16
Tabela 5: Podatki o analizah neumiljivega dela.....	26
Tabela 6: Raztopine standarda hidrokortizona za umeritveno premico .....	28
Tabela 7: Raztopine standarda kortikosterona za umeritveno premico .....	29
Tabela 8: Natehte polhove masti in drugih olj za določanje jodovega števila.....	32
Tabela 9: Natehte polhove masti za določanje peroksidnega števila .....	34
Tabela 10: Raztopine za analizo holesterola s TLC .....	36
Tabela 11: Redčenje mešanice standarda Fame mix .....	38
Tabela 12: Mase polhove masti za določitev izbranih maščobnih kislin.....	38
Tabela 13: Koncentracije posameznih maščobnih kislin (estrov) v raztopinah standardov .....	39
Tabela 14: Mase spojin za raztopine .....	41
Tabela 15: Raztopine standarda E-vitamina za umeritveno premico .....	42
Tabela 16: Mase vzorcev polhove masti .....	42
Tabela 17: Podatki o analizah neumiljivega dela .....	44
Tabela 18: Redčitveni niz hidrokortizona za umeritveno premico .....	50
Tabela 19: Redčitveni niz kortikosterona za umeritveno premico .....	52
Tabela 20: Ponovljivost injiciranja standarda kortikosterona.....	54
Tabela 21: Stabilnost raztopin standardov kortikosteroidov.....	55
Tabela 22: Vsebnost kortikosteroidov v prvem vzorcu .....	55
Tabela 23: Standardizacija $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .....	57
Tabela 24: Jodovo število polhove masti in nekaterih drugih maščob .....	57
Tabela 25: Peroksidno število v vzorcih .....	58
Tabela 26: Retencijski časi estrov izbranih maščobnih kislin .....	62
Tabela 27: Podatki za maščobne kisline .....	62
Tabela 28: Koncentracije estrov maščobnih kislin v standardih ( $\gamma$ ) in ploščine (A) njihovih kromatografskih vrhov .....	63
Tabela 29: Rezultati masnih koncentracij estrov maščobnih kislin v vzorcih.....	65
Tabela 30: Rezultati masnih deležev maščobnih kislin v vzorcih.....	65
Tabela 31: Odvisnost ploščine vrha E-vitamina od koncentracije (podatki za umeritveno premico) .....	67
Tabela 32: Izračun vsebnosti E-vitamina v vzorcih .....	68

## KAZALO ENAČB

Enačba 1: Formule za izračun koncentracije analita pri titraciji (Kolar, 2008) .....	16
Enačba 2: Formula za izračun neumiljivega dela z legendo .....	27
Enačba 3: Kemikska enačba reakcije med Wijsovim reagentom ICl in dvojno vezjo .....	30
Enačba 4: Kemikske enačbe reakcije Wijsovega reagenta s kalijevim jodidom ter reakcija sproščenega joda z natrijevim tiosulfatom.....	31
Enačba 5: Kemikska enačba reakcije standardizacije $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .....	31
Enačba 6: Množinsko razmerje in izračun za standardizacijo $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .....	32
Enačba 7: Formula za izračun jodovega števila z legendo (Arnes.si, 2024) .....	32
Enačba 8: Enačbe reakcij pri določanju peroksidnega števila (The international fragrance association, 2011) .....	33
Enačba 9: Formula za izračun peroksidnega števila (European Pharmacopoeia 7nd Edition, 7.0 Volume 1, 2020).....	35
Enačba 10: Enačba umeritvenih premic .....	39
Enačba 11: Izračun masne koncentracije estra maščobne kisline in masnega deleža maščobne kisline v vzorcu z legendo .....	40

## 1 TEORETIČNI UVOD

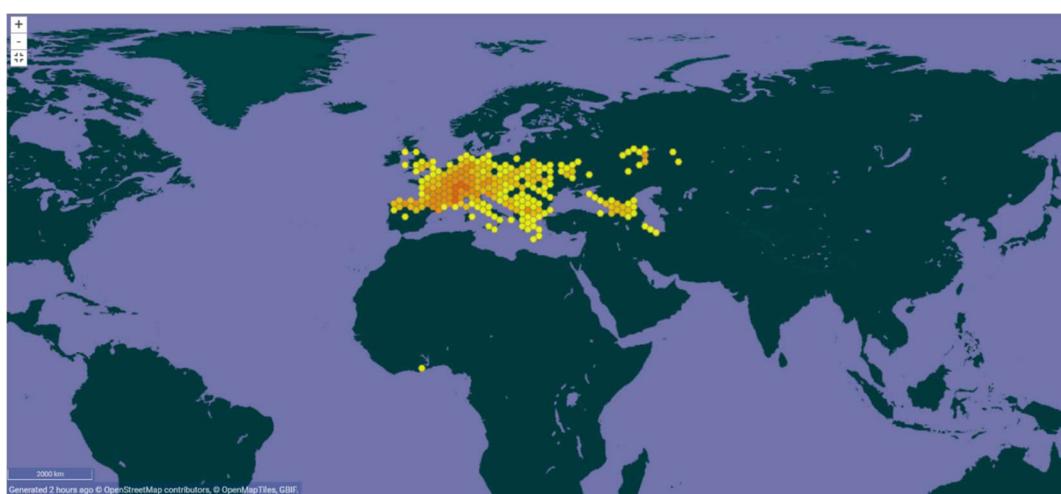
### 1.1 NAVADNI POLH (GLIS GLIS)

Polhi spadajo v eno izmed 33 družin reda glodavcev. So živi fosili, saj so ena najstarejših, verjetno kar najstarejša vrsta glodavcev. Poznamo 28 vrst polhov, ki jih razvrščamo v 10 rodov. V naši raziskovalni nalogi smo se osredotočile na polha iz rodu navadni polh (*Glis*), ki ima eno samo živečo vrsto (*Glis Glis*) (slika 1). Vse naše nadaljnje raziskave in ugotovitve temeljijo na tej vrsti. Obstaja tudi več podvrst te vrste, ki pa jih v okviru te raziskovalne naloge nismo ločevale. (Boris Kryštufek, 2007)



Slika 1: Navadni polh (Glis Glis)

Navadni polh je razširjen po Evropi, v severnem delu Turčije, na Kavkazu in v severnem delu Irana. Območje njegove razširjenosti se večinoma prekriva z listnatimi in mešanimi gozdovi (slika 2). (Boris Kryštufek, 2007)



Slika 2: Globalna razširjenost polha Glis Glis (GBIF - Global Biodiversity Information Facility, 2024)

V Sloveniji navadnega polha najdemo predvsem v kraškem svetu (Dolenjska, Notranjska). Glede na prekrivanje razširjenosti polha z listnatimi in mešanimi gozdovi lahko upravičeno

domnevamo, da je to njegov življenjski prostor. Največ polhov živi v bukovih in hrastovih gozdovih, v predalpskem svetu pa ga najdemo tudi v vlažnih smrekovih sestojih. (Boris Kryštufek, 2007)

Navadno živi v skupinah. Gnezdi v drevesnih duplih, skalnih razpokah ali v praznih gnezdih večjih ptic. Aktiven je predvsem ponoči, ko si išče hrano. Hrani se z gozdnimi sadeži, bukovim žirom, lešniki, sadjem in z majhnimi žuželkami. (Boris Kryštufek, 2007)

Navadni polh se pari od srede junija dalje. Samica po šestih tednih (od avgusta do septembra) skoti povprečno štiri mladiče, ki so po dveh mesecih samostojni, po enem letu pa spolno zreli. Življenjska doba polha je pet do sedem let. (Boris Kryštufek, 2007)

Oktobra žival začne z zimskim spanjem, ki traja do sedem mesecev. Med hibernacijo lahko polh izgubi tudi do polovice telesne teže. (Boris Kryštufek, 2007)

Polhi imajo valjast trup, majhno glavo, ozek gobček in velike oči. Ušesa so precej velika, skoraj gola, brki pa nenavadno dolgi. Odrasla žival je dolga od 16 do 18 cm. V povprečju tehta okoli 125,3 g, vendar se ta masa nanaša na osebke, ki še niso začeli kopičiti telesne maščobe. Gost kožuh je zgoraj pepelnato siv, po bokih rjavkast, na spodnji strani pa bel. Košat, od 13 do 15 cm dolg rep je na zgornji strani modrikasto siv, spodaj pa ima belo vzdolžno črto. Imajo sorazmerno kratke in šibke noge, sprednje imajo štiri prste, zadnje noge pa pet prstov. (Boris Kryštufek, 2007)

## 1.2 POLHANJE

### 1.2.1 POLHARSKA KULTURA

Polharstvo ima v Sloveniji več kot dvatisočletno tradicijo. Prvič je bilo posredno omenjeno okrog leta 1240 v prispevku "O lastnostih stvari" Bartolomeja Angleškega. Območje polhovega lova je obsegalo večino Slovenije, še posebej Notranjsko in Dolenjsko. V gospodarskem pomenu sta bila glavna razloga za lov predvsem človekovo preživetje in oblačenje. V začetku 20. stoletja so imeli tudi gospodarsko korist z odstranjevanjem polha kot gozdnega škodljivca. V drugi polovici 20. stoletja se je začel zmanjševati lov na polhe, saj je upadla tudi populacija polhov zaradi krčenja gozdnih površin. Po večini se je po drugi svetovni vojni gospodarski vidik polharstva spremenil iz prvotne ekonomske potrebe v družaben dogodek z namenom ohranjanja tradicije. (Boris Kryštufek, 2007) Dandanes je polharska kultura pogojena z zakoni. Lov na polhe je zakonsko dovoljen v Sloveniji in na Hrvaškem, aktivno pa se izvaja le v južnih delih Slovenije in severnem delu Hrvaške. Zasledimo ga tudi na nekaterih hrvaških otokih. (Ogorelec, Dormouse trapping in southern Slovenia, 2022)

### 1.2.2 LOV NA POLHE

Polharji so zaposleni celo leto: pozimi odkrivajo polšine (podzemne jame), spomladti opazujejo cvetenje dreves, katerih plod predstavlja hrano za polhe, kot na primer bukev in hrast, jeseni pa oprezajo za polhi in jih lovijo. V Sloveniji je polharska sezona odprta dva meseca (oktober in november). Polhe lahko večinoma ulovimo v začetku oktobra, saj kasneje preidejo v zimsko spanje. (Ogorelec, Dormouse trapping in southern Slovenia, 2022) Polha najbolj privlači vaba, ki

jo lahko zavoha tudi sto metrov daleč. Največkrat so za vabo uporabljali suho ali sveže sadje – krhlje jabolk in hrušk ali tisto, kar so dobili v gozdu (lesnika, lešniki, orehi, želod, kostanj), ki so ga namočili v žganju. Na lov na polhe so hodili posamično ali v skupinah, odvisno od bližine in trajanja polhanja. (Boris Kryštufek, 2007)

Lov na polhe se je skozi zgodovino spreminjal. Prve podatke o tem, kako so pri nas lovili polhe, lahko zasledimo pri Valvazorju. Omenja tri načine: prvi način je bil duplanje. Polharji so pihali (včasih tudi z dimom) ali s palico bezali v votla drevesa in tako pregnali polha iz dupla ter ga ujeli. Drugi način je lov s pastmi (slika 3), ki jih nastavlja po drevesih. Tretji način pa je lov na polšinah (podzemne Jame) z nastavljanjem skrinj, nekakšnih škatlic, v katere lahko polh smukne, a iz njih ne more ven. (Boris Kryštufek, 2007)



Slika 3: Pasti za polhe (Ogorelec, Dormouse trapping in southern Slovenia, 2022)

#### 1.2.2.1 ZAKONSKI PREDPISI ZA POLHANJE

V današnjem času mora biti polhanje nadzorovano, upoštevati je treba zakonsko ureditev. Pravno ureditev polhanja opredeljuje Zakon o divjadi in lovstvu. V njem je opredeljen pojmom polhanje, ki pomeni lov polhov s pastmi. Za polhanje ni potreben lovski izpit, potrebna pa je polharska dovolilnica, ki jo predpiše ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Posamezniku jo izda upravljačec, za svoje člane pa registrirano polharsko društvo. (Služba Vlade RS za zakonodajo, 2024)

Vsa zakonodaja s področja lova kot tudi zaščite narave in živalskih vrst v naravi, vključno z vsemi obrazci in dovolilnicami, je zbrana na spletni strani Lovske zveze Slovenije. (Lovska zveza Slovenije, 2024) Tu so navedene tudi lovne dobe, polhanje je tako dovoljeno od 1. oktobra do 30. novembra. (Lovska zveza Slovenije, 2024)

## 1.3 UPORABA POLHA

### 1.3.1 ODIRANJE

Preden polha uporabimo, ga moramo ustrezno pripraviti, tako da ga odremo. Polha najprej slečejo iz kože (slika 4). Kožo uporabijo za oblačila ali jo zavržejo, meso pa je uporabno v prehrani. Odvisno od starosti in fizičnega stanja živali se več ali manj maščobe nalaga pod kožo, na telesu in v telesni votlini okoli ledvic. To maščobo je treba odstraniti in shraniti za prihodnjo uporabo.



Slika 4: Odiranje polha (osebni arhiv)

Po odprtju telesne votline je treba vse ostale organe zavreči, le pljuča in ledvice so uporabne za prehrano. Po odiranju in obdelavi polha smo dobili tri uporabne dele: kožo, meso in maščobo. (Ogorelec, Skinning and processing of dormice in Slovenia, 2023)

### 1.3.2 POLH V ZDRAVILSTVU

#### 1.3.2.1 POLHOVA MAST

Prvi zapisi o uporabi polhove masti proti telesnim poškodbam segajo v 16. stoletje, ko je sienski zdravnik Pietro Andrea Mattioli v svojih medicinskih knjigah pisal o polhovem olju, ki služi kot zdravilo za mnoge bolezni. Danes lahko o zdravilnih učinkih polhove masti najdemo zapise priznanih zeliščarjev, kot so pater Ašič, Ivan Maršič, Jože Majes in drugi. (POLHOVA MAST / OLJE tradicionalno ljudsko zdravilo, 2021) Polhovo mast v zdravilstvu torej uporabljam vsaj od 16. stoletja naprej kot zdravilo za zunanje in notranje bolezni pri ljudeh in živalih. Z njo so mazali rane, opeklime, kožne lišaje in razpokano kožo. Z njo so zdravili tudi bolezni pri domačih živalih, zlati pri govedu, konjih in prašičih. Tudi danes ima polhova mast široko paleto uporabne vrednosti. Uporablja se kot mazilo pri ozeblinah, opeklinah, odprtih ranah, urezih, odrgninah, hemoroidih, prhljaju, luskavici, revmi, za nego suhe kože, pri herpesu, strijah, aknah, pleničnih izpuščajih ipd. (Boris Kryštufek, 2007) Uporablja se tudi kot zdravilo za notranje bolezni pri vnetju v ustih, angini, bolečinah v prsih, hudem kašlu, zaprtju in pri ranah na želodcu ter na dvanajstniku in pri vnetih ušesih. (POLHOVA MAST / OLJE tradicionalno ljudsko zdravilo, 2021) Ustni viri navajajo, da naj bi polhova mast pomagala celo pri zdravljenju rakastih obolenj na želodcu in debelem črevesu. (Boris Kryštufek, 2007)

### 1.3.2.2 PRIPRAVA POLHOVE MASTI

Z odrtih kožic in mesa se najprej obere vsa maščoba. Zbrano maščobo se v ponvi počasi tali. Maščobo je treba previdno segrevati, da se ta zgolj razpusti (slika 5) in da ocvirki ne zarumenijo. Ne sme se je prežgati, saj bi s tem izgubila precej zdravilnih lastnosti. Iz ocvirkov danes le iztisnejo olje, včasih pa so jih uporabljali. Prav tako se maščoba pri cvrtju ne sme soliti. Ko je mast oziroma olje razpuščeno, ga je treba precediti in prelititi v steklenice ter dobro zamašiti.



Slika 5: Pridobivanje polhove masti. (osebni arhiv)

Polhova mast ostane tudi pri  $-36^{\circ}\text{C}$  tekoča. Za pol litra polhove masti je potrebno približno deset debelih polhov. (Boris Kryštufek, 2007)

### 1.3.2.3 SESTAVA POLHOVE MASTI

Raziskav o sestavi polhove masti je zelo malo. Eno prvih raziskav glede sestave polhove masti so izvedli na Hrvaškem; v polhovi masti so odkrili tako nasičene kot tudi nenasičene maščobne kisline. Največji delež nasičenih maščobnih kislin sta predstavljali stearinska kislina (približno 5–9 %) in palmitinska kislina (približno 13–18 %). Največji del enojno nenasičenih maščobnih kislin je predstavljala oleinska kislina (približno 48 % pri samcih in 63 % pri samicah). Največji del večkrat nenasičenih maščobnih kislin pa je predstavljala lionolenska kislina (približno 9 % pri samicah in 11 % pri samcih). (Lana Pađen, 2024) Še najbolje raziskan del polhove masti je njena maščobno kislinska sestava, medtem ko vsebnost ostalih snovi skoraj ni preučena. Edini vir, ki smo ga zasledile, je bila diplomska naloga iz leta 1990, v kateri so dokazali prisotnost miristinske kisline (8–12 %), oleinske kisline (45–56 %) in linolejske kisline (24–34 %), dokazali pa so tudi prisotnost kortikosteroidov (hidrokortizona, kortikosterona ter progesterona). (Janežič, 1990)

## 1.4 MAŠČOBNE KISLINE

### 1.4.1 STRUKTURA MAŠČOBNIH KISLIN

Maščobne kisline (MK) vsebujejo polarno karboksilno skupino (-COOH), ki je vezana na nerazvezano aifatsko verigo. Maščobne kisline so amfifilne molekule, saj imajo lahko zaradi svojih strukturnih značilnosti dvojno naravo. Konec, kjer se nahaja karboksilna skupina, je polaren in včasih ionski, medtem ko ima konec, kjer se nahaja ogljikovodikova veriga, nepolarne lastnosti. V celicah in tkivih so MK večinoma povezane v maščobe (triacilglicerole), le redko jih najdemo v prosti obliki. V MK je število C-atomov lahko različno, od 4 C-atomov (v surovem maslu) do 36 C-atomov (v možganih). V naravi najdemo predvsem MK, ki vsebujejo od 12 do 24 C-atomov, najpogosteje pa so tiste s 16 (palmitinska in palmitoleinska kislina) in 18 (stearinska, oleinska, linolna in linolenska kislina) C-atomi. (Boyer, 2005)

#### 1.4.1.1 GLAVNE ZNAČILNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN

Skoraj vse MK imajo sodo število ogljikovih atomov. Ogljikovodikova veriga je praviloma nerazvezana. V njej so C-atomi lahko povezani le z enojnimi vezmi, kar imenujemo nasičene MK. Lahko pa so C-atomi povezani z eno ali več dvojnimi vezmi, kar imenujemo nenasicičene MK. Mononenasičene MK imajo dvojno vez večinoma med C-atomoma 9 in 10. Dinenasičene MK pa imajo drugo dvojno vez ponavadi med C-atomom 12 in 13. Večkratne dvojne vezi niso konjugirane, temveč so ločene z metilensko skupino. MK, ki imajo dve ali več dvojnih vezi, imenujemo polinenasičene. V naravnih MK je konfiguracija ob dvojni vezi skoraj vedno *cis*. (Boyer, 2005)

#### 1.4.1.2 POIMENOVANJE MAŠČOBNIH KISLIN

Zaradi velike raznolikosti MK je bil razvit poseben sistem okrajšav. Ta nam pove število C-atomov, število dvojnih vezi med C-atomi in njihov položaj. Poleg sistemskega poimenovanja maščobnih kislin poznamo tudi trivialnega, ki se uporablja pogosteje. Primera poimenovanj sta navedena v tabeli 1. (Boyer, 2005)

Tabela 1: Primera poimenovanja nasičene in nenasicičene MK

CH <sub>3</sub> [CH <sub>2</sub> ] <sub>14</sub> COOH	
Trivialno ime	palmitska kislina
Sistematsko ime	heksdecanojska kislina
Okrajšan simbol	C16:0

CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH[CH <sub>2</sub> ] <sub>7</sub> COOH	
Trivialno ime	Linolenska kislina
Sistematsko ime	Oktodeka-9,12,15-trienojska kislina
Okrajšan simbol	C18:3( $\Delta^{9,12,15}$ )

#### 1.4.1.3 KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN

MK so slabo topne v vodi, dobro pa se topijo v organskih topilih (alkohol, heksan, dietileter). Dolžina verige MK vpliva na topnost v vodi. Daljša, kot je veriga MK, slabša je topnost v vodi.

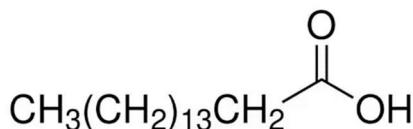
Nasičene MK z deset ali več C-atomi so pri sobnih pogojih podobne voskom. Pri enakih pogojih so vse nenasiciene MK in vse nasičene MK z manj kot deset C-atomi v obliki olja. Nenasiciene MK se na mestu, kjer je dvojna vez, upognejo, zato se take molekule, kadar se združujejo v aggregate, ne morejo urediti tako tesno, kot se lahko uredijo nasičene MK z iztegnjenimi (nasičenimi) verigami. Kljub temu da so MK z daljšimi verigami netopne v vodi, so topne v razredčenih vodnih raztopinah NaOH in KOH. To omogoča reakcijo umiljenja, pri kateri nastanejo natrijeve in kalijeve soli kislin, ki jih sicer imenujemo mila. (Boyer, 2005)

### 1.4.2 VRSTE MAŠČOBNIH KISLIN

Poznamo nasičene in nenasiciene MK. Nenasiciene MK, ki so nujno potrebne za delovanje človeškega organizma, a jih telo ne more proizvesti samo, imenujemo esencialne MK. Človek te lahko v telo vnese s hrano. Poznamo dve skupini esencialnih MK, in sicer omega-3 (najpomembnejša je linolenska) MK in omega-6 (najpomembnejša je linolna) MK. (Arsovski, 2024)

#### 1.4.2.1 Palmitinska kislina

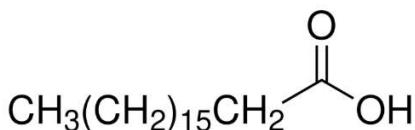
Palmitinska ali heksadekanojska kislina (slika 6) z molekulsko formulo  $C_{16}H_{32}O_2$  in oznako C16:0 je ena izmed najpogostejših nasičenih MK v rastlinah, mikroorganizmih in živalih. Najdemo jo lahko v mesu, sirih, mlečnih izdelkih ter maslu. Iz imena lahko razberemo, da je glavna sestavina palmovega olja. V palmitinsko kislino se lahko pretvori tudi presežek ogljikovih hidratov. Uporablja se tudi za proizvodnjo kozmetike, mil in industrijskih sredstev za odstranjevanje plesni. (HMDB, 2023)



Slika 6: Racionalna formula palmitinske kislinske (Merck, 2024)

#### 1.4.2.2 Stearinska kislina

Stearinska ali oktadekanojska kislina (slika 7) z molekulsko formulo  $C_{18}H_{36}O_2$  in oznako C18:0 je nasičena MK, ki jo najdemo v različnih rastlinskih in živalskih maščobah in oljih. Je voskasta z rahlim vonjem po loju, kar nam pove že njeno ime, saj izhaja iz grške besede *stear*, kar pomeni loj. Zaradi dolge nepolarne alkilne verige je v vodi slabo topna, bolje pa se razaplja v organskih topilih (etanol, izopropanol). Uporablja se v kozmetični, gumarski in tudi živilski industriji. (HMDB, 2024)

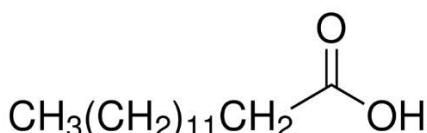


Slika 7: Racionalna formula stearinske kislinske (Merck, 2024)

#### 1.4.2.3 Miristinska kislina

Miristinska ali tetradekanojska kislina (slika 8) z molekulsko formulo  $C_{14}H_{28}O_2$  in oznako C14:0 je nasičena dolgoverižna MK, ki vsebuje 14 C-atomov. Je močno hidrofobna molekula, ki jo lahko

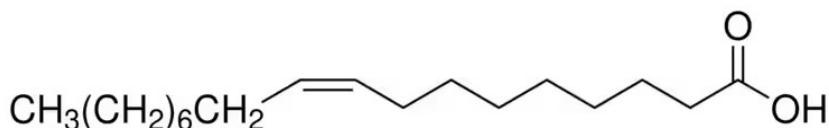
zaznamo kot trdno oljnato belo snov. Najdemo jo v večini živalskih in rastlinskih maščob, predvsem v masleni maščobi. Najdemo jo tudi v kokosovem, palmovem in muškatnem olju. V industriji jo uporabljajo za sintezo različnih aromatičnih spojin, pa tudi kot sestavino v milih in kozmetiki. Miristinska kislina je znana po tem, da se v telesu kopiči kot maščoba, a ima kljub temu pozitiven vpliv na delovanje srca in ožilja. Ime je dobila po muškatnem oreščku.



Slika 8: Racionalna formula miristinske kisline (Merck, 2024)

#### 1.4.2.4 Oleinska kislina

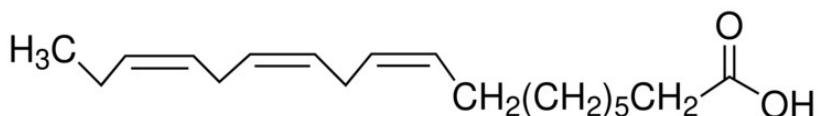
Oleinska ali 9-cisoktadecenojska kislina (slika 9) je mononenasničena MK z 18 C-atomi. Njena molekulska formula je C18H34O2 in oznaka C18:1( $\Delta^9$ ). Ta kislina je ena najbolj razširjenih MK v naravi. Nahaja se v različnih živalskih in rastlinskih oljih in maščobah. Prepoznamo jo kot brezbarvno olje, ki nima vonja. Oleinska kislina je najbolj zastopana MK v človeškem maščobnem tkivu. Največ je lahko najdemo v rastlinskih oljih, kot so olivno, repično, mandljevo in makadamijovo olje. Uporablja se pri proizvodnji površinsko aktivnih snovi, mil in mehčalcev. Prav tako se uporablja kot emulgator v živilskih in farmacevtskih izdelkih. (HMDB, 2024)



Slika 9: Racionalna formula oleinske kisline (Merck, 2024)

#### 1.4.2.5 Linolenska kislina

Linolenska ali oktadeka-9,12,15-trieonjska kislina (slika 10) je polinenasničena in esencialna MK z molekulske formulo C18H30O2 in oznako C18:3( $\Delta^{9,12,15}$ ). Z linolensko kislino so še posebej bogati nekateri oreščki in rastlinska olja. Je pomembna komponenta membran, saj vpliva na lastnosti celičnih membran, kot so prožnost, prepustnost in aktivnost membransko vezanih encimov. (kislina L. , 2024)

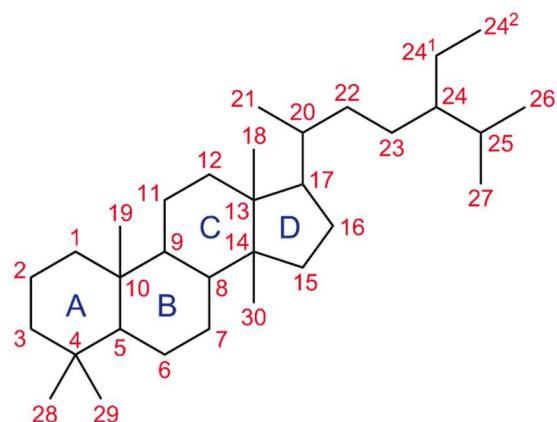


Slika 10: Racionalna formula linolenske kisline (Merck, 2024)

## 1.5 STEROIDI

Steroidi so ena izmed najbolj poznanih in raziskanih lipidnih skupin. Osnovno kemijsko strukturo steroidov oz. steroidni skelet sestavljajo trije šestčlenski in en petčlenski obroč (slika 11). Imenujemo jo ciklopantanoperhidrofenantren in je skupna vsem kortikosteroidom. (Thomas L. Lemke, 2012)

Različni steroidi se razlikujejo po številu in položaju dvojnih vezi, vrsti in številu funkcionalnih skupin in stranski verigi. Najbolj poznan steroid je holesterol. (Boyer, 2005)



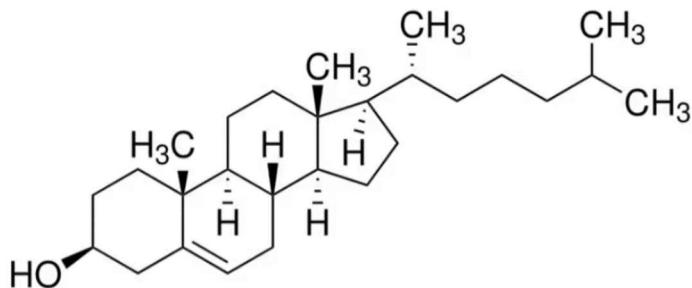
Slika 11: Osnovni steroidni skelet (The Free Encyclopedia, 2024)

### 1.5.1 HOLESTEROL

V živalskih maščobah in oljih je holesterol prevladujoči steroid, v rastlinskih oljih je prisoten le v zanemarljivih količinah. Ima številne pomembne biološke vloge in je potreben za zdravje ljudi. Ker je netopen v vodi, se z beljakovinami poveže v vodi topne lipoproteine (HDL in LDL). Visoke ravni holesterola v krvi vodijo v razvoj ateroskleroze, zato je holesterol množično obravnavan kot slab. A funkcije holesterola vključujejo mnoge pomembne procese: prepustnosti membran, vzdrževanje strukture membran, delovanje osrednjega živčnega sistema, razvoj sperme in razvoj zarodka. (Goldson-Barnaby, 2024)

Holesterol je predhodna molekula za izgradnjo steroidnih hormonov (estradiol, testosteron in kortizol) in žolčnih kislin (holna kislina, glikoholna kislina). Žolčne kisline nastanejo z encimsko kataliziranimi oksidacijami na obročem sistemu holesterola. Imajo kisle funkcionalne skupine, ki pri fiziološkem pH razpadajo, in nastanejo soli žolčnih kislin. Te se skladiščijo v žolčniku ter se izločajo v črevesje, kjer pomagajo pri razgradnji in absorpciji zaužitih maščob. (Boyer, 2005)

Holesterol ima na prvem obroču A (slika 12) vezano hidroksilno skupino, kar je polarni del molekule, t. i. polarna glava (amfifilna molekula). Nepolarni rep holesterola je sestavljen iz obroča B, na katerem je dvojna vez, preostalih dveh obročev, C in D, ter nanje vezane verige ogljikovodikov. Hidroksilna skupina je kemijsko najbolj reaktivna del holesterola. Ta je v fizioloških razmerah navadno zaestrena z maščobno kislino. (Boyer, 2005)



Slika 12: Skeletno racionalna formula holesterola (Merck, 2024)

### 1.5.2 KORTIKOSTEROIDI

Kortikosteroidi so velika skupina steroidnih hormonov, ki se izločajo iz nadledvične žleze, kjer nastajajo iz prekurzorja holesterola. Delimo jih na mineralokortikoide in glukokortikoide, glede na njihove fiziološke funkcije. Mineralokortikoidi uravnavajo transport elektrolitov in posledično vode predvsem v ledvicah, kjer se izmenjujeta natrij in kalij. Natrij se veže nazaj v telesne tekočine, kalij pa v izloček. Najpomembnejši predstavnik je aldosteron. Glukokortikoidi sodelujejo pri presnovi maščob, ogljikovih hidratov in beljakovin. Pomembno je njihovo protivnetno delovanje in vpliv na nastajanje glukoze (glukoneogeneza) v jetrih. Glavni predstavnik je kortizol. (Thomas L. Lemke, 2012)

Pri številnih bolezenskih stanjih se kot zdravila uporabljajo sintetični glukokortikoidi. Zaradi njihovega protivnetnega in imunosupresivnega delovanja (zaviranje imunskega odziva) se večina sinteznih glukokortikoidov uporablja pri zdravljenju vnetnih stanj. (Thomas L. Lemke, 2012)

#### 1.5.2.1 LOKALNI KORTIKOSTEROIDI

Lokalni (strokovno topikalni) kortikosteroidi so zdravila, ki se nanašajo na kožo za zdravljenje različnih dermatoloških bolezni, kot so atopični dermatitis, izpuščaji, ekcemi in luskavica. (Alldredge, in drugi, 2012)

##### 1.5.2.1.1 MEHANIZEM DELOVANJA

Lokalni kortikosteroidi delujejo protivnetno, imunosupresivno (zavirajo imunski odziv), antimitotično (zavirajo rast celic) in vazokonstriksionsko (zmanjšajo premer krvnih žil). (J A Miller, 1980) (Luís Uva, 2012)

#### PROTIVNETNO DELOVANJE

Protivnetno delovanje kortikosteroidov je nespecifično, saj v tkivih zavirajo vnetno reakcijo ne glede na to, ali je njen izvor mehanski, kemični, imunski ali pa posledica delovanja mikrobov. To je razlog, da se uporabljajo pri širokem spektru akutnih in kroničnih vnetnih obolenj.

Kortikosteroidi zavirajo tvorbo, sporočanje in delovanje endogenih kemičnih dejavnikov, na primer: zaviranje delovanja histamina. (J A Miller, 1980)

#### IMUNOSUPRESIVNO DELOVANJE

Kortikosteroidi zavirajo delitev nezrelih limfnih celic in zadržujejo zrele limfocite v različnih delih krvnega obtoka ter tako zmanjšajo število limfocitov. (J A Miller, 1980)

## ANTIMITOTSKO DELOVANJE

Kortikosteroidi zavirajo delitev več vrst celic. Preprečuje tudi delitev celic v zarodni plasti kože pri človeku. To dobro pojasni vsaj nekatere terapevtske učinke kortikosteroidov pri luskavici. (J A Miller, 1980)

## VAZOKONSTRIKCIJSKO DELOVANJE

Kortikosteroidi povzročijo skrčitev žil, zardi česar se pretok krvi na vnetnem mestu zmanjša. Vazokonstrikcija, imenovana tudi "bledenje", kadar gre za površino kože, je osnova standardnega testa za oceno moči lokalnih glukokortikoidov. (Luís Uva, 2012)

### 1.5.2.1.2 JAKOST LOKALNIH KORTIKOSTEROIDOV

Lokalni kortikosteroidi so razvrščeni v štiri razrede (tabela 2) po jakosti glede na njihovo zmožnost kapilarne vazokonstrikcije (zmanjšanja premera kapilar). (Thomas L. Lemke, 2012)

Lokalni kortikosteroidi z nizko jakostjo so zaradi zmernega protivnetnega delovanja najprimernejši za zdravljenje kroničnih bolnikov, dojenčkov in majhnih otrok ter so najvarnejši za uporabo na tanki koži obraza. Kortikosteroidi s srednjo jakostjo se uporabljajo za zdravljenje zmernih vnetnih kožnih bolezni. Uporabljam jih lahko tudi na obrazu in na mestih, kjer je koža tanka, to je na mestih stika (npr. med komolci, med stegni, pod dojkami ...), vendar samo za omejen čas trajanja terapije. Pripravki z visoko jakostjo so namenjeni za uporabo pri hujših oblikah dermatitisov in luskavice, vendar samo za krajši čas, razen na obolelih mestih, kjer je koža debelejša. Kortikosteroidni pripravki z zelo visoko jakostjo so namenjeni uporabi pri zdravljenju hujših oblik kronične luskavice in diskoidnega lupusa eritematozusa. Uporaba je omejena na krajši čas in na manjše površine kože. (Thomas L. Lemke, 2012)

Tabela 2: Jakost nekaterih lokalnih kortikosteroidov po ATC klasifikaciji, povzeto po (Medately, brez datuma)

Razred I: šibka jakost	Razred II: srednja jakost	Razred III: visoka jakost	Razred IV: zelo visoka jakost
Metilprednizolon Hidrokortizon Prednizolon	Klobetazon Hidrokortizonbutirat Flumetazon Fluokortin Fluperolon Fluorometolon Fluprednid Dezonid Triamcinolon Alklometazon Hidrokortizonbuteprat Deksametazon Klokortolon	Betametazon Fluklorolon Dezoksimetazon Fluokinolonacetomid Fluokortolon Diflukortolon Fludroksikortid Fluokinonid Budezonid Diflazon Amcinonid Halometazon Mometazon	Klobetazol Halcinonid

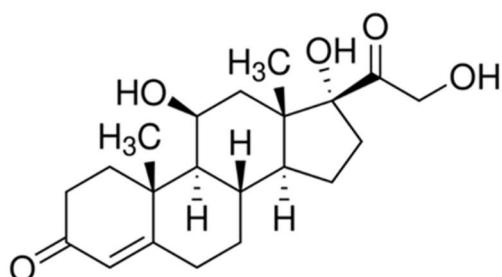
#### 1.5.2.1.3 NEŽELENI UČINKI LOKALNIH KORTIKOSTEROIDOV

Možnost pojava neželenih učinkov je odvisna od pogostosti mesta aplikacije, jakosti lokalnega kortikosteroida, trajanja terapije in posameznega bolnika. (Thomas L. Lemke, 2012) Najpogostejši neželeni učinek je zmanjšanje kolagena v podkožju, kar lahko vodi k tanjšanju kože, pojavu strij, modric in razširjenih kapilar. Dolgotrajna uporaba lahko povzroči povečanje oz. zmanjšanje pigmenta v koži in laseh, povečano poraščenost, nastanek pekočih izpuščajev in srbenje kože. Kortikosteroidi s svojim delovanjem zavirajo imunski sistem. Nekateri neželeni učinki, kot so razširjene kapilare in strije, so nepovratni, večina pa jih izgine nekaj mesecev po končani terapiji. Pri dolgotrajni uporabi (nekaj tednov do mesecev) se lahko na območjih aplikacije lokalnih kortikosteroidov pojavi akne in perioralni dermatitis.

Le redko lahko pride do sistemske absorpcije lokalnih kortikosteroidov ter posledičnih sistemskih neželenih učinkov. Ti se lahko pojavijo pri daljši, večtedenski do večmesečni uporabi kortikosteroidnih pripravkov visoke jakosti na večjih površinah kože v kombinaciji z okluzivnim povojem. Med temi učinki je najpogostejši zaviranje izločanja hormonov iz skorje nadledvične žleze. Sistemski neželeni učinki izginejo po prekinitvi zdravljenja. (Thomas L. Lemke, 2012) (ZZZS, 2021)

##### 1.5.2.1 HIDROKORTIZON

Hidrokortizon (Slika 13) je prvi sintezišni glukokortikoid, ki so ga začeli uporabljati za lokalno zdravljenje dermatoloških bolezni. Njegova kemijska struktura je osnova za nadaljnje kemijske modifikacije, s katerimi so spreminali lastnosti novejših topikalnih kortikosteroidov, tako da imajo močnejše protivnetno delovanje in izboljšane farmakokinetične lastnosti. (Thomas L. Lemke, 2012)



Slika 13: Formula hidrokortizona (Merck, 2024)

##### 1.5.2.2 KORTIKOSTERON

Kortikosteron je steroidni hormon z 21 ogljikovimi atomi, ki je sintetiziran v nadledvični skorji. Pomembno vlogo ima pri glodavcih, pticah, plazilcih in dvoživkah, saj kot glavni glukokortikoid nadzira presnovo in odziv na stres. Pri ljudeh je aktivnost kortikosterona šibka. Kortikosteron sicer je koristen za diagnozo določenih bolezni, vendar se za razliko od kortizola ne uporablja za klinično zdravljenje. (Hironori Ando, 2021)

Glede na Bazo podatkov o zdravilih je na trgu le ena krema z učinkovino lokalnega kortikosteroida šibke jakosti I, hidrokortizona (tabela 3). (JAZMP, 2024)

Tabela 3: Pregled hidrokortizona v kremah ali mazilih

Kortikosteroid	Jakost	Zdravilo (krema)	Vsebnost kortikosteroida v zdravilu	Terapevtska učinkovitost
hidrokortizon	razred I	Zoviduo	10 mg/1g krema	1 %

Zdravila s kortikosteroidi niso namenjena samozdravljenju. Na voljo so le na recept in se uporabljajo pod nadzorom zdravnika. Ob pravilni uporabi predstavljajo varno in učinkovito zdravilo in strah pred neželenimi učinki je odveč, saj se vedno uporablja najšibkejše kortikosteroidno zdravilo, ki še učinkuje. (Mateja Lisjak, 2024)

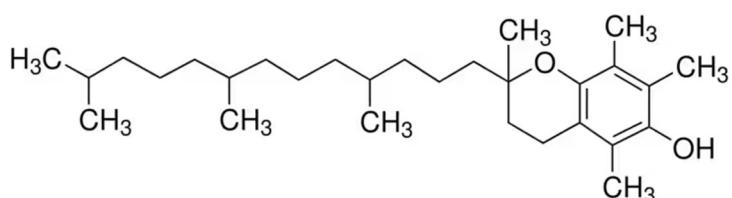
## 1.6 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti upočasnujejo oksidacijske procese, kjer nastajajo prosti radikali. Ti vsebujejo kisik in neparno število elektronov. Zaradi pomanjkanja elektrona so zelo reaktivni in v telesu sprožajo neželene kemijske reakcije, ki poškodujejo celice. Antioksidanti oddajo elektrone prostim radikalom in preprečijo, da bi le-ti poškodovali druge celice. (Prehrana.si, 2024)

Polhova mast naj bi vsebovala tudi vitamin E, ki naj bi v njej predstavljal naravni antioksidant. Prav zaradi tega naj bi bila ta tako dolgo obstojna. (Janežič, 1990)

### 1.6.1 VITAMIN E

Vitamin E (slika 14) je v maščobi topen vitamin in glavni antioksidant v našem telesu. Poznamo ga v dveh glavnih oblikah, in sicer kot tokoferol in tokotrienol. V naravi tokoferole proizvajajo zgolj rastline, kjer prav tako opravlja funkcijo zaščite maščob pred oksidacijo. Največ vitamina E se nahaja v rastlinskih oljih, kot so olje pšeničnih kalčkov, sončnično olje in olivno olje. (Korošec, 2023)



Slika 14: Vitamin E (Merck, 2024)

#### 1.6.1.1 Stabilnost E-vitamina

Vitamin E je občutljiv na svetlobo in kisik. Ob odsotnosti kisika je obstojen pri segrevanju tudi do 200 °C. Vsebnost vitamina E pa upada pri globoko zamrznjenih in toplotno obdelanih živilih. (Korošec, 2023)

#### 1.6.1.2 Pomanjkanje vitamina E

Do pomanjkanja vitamina E prihaja zelo redko, do tega pa lahko pride pri ljudeh z motnjami v absorpciji maščobe, bolnikih s cistično fibrozo in ljudeh z nekaterimi genskimi nepravilnostmi. Pomanjkanje vitamina E lahko povzroči hude poškodbe telesnih membran. Ob nezadostnem vnosu lahko pride do napredovanja arteroskleroze, Parkinsonove in Alzheimerjeve bolezni, raka ter poslabšanje imunskega sistema. (Korošec, 2023)

## 2 NAMEN DELA

V starejšem članku spletnega mesta Lokalno.si smo naletele na zapis o polhovi masti. Z zanimanjem smo ga prebrali, saj izhajamo s področja, kjer imata polhanje in uporaba polhov ter polhove masti precej dolgo tradicijo.

V članku so zapisali, da gre pri polhovi masti za posebnost v slovenskem prostoru, a podobno, kot je njeni mesto v naši ljudski medicini, najdemo v Avstriji, Nemčiji in Švici svižčevo mast. Na teh področjih je svižčevo mazilo dostopno tudi v lekarnah. (Dolenjski list, 2015)

Začele smo preučevati literaturo o polhovi masti, ki je je precej malo, predvsem zelo malo je znanstvenih člankov. Verjetno je razlog to, da je mast vendarle v uporabi na relativno ozkem geografskem področju.

Pri preučevanju področij uporabe polhove masti v ljudskem zdravilstvu smo ugotovile, da se ta zelo pogosto uporablja za različne težave s kožo. Tu gre tako za pomoč pri celjenju ran kot tudi pri trdovratnih kožnih obolenjih, npr. pri luskavici in dermatitisu. Uporabniki polhove masti navajajo, da je pri kožnih težavah ta zelo učinkovita.

Pri težjih oblikah kožnih obolenj se uporablja farmacevtske kreme in mazila s kortikosteroidi, ki ob daljši uporabi povzročajo težave s tanjšanjem povrhnjice kože. To nas je pripeljalo na misel, da bi lahko polhova mast vsebovala manjše količine kortikosteroidov. Hkrati pa bi bila lahko v primerjavi s farmacevtskimi pripravki boljša rešitev, saj zaradi ugodne sestave maščobnih kislin in antioksidantov kožo regenerira, jo vlaži, hrani ter ščiti pred delovanjem prostih radikalov.

V literaturi smo našle precej star članek iz leta 1991, v katerem je opisan postopek in rezultat določanja kortikosteroidov v rjavem maščevju alpskega svizca, evropskega jazbeca in laboratorijske podgane. (H. Wagner, 1991) To je še povečalo našo domnevo, da bi v polhovi masti lahko bili prisotni kortikosteroidi.

V nadaljnjem preučevanju literature smo naletele na do zdaj edino objavljeno analizo polhove masti. Gre za diplomsko delo, v katerem je opisana obsežna fizikalno kemijska in kromatografska analiza polhove masti. Med drugim je v masti določena tudi prisotnost kortikosteroidov, predvsem kortikosterona in hidrokortizona. (Janežič, 1990)

Diplomsko delo nam je služilo za osnovni vir informacij o analiznih metodah.

Tudi same smo se odločile izvesti dve od navedenih fizikalnokemijskih analiz s titracijsko metodo:

- določanje jodovega števila, ki je pokazatelj nenasičnosti maščobnih kislin in
- določanje peroksidnega števila, ki kaže na obstojnost maščobnih kislin.

Da bi potrdile ugodno maščobnikislinsko sestavo polhove masti, smo se namenile izvesti kvantitativno analizo maščobnih kislin s plinsko kromatografijo (GC).

Ker je polhova mast živalska maščoba, v kateri je pogosto prisoten holesterol, smo izvedle tudi določitev tega sterola. Uporabile smo opisano metodo tankoplastne kromatografije (TLC).

Ker vemo, da polšjo mast odlikuje tudi izjemna obstojnost, kar je za maščobe, ki vsebujejo pretežno nenasičene maščobne kisline, precej zanimivo in je verjetno posledica vsebnosti naravnih antioksidantov, kot je vitamin E, smo želele tudi ponoviti analizo vsebnosti tega vitamina.

Najbolj nas je pa zanimalo, kako je z vsebnostjo kortikosteroidov, zato smo še največ časa posvetile metodi njihovega določanja, jo poskusile optimizirati in preveriti njeni ustrezniosti, česar v diplomski nalogi niso uspeli narediti.

## 2.1 CILJI

Naš glavni cilj med preučevanjem literature je bil:

- dokazati prisotnost kortikosteroidov (hidrokortizona in kortikosterona) ter potrditi metodo HPLC za določanje kortikosteroidov.

Zastavile pa smo si tudi nekaj drugih ciljev:

- Primerjati vsebnost nenasičenih maščobnih kislin v polhovi masti z nekaj ostalimi olji, za katere je znano, da jih vsebujejo veliko.
- Določiti količino nekaj znanih nenasičenih in nenasičenih maščobnih kislin in primerjati sestavo v polhovih oljih različne starosti.
- Ugotoviti vsebnost peroksidnih snovi v olju, ki so povezane s stabilnostjo olja.
- Dokazati prisotnost antioksidantov (vitamina E).

## 2.2 HIPOTEZE

Pred praktičnim delom raziskovalne naloge smo si postavile naslednje hipoteze:

- V polhovi masti bomo dokazale vsebnost nekaterih kortikosteroidov in preverile ustreznost metode za njihovo določanje.
- Jodovo število polhove masti bo zaradi vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin visoko.
- Primerjava jodovega števila polhove masti z nekaj znanimi olji z visoko vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin bo pokazala primerljive vrednosti.
- Peroksidno število polhove masti bo nizko in se ne bo bistveno povečevalo s starostjo olja.
- Vsebnost holesterola bo nizka.
- Polhova mast bo vsebovala velik delež enkrat in večkrat nenasičenih maščobnih kislin, sestava pa se s starostjo ne bo veliko spreminja.
- V polhovi masti bodo prisotni antioksidanti.
- Polhova mast bo vsebovala določljive vrednosti vitamina E.

### 3 METODE DELA

#### 3.1 VOLUMETRIJSKE (TITRIMETRIČNE) METODE

Volumetrične metode, ki se uporabljajo v vseh vrstah analiznih, industrijskih, kliničnih in raziskovalnih laboratorijih, imajo za osnovo merjenje prostornine reagenta (titranta), ki reagira v znanem stehiometrijskem razmerju z določeno množino merjene snovi (analita).

Osnova metode temelji na kemijski reakciji:



Če reakcija poteka popolnoma v smeri produkta, je njen potek hiter, upoštevamo zvezo, ki temelji na izračunu množine iz podatkov o koncentraciji in prostornini snovi:  $n = CV$ . (Kolar, 2008)

Ob upoštevanju množinskega razmerja med titrantom in analitom pridemo do enačbe:

$$n = a \frac{n_B}{b} = a \frac{C_B V_B}{b}$$

$$C_A = a \frac{C_B V_B}{b V_A}$$

Legenda:

$n_A$  - množina analita (mol)  $C_A$  - koncentracija analita (mol/l)  $V_A$  - prostornina analita (l)

$n_B$  - množina titranta (mol)  $C_B$  - koncentracija titranta (mol/l)  $V_B$  - prostornina titranta (l)

a, b - stehiometrijska koeficienta

*Enačba 1: Formule za izračun koncentracije analita pri titraciji (Kolar, 2008)*

##### 3.1.1 Oksidacijsko-redukcjske titracije

Titracije so osnovane na oksidaciji in redukciji analita s titrantom. Reakcija mora biti termodinamsko (ugodna razlika med analitom in reagentom v redoks potencialu) in kinetično (ravnotežje se vzpostavi hitro) ugodna, da lahko sploh poteče. Poznamo nekaj tipičnih reagentov pri redoks reakcijah (tabela 4).

*Tabela 4: Tipični reagenti pri redoks reakcijah (Helena Prosen, Praktikum iz analizne kemije, 2018)*

Oksidanti	
KMnO <sub>4</sub>	$Mn^{7+} + 5e^- \rightarrow Mn^{2+}$ (v kilesu mediju)
KMnO <sub>4</sub>	$Mn^{7+} + 3e^- \rightarrow Mn^{4+}$ (v približno nevtralnem mediju)
$K_2Cr_2O_7$	$Cr^{6+} + 3e^- \rightarrow Cr^{3+}$
$Ce(SO_4)_2$	$Ce^{4+} + e^- \rightarrow Ce^{3+}$
$I_2$	$I^0 + e^- \rightarrow I^-$
KBrO <sub>3</sub>	$Br^{5+} + 6e^- \rightarrow Br^-$
Reducenta	
$FeSO_4$	$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$
$I^-$	$I^- \rightarrow I^0 + e^-$

### 3.1.1.1 Jodometrija

Je pomembna podskupina redoks titracij, pri kateri  $I^-$  v kislem uporabimo kot reducent. Vzorcu ga dodamo v presežku in nastali jod titriramo z raztopino reducenta (npr. s standardno raztopino  $Na_2S_2O_3$ )



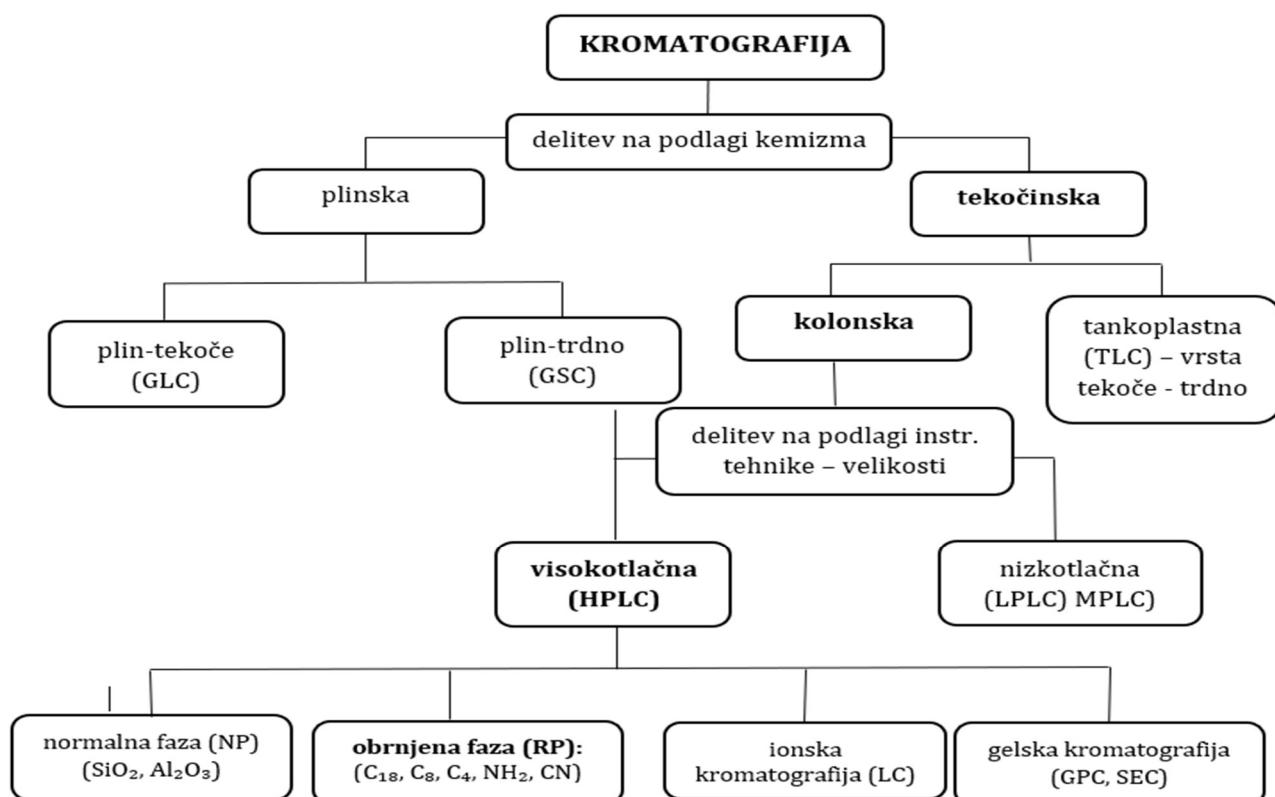
Titracija mora potekati v kislem ali vsaj v nevtralnem mediju, saj bi sicer lahko jod oksidiral tiosulfat do sulfata. Pri tovrstnih titracijah za indikator uporabimo škrobovico, ki tvori intenzivno modro obarvan kompleks z elementarnim jodom. (Helena Prosen, Praktikum iz analizne kemije, 2018)

## 3.2 KROMATOGRAFSKE METODE

Na preprost način bi lahko povedali, da je kromatografija separacijska tehnika, pri kateri se komponente vzorca (posamezne spojine iz zmesi) med seboj ločijo na podlagi interakcij s stacionarno in z mobilno fazo. (Boris Pihlar, 2019)

Molekule v mešanici, ki so nanešene na površino ali v trdno snov (stacionarna faza), se med premikanjem s pomočjo mobilne faze ločujejo med seboj. Proses ločevanja vključuje molekulske značilnosti, povezane z adsorpcijo, polarnostjo, porazdelitvijo in afiniteto ali razliko med njihovimi molekulskimi masami. Nekatere sestavine zmesi tako ostanejo na stacionarni fazi dlje časa, druge prehajajo v mobilno fazo hitreje. (Harris, 2009)

Delitev kromatografskih tehnik na podlagi kemizma (slika 15):



Slika 15: Delitev kromatografskih tehnik na podlagi kemizma (Štrancar, 1998)

Pri vseh kromatografskih tehnikah sta vedno prisotni stacionarna in mobilna faza.

### 3.2.1 Stacionarna faza (SF)

Stacionarna faza je viskozna tekočina ali trdna snov, ki se nahaja na trdnem nosilcu. Že njeni ime nam pove, da se le-ta med kromatografsko separacijo ne premika, stoji na miru, torej lahko rečemo, da je stacionarna. Stacionarna faza se lahko nahaja v kolonah (cevke, ki imajo različno dolžino in premer) ali pa je oblikovana v tanko površinsko plast. (Boris Pihlar, 2019)

### 3.2.2 Mobilna faza (MF)

Mobilna faza se nahaja v tekočem agregatnem stanju. Lahko je kapljevina, plin ali superkritična tekočina. Kot nam pove že ime, se ta med kromatografsko analizo premika, je mobilna. Teče skozi pore ali med delci stacionarne faze. Mobilna faza se premika zaradi gravitacije, lahko tudi zaradi nadtlaka ali podtlaka, pri njej razlikujemo eluent in eluat. Eluent je sveža mobilna faza, ki jo nenehno dodajamo na začetek plasti ali kolone s stacionarno fazo. Eluat pa je mobilna faza, ki je že šla skozi stacionarno fazo in s sabo nosi ločene komponente vzorca. (Boris Pihlar, 2019)

### 3.2.3 Parametri v kromatografskih tehnikah

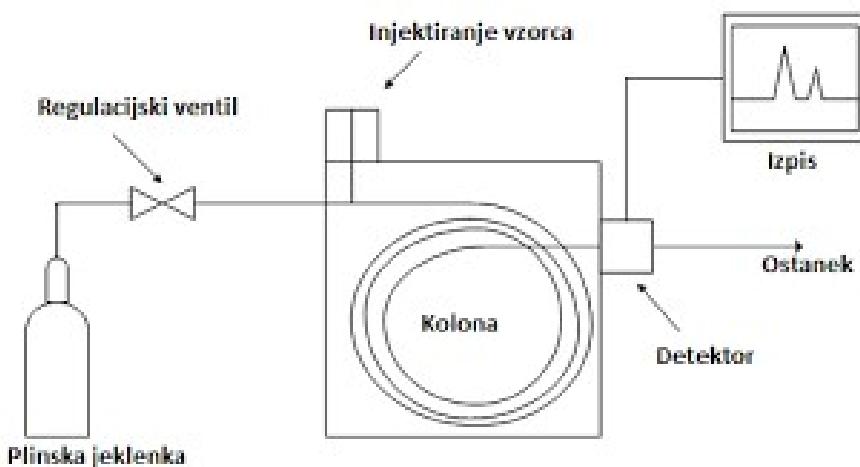
Te parametre uporabljamo pri vseh kromatografskih tehnikah. Parametri nam dajejo informacije o učinkovitosti ločevanja. Glavni parametri so retencijski čas ( $t_R$ ), retencijski faktor ( $k^{\alpha}$ ), selektivnost ( $\alpha$ ), učinkovitost kolone ( $N$ ) – število teoretskih podov na kolono, ločljivost ( $R$ ) in faktor simetrije ( $T$ ). (Štos, 2019)

## 3.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija je kolonska analizna tehnika, ki se uporablja predvsem pri analizi organskih in anorganskih nizkomolekularnih hlapnih spojin. Pri plinski kromatografiji je mobilna faza v večini primerov inerten plin. Med mobilno fazo in komponentami vzorca, ki jih ločujemo, ni nobenih podobnosti. Plin je odgovoren samo za prenos spojin vzdolž kolone in ne sodeluje pri ločbi. Ker je mobilna faza plin, morajo biti prav tako v plinastem stanju analizirane spojine. Pri plinski kromatografiji je ključno, da so analizirane spojine do srednje hlapne in termično stabilne do vsaj 400 °C. Poznamo dve vrsti plinske kromatografije, in sicer plinsko-tekočinsko kromatografijo (GLC – *Gas Liquid Chromatography*) in plinsko-trdno kromatografijo. (GSC – *Gas Solid Chromatography*). (Boris Pihlar, 2019)

### 3.3.1 Plinski kromatograf

Plinski kromatograf (slika 16) je instrument za plinsko kromatografijo, ki je sestavljen iz injektorja, ogrevanega prostora ali pečice, kjer se nahaja kolona, in detektorja. (Boris Pihlar, 2019)



Slika 16: Shema plinskega kromatografa (Boris Pihlar, 2019)

### 3.3.1.1 Nosilni plin

Kljud temu da plin predstavlja mobilno fazo, ta ne vpliva na ločbo. Plin mora biti čist, saj bi lahko primesi v detektorju povzročile signal. Prav tako ne sme vsebovati kisika, ta bi namreč lahko poškodoval stacionarno fazo v koloni. Nosilni plin je največkrat helij, ki ima nizko molsko maso in je inertni plin. Nosilni plin shranjujemo v jeklenkah pod pritiskom. (Boris Pihlar, 2019)

### 3.3.1.2 Injektor

Preko injektorja vnesemo vzorec v nosilni plin. Injektor je ogrevana (od 200 °C do 300 °C) kovinska cev. Na eni strani jo zapira gumijasta septa, na drugi se nadaljuje v kolono. Nosili plin priteka v injektor pod septo. V notranjosti injektorja se nahaja steklena cevka, napolnjena s stekleno volno, ki ji rečemo tudi vložek. Vzorec v injektor vbrizgamo tako, da z injekcijsko iglo prodremo skozi septo in iztisnemo vzorec. Ko vzorec pride v stik s stekleno volno, izpari, nato pare potujejo skupaj z nosilnim plinom v kolono. (Boris Pihlar, 2019)

### 3.3.1.3 Kolona

Včasih so bile v uporabi kovinske ali steklene kolone, ki so imele notranji premer od 6 do 8 mm, dolge pa so bile okoli 2 m. Danes v aparaturah najdemo kapilarne kolone iz kremenčevega stekla z notranjim premerom med 0,1 in 0,5 mm. Dolge so lahko od 20 do 100 m. Na notranji strani kapilarnih kolon je stacionarna faza nanešena v obliki tankega filma. Kapilarne kolone ne prenesejo tako velike količine vzorca kot starejše kolone, posledično moramo imeti dovolj občutljive detektorje, a prenesejo višje temperature, kar nam omogoča širši nabor spojin, ki jih lahko analiziramo s plinsko kromatografijo. (Boris Pihlar, 2019)

Kolone so nameščene v pečici oziroma termostatirani komori, saj morajo imeti skrbno nadzorovanjo temperaturo, ki jo med ločbo kontrolirano spremojamo. (Boris Pihlar, 2019)

### 3.3.1.4 Detektor

Z detektorjem ugotavljamo prisotnost spojin v nosilnem plinu. Obstaja več vrst detektorjev, ki se med seboj razlikujejo po načinu delovanja. Največ se uporablja plamensko ionizacijski detektor (ang. *flame ionization detector*, FID). Plin iz kolone se v detektorju zmeša z vodikom. Zmes plinov gre skozi šobo, kjer ta gori v toku zraka. V plamenu lahko zasledimo ione, če se v

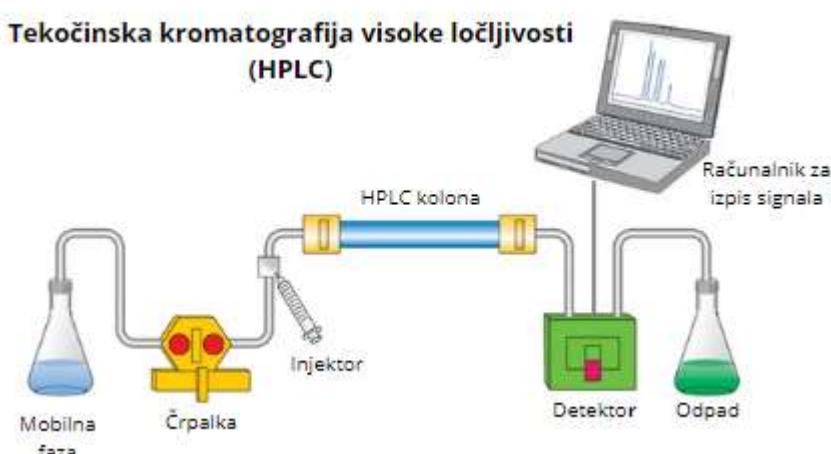
njem pojavijo organske spojine. Ioni v močnem električnem polju potujejo med šobo in plamenom, pri tem ustvarjajo šibek električni tok, ki ga zazna detektor. (Boris Pihlar, 2019)

### 3.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Visokotlačna kromatografija ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kolonska kromatografija, pri kateri se za stacionarno fazo uporablja kolona z zelo majhnimi delci (od 0,5 do 10 µm) in visok pritisk. Značilnost visokotlačne kromatografije je, da je hitra in ima dobro ločljivost. Pri visokotlačni kromatografiji raztopino substanc injiciramo na kromatografsko kolono, ki je napolnjena z različnimi polnili. Skozi kolono vodimo topilo (mobilna faza), ki ne reagira s polnilom (stacionarna faza). Topilo prenese zmes substanc skozi kolono, kjer potekajo separacijski procesi.

#### 3.4.1 HPLC kromatograf

Vsek njenostavnejši HPLC sistem (slika 17) ima naslednje komponente: rezervoar za mobilno fazo, črpalko, injektor, kromatografsko kolono, detektor in instrument za zapis signala. (Vončina, 2006)



Slika 17: Shema HPLC kromatografa, pritejeno po (Aryal, 2023)

##### 3.4.1.1 Kromatografska kolona (stacionarna faza)

Kromatografska kolona vsebuje stacionarno fazo. Danes poznamo veliko različnih stacionarnih faz, kot na primer adsorpcijske stacionarne faze, katerih polnilo je silikagel, reverzne faze vseh velikosti delcev z vezanimi različnimi skupinami, ionske izmenjevalce, posebne permeabilne stacionarne faze in kiralne stacionarne faze, ki se uporabljajo za ločitev optično aktivnih snovi. (Vončina, 2006)

##### 3.4.1.2 Mobilna faza

Mobilne faze so pogosto mešanica toksičnih in vnetljivih topil, zato moramo previdno ravnati z njimi. Rezervoarji, kjer jih hranimo in iz katerih jih med delom črpalka črpa, so steklene posode, ki so zaprte, ne smejo pa biti popolnoma zaprte, saj v njih nastaja podpritisak zaradi črpanja. Topila so zmeraj degazirana. Snov, ki jo injiciramo, se porazdeli v določenem volumnu mobilne faze. Ko mobilna faza prehaja s hitrostjo pretoka skozi detektor, se prikaže kot širina in višina vrha na bazni liniji kromatografskega zapisa. (Vončina, 2006)

### 3.4.1.3 Črpalka

Črpalka mora zagotavljati enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Od stabilnosti pretoka je odvisna natančnost analize. Danes so črpalke računalniško vodene in imajo možnost neposrednega mešanja mobilne faze, kar olajša in pospeši delo. Nekatere črpalke imajo vgrajene tudi mikroprocesorje, kar nam omogoči programiranje analize in ponovitve nastavljenih sekvenc. (Vončina, 2006)

### 3.4.1.4 Injektorji

Injektorji omogočajo dobro ponovljivost med posameznimi doziranjami. Vzorec mora biti injiciran v čim manjšem tekočinskem segmentu, ki mora biti poleg tega dobro definiran in ponovljiv. Kontaminacija med injiciranjem vzorcev mora biti čim manjša. (Vončina, 2006)

### 3.4.1.5 Detektor

Detektor je tisti del HPLC sistema, ki naredi substance, separirane na koloni, "vidne". Vsi detektorji temeljijo na merjenju sprememb neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. Poznamo detektorje, kot so: UV-VIS detektor, fluorescenčni detektor, detektor na lomni količnik, detektor na električno prevodnost, voltametrijski in kulometrijski detektor. Pomembna lastnost detektorja je, da lahko z njim določimo koncentracijo separirane substance, torej kvantitativno določitev. Nekateri detektorji (*diode array*) imajo možnost tudi kvalitativne določitve, saj lahko z njimi opazujemo celotni UV spekter separirane substance, ki prehaja skozi detektorsko celico. Najbolj uporabljeni detektorji so UV-VIS absorpcijski detektorji, in sicer zaradi svoje univerzalnosti, enostavnosti, selektivnosti in občutljivosti. Njihovo delovanje temelji na absorpciji svetlobe v UV in vidnem delu spektra. (Vončina, 2006)

## 3.5 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

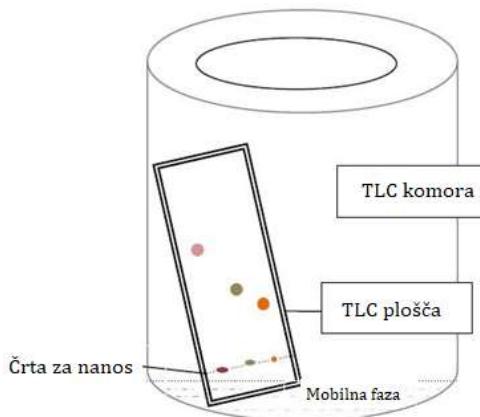
Tankoplastna kromatografija (slika 18) je ena izmed najbolj razširjenih analiznih tehnik, saj je poceni (zanjo ne potrebujemo posebne aparature). Slabost pa je slabša ločljivost in omejena zanesljivost. (Dolenc, Vaje iz organske analize, 2008)

### 3.5.1 Stacionarna faza

Pri TLC uporabljamo različne stacionarne faze, ki so nanešene na ploščice iz plastične mase, aluminija ali stekla. (Dolenc, Vaje iz organske analize, 2008) Za stacionarne faze pri TLC največkrat uporabimo polarne snovi: silikagel ( $\text{SiO}_2$ ), aluminijev oksid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), alusil (zmes  $\text{Al}_2\text{O}_3$  in  $\text{SiO}_2$ ), magnezijev ali kalcijev silikat in ionske izmenjevalce. V manjši meri se uporabljajo nepolarne stacionarne faze: kemijsko modificiran silikagel, razni polimeri, celuloza in aktivno oglje. Stacionarna faza pa je lahko tudi tekoča, v tem primeru je mehanizem separacije porazdelitev med dvema tekočima fazama. (Boris Pihlar, 2019)

### 3.5.2 Mobilna faza

Mobilna faza je zmes polarnih in nepolarnih topil (odvisno od polarnosti stacionarne faze). (Boris Pihlar, 2019)



Slika 18: Tankoplastna kromatografija (prirejeno po (The Arena Group Holdings, 2023))

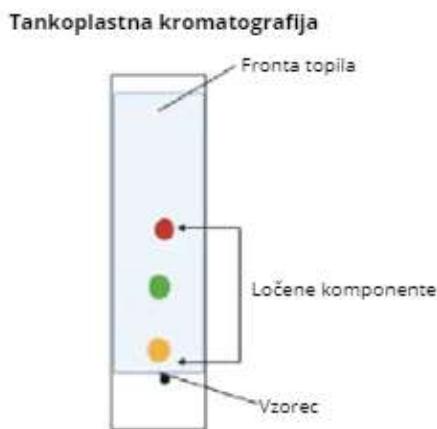
### 3.5.3 Nanos in razvoj vzorcev

Vzorce spojin ali zmesi nanesemo na ploščico v obliki razredčenih raztopin. Nanesemo jih na startno črto; to je s svinčnikom narahlo narisana črta, približno 1–2 cm od spodnjega roba ploščice. Raztopine vzorcev nanašamo s steklenimi kapilarami. Dobro je, da vzorce raztopimo v hlapnem topilu, saj ta po nanosu hitro izhlapi. (Dolenc, Praktikum iz organske kemije, 2021)

Ploščico z nanesenimi vzorci postavimo v kad z mobilno fazo in jo pokrijemo. Raven topila mora biti nekaj milimetrov pod startno črto. (Dolenc, Praktikum iz organske kemije, 2021)

### 3.5.4 Vizualizacija kromatograma

Če ločujemo obarvane spojine, lise lahko vidimo s prostim očesom. Neobarvane raztopine identificiramo na dva načina. Najpogosteje opazujemo ploščice pod ultravijolično (UV) svetlobo. Na ta način lahko vidimo spojine, ki svetlobo absorbirajo. Drug način vizualizacije in identifikacije komponent je obdelava kromatograma z različnimi reagenti, ki so specifični za posamezno snov (slika 19). (Dolenc, Praktikum iz organske kemije, 2021)

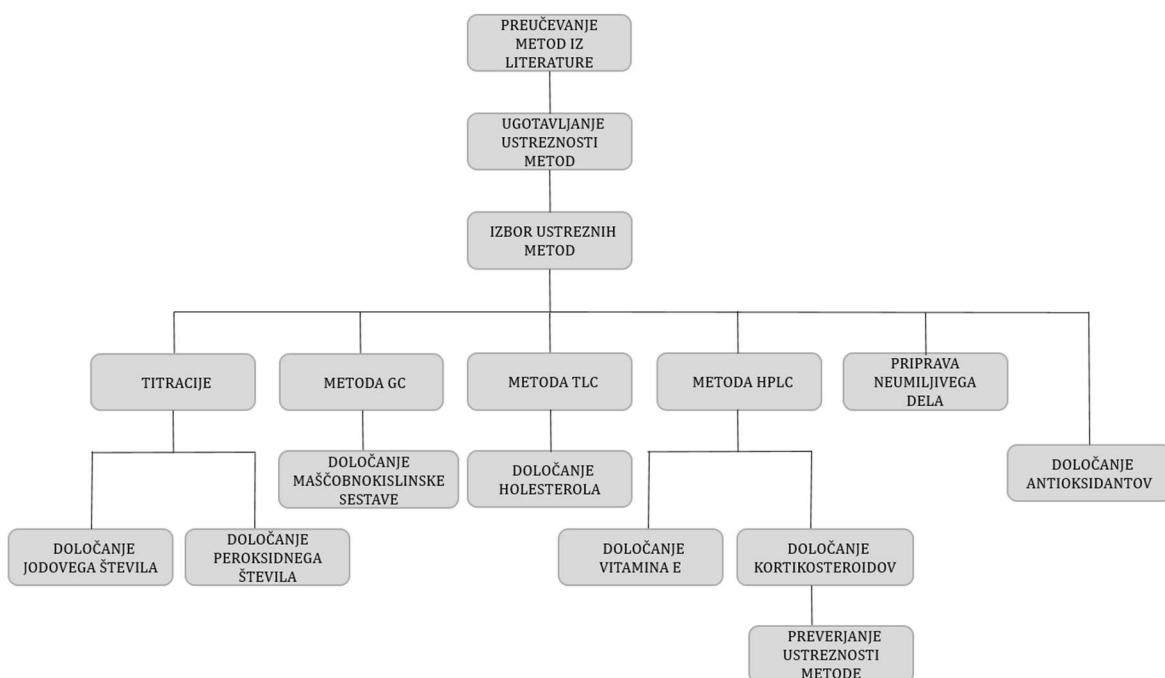


Slika 19: Identifikacija komponent na TLC kromatogramu, prirejeno po (Baniya, 2023)

## 4 EKSPERIMENTALNI DEL

Pri izvedbi eksperimentalnega dela naše raziskovalne naloge smo uporabile vzorce polhove masti (iz leta 2013, 2020 in 2023), ki smo jih pridobile od člana polharskega društva. Masti vseh treh letnikov so bile pripravljene po enakem postopku in hranjene v enakih, za masti ustreznih pogojih (temnejši, hladen prostor).

### 4.1 NAČRT DELA



Slika 20: Načrt dela naše raziskovalne naloge

## 4.2 PRIPOMOČKI IN KEMIKALIJE

### 4.2.1 Laboratorijski pripomočki in steklovina

#### 4.2.1.1 Titracije

- aparatura za titracijo (stojalo, mufa in prižema, bireta)
- magnetno mešalo, IKA
- laboratorijski kuhalnik
- analitska tehnica, METTLER TOLEDO (AG204)
- laboratorijska steklovina: merilne in polnilne pipete, čaše, merilni valji, kapalke, erlenmajerice

- 4.2.1.2 Umiljenje z ekstrakcijo, določitev antioksidantov in kromatografske tehnike
- analitska tehnica
  - laboratorijski grelnik, Filip Hožič
  - TLC kromatografska plošča, MACHEREY-NAGEL
  - avtomatska pipeta (1000 µl), Eppendorf
  - TLC kromatografska komora
  - fen, Black&Decker
  - laboratorijski sušilnik, Binder
  - pladenj za razvijanje kromatograma
  - HPLC kromatograf Agilent 1100 Series
  - HPLC kromatografske kolone
  - steklenice za topila in mobilne faze
  - injekcijske brizge (1 ml), Chirana
  - filtri, Agilent Econofilter 25/0,2 µm, PTFE,
  - viale, amber, Agilent Technologies
  - ultrazvočna kopel, Elma
  - GC kromatograf, Thermo scientific, Trace 1300
  - stresalnik, Labnet International, Inc., Orbit 1900
  - laboratorijska steklovina: vodni hladilniki, bučke z okroglim dnom, liji ločniki, čaše, merilni valji, merilne in polnilne pipete, merilne bučke, tehtalne ladvice, liji, epruvete, kapalke, spatule, pincete

#### 4.2.2 Kemikalije

- Wijsov reagent, jodov klorid v ocetni kislini, ICl v CH<sub>3</sub>COOH, C(ICl) = 0,1 mol/L, Titripur®
- Kalijev jodid, KI, Sigma-Aldrich, p.a. ≥99,0 %
- Kloroform, CHCl<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, p.a.
- Natrijev tiosulfat, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, p.a.
- Škrob, (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, Sigma-Aldrich, p.a.
- Cikloheksan, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, Sigma-Aldrich, p.a.
- Ocetna kislina, CH<sub>3</sub>COOH, Fluka, p.a. ≥ 99,8 %
- Klorovodikova kislina, HCl, Suprapur®, 36 %
- Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, Supelco®, p.a.
- Kalijev hidroksid, KOH, Sigma-Aldrich, p.a. ≥85 %
- Natrijev hidroksid, NaOH, Sigma-Aldrich, 98–100,5 %
- Dietileter, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, p.a.
- Heksan, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, Riedel-de Haën™, for HPLC ≥ 97,0 %
- Toulen, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, 99,8 %
- Aceton, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, Sigma-Aldrich, for HPLC, ≥ 99,8 %
- Mravljična kislina, CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, ≥ 95 %
- Fosforjeva kislina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Kemika, p.a.
- Modra Galica, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, ≥98,0 %
- Helij, He 5.0,
- Heptan, C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>, Riedel-de Haën®, for HPLC, ≥ 96 %
- Metanol, CH<sub>3</sub>OH, Riedel-de Haën™, for HPLC, ≥ 99,9 %

- Linolenska kislina, C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>, 60-74 %
- Fenolftalein, C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich
- Izopropanol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O, Riedel-de Haën®, for HPLC, 99,9 %

#### 4.2.3 Standardi

- hidrokortizon, C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>: Hydrocortisone, Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material, Sigma-Aldrich, 99,7 %, Product No. PHR1014-500MG, Lot No.: LRAD1246 (analizni certifikat je v prilogi naloge)
- kortikosteron, C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich, ≥ 98,5 % (HPLC), Product No. 27840, Batch No.: BCCJ6404 (analizni certifikat je v prilogi naloge)
- holesterol, C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O: Cholesterol, Sigma Grade, ≥ 99 % (HPLC), Product No. C8667-500MG, Lot No.: BCCJ6404 (analizni certifikat je v prilogi naloge)
- vitamin E, C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>: Alpha Tocopherol, Sigma-Aldrich, ≥ 98,5 % (HPLC), Product No. 27840, Batch No.: BCCJ6404 (analizni certifikat je v prilogi naloge)
- zmes metilnih estrov maščobnih kislin: Certified Reference Material, Supelco; Product No. CRM47885, Lot No.: LRAC3241 (analizni certifikat je v prilogi naloge)

### 4.3 DOLOČANJE NEUMILJIVEGA DELA

#### 4.3.1 Teoretične osnove

Neumiljivi del predstavlja negliceridne snovi v maščobah, ki ne reagirajo z alkalijami in so nehlapne pri temperaturi 80 °C. Gre za spreminjajoče se mešanice ogljikovodikov, aldehidov, ketonov, alkoholov, sterolov, pigmentov in maščobnotopnih vitaminov, ki so naravno prisotni v maščobi ali nastanejo pri procesu razgradnje maščob. (Moura Fe, 1975)

Gre za odstotek vzorca, ki ga ne moremo umiliti, lahko pa ga raztopimo v organskih topilih. Pomemben je za določitev nelipidnih komponent, predvsem steroidov.

#### 4.3.2 Raztopine reagentov in vzorcev

- 0,5 M etanolni KOH: v 500 mL merilni bučki natehtamo 14,025 g KOH, ga raztopimo in dopolnimo z etanolom do oznake.  
 $m(KOH) = 14,027 \text{ g}$
- vzorec polhove masti, letnik 2023

#### 4.3.3 Opis postopka z izračunom

- V 250 mL bučko z okroglim dnom smo natehtale ustrezno maso polhove masti.
- Dodale smo potrebno količino (odvisno od mase polje masti) etanolnega 0,5 M kalijevega hidroksida, KOH, bučko opremile s povratnim vodnim hladilnikom in jo segrevale v grelniku (slika 21, levo).

- Izvedle smo več postopkov, pri čemer smo pri prvem natehtale 2 g polhove masti in dodale 50 mL etanolnega 0,5 M KOH, za ostale analize pa po 5 g polhove masti in dodale 100 mL etanolnega 0,5 M KOH. Točni podatki so zbrani v tabeli 5.
- Nastavile smo primerno temperaturo, da je raztopina enakomerno vredna, in ob občasnem mešanju kuhale 1 uro.
- Po ohladitvi smo v lij ločnik dodale topilo za ekstrakcijo in zmes trikrat ekstrahirale.
- Kot ekstrakcijsko topilo smo uporabile dietileter oziroma heksan (podatki v tabeli 5).
- Po vsaki ekstrakciji smo pustile fazi 20 minut, da se ločita (slika 21, levo).
- Zgornje, etrne oziroma heksanske ekstrakte smo spirale s prekuhanom destilirano vodo.
- Združile smo jih v drugem liju ločniku, v katerega smo predhodno vlije 20 oziroma 50 mL prekuhanom destilirano vodo, in vsebino ob pozornem izenačevanju pritiska močno stresale.
- Po stresanju smo pustile fazi 20 minut, da se ločita.
- Spodnjo plast smo po spiranju zavrgle, organsko fazo (etrne oziroma heksansko) smo še trikrat spirale s po 50 mL etanolnega 0,5 M KOH.
- Po vsakem spiranju s KOH sta se fazi ločevali 20 minut, nakar smo zmes sprale še s 50 mL destilirane vode.
- Po zadnjem spiranju smo preverile reakcijo na bazičnost z indikatorjem fenolftaleinom in ponovile spiranje tolikokrat, da fenolftalein ni dal več alkalne reakcije (vijolično obarvanje).
- Združene sprane organske (etrne oziroma heksanske) frakcije smo zbrale v stehtani rotavaporski bučki in na rotavaporju topilo (eter ali heksan) oddestilirale.
- Ostanek smo osušile do konstantne mase v sušilniku, ohladile v eksikatorju in ponovno stehtale.

Tabela 5: Podatki o analizah neumiljivega dela

	m (vzorca polhove masti)	Topilo za saponifikacijo	Topilo za ekstrakcijo
1. analiza (ena paralelka)	2,07 g	50 mL etanolnega NaOH*	50 mL dietiletra
2. analiza (dve paralelki)	5,02 g	100 ml etanolnega KOH	50 mL heksana
	5,02 g		
3. analiza (dve paralelki)	5,04 g	100 mL etanolnega KOH	50 mL heksana + 50 mL dietiletra na začetku, v nadaljevanju heksan
	5,05 g		

\* Za prvo analizo smo uporabile etanolni NaOH, ker takrat v šoli nismo imeli na voljo KOH. Natehtale smo 4,1 g NaOH in ga raztopile v 200 mL etanola.



Slika 21: Potek umiljenja in ekstrakcije

Iz razlike v masi bučke smo izračunale neumiljivi del.

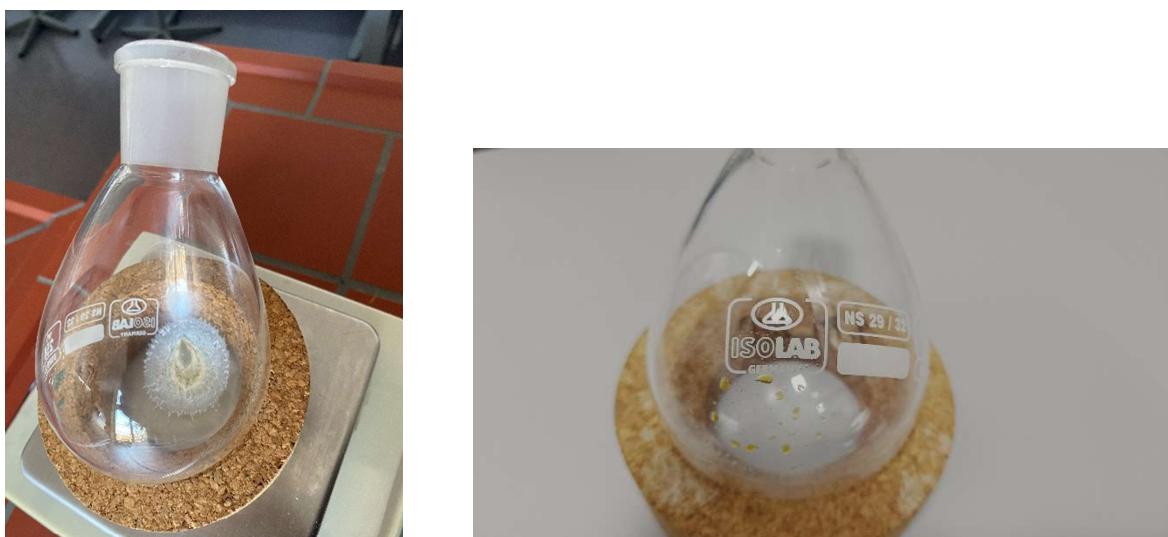
$$\text{neumiljivi del} = \frac{a \times 100}{m_{vz}}$$

Legenda:

a – neumiljivi del (g)

$m_{vz}$  – masa vzorca polhove masti (g)

Enačba 2: Formula za izračun neumiljivega dela z legendo



Slika 22: Neumiljivi ostanek po prvi in tretji analizi

## 4.4 DOLOČANJE KORTIKOSTEROIDOV Z METODO HPLC IN PREVERJANJE USTREZNOSTI METODE

### 4.4.1 Kromatografski parametri

- Metoda: HPLC, izokratska elucija na reverzni fazi
- Kolona: Agilent Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
- Temperatura: 25 °C
- Detekcija: UV, 245 nm
- Mobilna faza A: 0,02 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Mobilna faza B: acetonitril
- Linearni gradient: 30–99 % mobilne faze B v 15 min, 99 % mobilne faze B 10 min
- Pretok: 1 mL/min
- Volumen injiciranja: 20 mL
- Čas ločbe: 25 minut
- Programska oprema: Chemstation, verzija 9.01

### 4.4.2 Priprava raztopin standarda za umeritveno premico in linearnost metode

Pripravile smo osnovni raztopini standardov obeh kortikosteroidov, ki smo ju imeli na voljo, hidrokortizona in kortikosterona (S<sub>0</sub>), z masno koncentracijo približno 0,1 mg/mL ter za vsakega od standardov še pet razredčenih raztopin, od S<sub>1</sub> do S<sub>5</sub>. Kot topilo smo uporabile metanol. Pri izračunu masne koncentracije smo upoštevale čistoto obeh standardov.

- Osnovna raztopina hidrokortizona S<sub>0,H</sub>: v 20 mL merilno bučko smo natehtale približno 2 mg hidrokortizona, ga raztopile v metanolu in z njim dopolnile do oznake.
- Osnovna raztopina kortikosterona S<sub>0,K</sub>: v 20 mL merilno bučko smo natehtale približno 2 mg kortikosterona, ga raztopile v metanolu in z njim dopolnile do oznake.
- Raztopine standarda hidrokortizona, S<sub>1,H</sub> do S<sub>5,H</sub>, smo pripravile z redčenjem predhodnih raztopin z metanolom. Redčitve in koncentracije so podane v tabeli 6.
- Raztopine standarda kortikosterona, S<sub>1,K</sub> do S<sub>5,K</sub>, smo pripravile z redčenjem predhodnih raztopin z metanolom. Redčitve in koncentracije so podane v tabeli 7.

Tabela 6: Raztopine standarda hidrokortizona za umeritveno premico

	Natehta (mg)	Čistota standarda	V / redčitve	γ (mg/mL)
Osnovna raztopina S <sub>0,H</sub>	2,493	0,997	20	124,3
Raztopina S <sub>1,H</sub>	/	0,997	5,0 S <sub>0,H</sub> / 10 mL	62,1
Raztopina S <sub>2,H</sub>	/	0,997	5,0 S <sub>1,H</sub> / 10 mL	31,1
Raztopina S <sub>3,H</sub>	/	0,997	2,0 S <sub>2,H</sub> / 20 mL	3,11
Raztopina S <sub>4,H</sub>	/	0,997	2,0 S <sub>3,H</sub> / 20 mL	0,311
Raztopina S <sub>5,H</sub>	/	0,997	5,0 S <sub>4,H</sub> / 25 mL	0,0621

Tabela 7: Raztopine standarda kortikosterona za umeritveno premico

	Natehta (mg)	Čistota standarda	V / redčitve	$\gamma$ (mg/mL)
Osnovna raztopina $S_{0,H}$	2,579	0,992	20	129,0
Raztopina $S_{1,K}$	/	0,992	5,0 $S_{0,H}$ / 10 mL	64,5
Raztopina $S_{2,K}$	/	0,992	5,0 $S_{1,H}$ / 10 mL	13,0
Raztopina $S_{3,K}$	/	0,992	5,0 $S_{2,H}$ / 20 mL	1,29
Raztopina $S_{4,K}$	/	0,992	5,0 $S_{3,H}$ / 20 mL	0,129
Raztopina $S_{5,K}$	/	0,992	5,0 $S_{4,H}$ / 25 mL	0,0258

#### 4.4.3 Priprava raztopin vzorca polhove masti

Osnova za pripravo raztopine vzorca je bil neumiljivi del (poglavlje 4.3), ki smo ga v rotavaporski bučki raztopile v točno določeni količini (prvi poizkus 2 mL, ostali poizkusi 5 mL) metanola in prenesle preko filtra direktno v kromatografsko vialo.

#### 4.4.4 Opis postopka

- V kondicioniran kromatograf smo najprej injicirale topilo, sledilo je injiciranje obeh osnovnih raztopin standardov hidrokortizona in kortikosterona.
- Identificirale smo odziva za oba kortikosteroida in nato injicirale raztopino vzorca (neumiljivi del, pridobljen po prvi ekstrakciji z dietiletrom).
- V vzorec v viali smo dodale raztopini standardov, da bi dodatno identificirale vrhove kortikosteroidov v vzorcih.
- V nadaljevanju smo injicirale redčene raztopine standardov hidrokortizona in kortikosterona za izris umeritvene premice.

#### 4.4.5 Preverjanje HPLC metode za določanje kortikosteroidov

##### 4.4.5.1 Selektivnost metode

Za selektivnost metode smo injicirale topilo (metanol) in obo standarda ter na kromatogramih ugotovile, kako so odzivi hidrokortizona, kortikosterona in odzivi v topilu med sabo ločeni.

##### 4.4.5.2 Ponovljivost injiciranja standarda

Za ponovljivost injiciranja smo injicirale osnovno raztopino kortikosterona ( $S_{0,K}$ ) šestkrat zapored, izračunale povprečje ploščin na kromatogramih, standardno deviacijo (STDEV) in relativno standardno deviacijo v % (RSD) za vseh šest ploščin.

##### 4.4.5.3 Določitev LOD in LOQ

Na kromatogramih standardov hidrokortizona in kortikosterona smo s primerjavo šuma in odziva določile najmanjšo koncentracijo obeh snovi, ki predstavlja mejo za določitev (LOD – ang. *Limit of detection*) in mejo za kvantitativno vrednotenje (LOQ – ang. *Limit of quantification*) za oba kortikosteroida. Določitev teh parametrov je pomembna, saj pričakujemo, da bodo vzorci imeli zelo majhne količine kortikosteroidov.

#### 4.4.5.4 Stabilnost raztopin standardov

Analizirale smo raztopine standardov obeh kortikosteronov, hranjene v hladilniku (24 in 48 h) in primerjale ploščine na kromatogramih sveže pripravljenih standardov in standardov, hranjenih v hladilniku. Izračunale smo razliko med ploščinami, ki je merilo za stabilnost raztopin.

#### 4.4.5.5 Linearnost metode

Linearnost metode smo ugotovile iz umeritvenih premic za hidrokortizon in kortikosteron, in sicer iz faktorja  $R^2$ , ki nam pove, kako dobro se ploščine prilegajo linearemu modelu (premici). Zveza med ploščino kromatografskih vrhov in koncentracijo je namreč linearna.

#### 4.4.5.6 Točnost metode

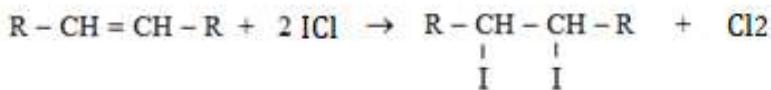
Točnosti metode zaradi premajhne količine vzorca, ki smo ga prenesle direktno v kromatografsko vialo, nismo uspele narediti na pravilen način. V viale z vzorci smo lahko le dodajale ustrezne količine raztopin obeh standardov in primerjale dodane ter izračunane (dobljene) koncentracije standardov.

### 4.5 TITRACIJSKO DOLOČANJE JODOVEGA ŠTEVILA

#### 4.5.1 Teoretične osnove in enačbe reakcij

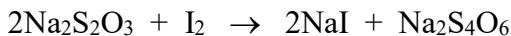
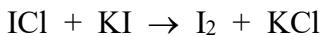
Jodovo število nam pove vsebnost nenasičenih spojin v maščobi. Večje kot je, več je prostih in zaestrenih nenasičenih maščobnih kislin v maščobi. Maščoba z nižjim jodovim številom je torej praviloma obstojnejša.

Metoda, ki smo jo uporabile, je standardiziran Wijsov postopek, pri katerem uporabimo Wijsov reagent, to je jodov klorid v ocetni kislini. Jodov klorid dodamo v presežku k maščobi, v kateri določamo nenasičenost (količino dvojnih vezi). Iz reagenta se veže jod na dvojne vezi maščobnih kislin, pri reakciji se sprosti klor. Jodovo število nam pove vsebnost nenasičenih spojin v maščobi. Večje kot je, več je prostih in zaestrenih nenasičenih maščobnih kislin v maščobi. Jod se pri reakcijah z maščobnimi kislinami veže na dvojne vezi, pri tem vezavo joda izvedemo posredno z Wijsovim reagentom ( $ICl$  v ocetni kislini). Pri tem poteče adicija joda na maščobno kislino.



*Enačba 3: Kemijska enačba reakcije med Wijsovim reagentom  $ICl$  in dvojno vezjo*

Presežek Wijsovega reagenta nato reagira z dodanim kalijevim jodidom,  $KI$ , pri reakciji nastane jod,  $I_2$ , ki ga v skladu z jodometrično titracijo določamo s standardizirano raztopino natrijevega tiosulfata,  $Na_2S_2O_3$ .



*Enačba 4: Kemijski enačbi reakcije Wijsovega reagenta s kalijevim jodidom ter reakcija sproščenega joda z natrijevim tiosulfatom*

#### 4.5.2 Priprava raztopin reagentov in vzorcev

- 0,1 M raztopina natrijevega tiosulfata,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Raztopino smo pripravile v 1000 mL meritni bučki, v katero smo na analitski tehnicni natančno natehtale izračunano količino  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , jo raztopile v destilirani vodi in bučko dopolnile do oznake.

$$M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 15,82 \text{ mg}$$

- Raztopina natrijevega jodata (V),  $\text{NaIO}_3$  za standardizacijo 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

V dve erlenmajerici smo natančno natehtale med 0,05 in 0,07 g predhodno sušenega natrijevega jodata (V),  $\text{NaIO}_3$ .

1. paralelka:  $m(\text{NaIO}_3) = 0,0639 \text{ g}$

2. paralelka:  $m(\text{NaIO}_3) = 0,0618 \text{ g}$

- Indikator – škrobovica

100 mL destilirane vode smo segrevale in v njej raztopile 1 g škroba, pomešanega z nekaj mL destilirane vode. Škrobovica je bila indikator pri jodometrični titraciji z  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Vedno jo je potrebno pripraviti sveže.

- 10 % raztopina kalijevega jodida, KI

V 500 mL meritno bučko smo natehtale 50 g KI, ga raztopile v destilirani vodi in z destilirano vodo dopolnile do oznake.

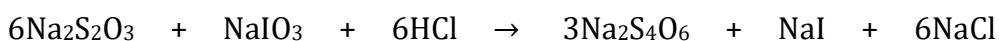
- Zmes cikloheksana in ledocetne kisline

Pripravile smo zmes 100 mL cikloheksana in 100 mL ledocetne kisline.

- vzorec polhove masti, letnik 2023, in nekaj drugih olj

#### 4.5.3 Standardizacija 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

$\text{NaIO}_3$  v erlenmajericah smo raztopile v približno 25 mL destilirane vode, raztopinam dodale 2 g KI in 10 mL 1 M HCl ter takoj titrirale z 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Tik pred koncem titracije, ko se je raztopina obarvala svetlo rumeno, smo dodale nekaj kapljic škrobovice in titrirale do brezbarvne raztopine. Iz porabe smo izračunale točno koncentracijo  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .



*Enačba 5: Kemijska enačba reakcije standardizacije  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$*

Izračun koncentracije raztopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ :

$$\frac{n_{\text{NaIO}_3}}{n_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} = \frac{1}{6}$$

$$C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{6 m_{\text{NaIO}_3}}{M_{\text{NaIO}} \times V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}$$

*Enačba 6: Množinsko razmerje in izračun za standardizacijo  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$*

#### 4.5.4 Opis postopka

Po osnovnem postopku smo v erlenmajerice natehtale vzorec polhove masti, letnik 2023, in nekaj drugih maščob za primerjavo (tabela 8). Vse maščobe smo natehtale in pripravile v dveh paralelkah.

*Tabela 8: Natehte polhove masti in drugih olj za določanje jodovega števila*

	m (prve paralelke) (g)	m (druge paralelke) (g)
Mandljevo olje	0,6376	0,7355
Olivno olje	0,6123	0,5210
Olje iz grozdnih pešk	0,5437	0,5174
Karitejevo maslo	0,5595	0,9642
Polhova mast	0,7385	0,5651

K vzorcem smo dodale 15 mL zmesi cikloheksena in ledocetne kisline ter 25 mL Wijsove raztopine. Erlenmajerice smo pokrile s parafilmom, nekaj minut stresale in jih za eno uro postavile na temno mesto. Po eni uri smo reakcijo prekinile z dodajanjem 10 % raztopine KI in 150 mL sveže prekuhanе destilirane vode. Barva raztopine se je iz oranžno rdeče spremenila v rjavo (slika 23). Dodale smo še 70 mL destilirane vode in takoj titrirale s standardizirano raztopino  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Ko se je raztopina obarvala svetleje/rahlo rumenkasto, smo dodale 1 % raztopino škrobovice. Raztopina se je ob dodatku škrobovice obarvala sivo rumeno. Titracijo smo nadaljevale do razbarvanja. Zapisale smo porabo (prostornino) titranta. Pripravile smo še slepi raztopino. Nato smo iz razlik porabe prostornin pri slepi raztopin in pri vzorcu izračunale jodovo število.

#### Izračun za jodovo število

$$\text{jodovo število (g joda / 100 g maščobe)} = \frac{V - V_1 \times C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times M(I) \times 100}{m (\text{vzorca maščobe})}$$

Legenda:

V – volumen  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  za titracijo reagentov – slepi vzorec (L)

$V_1$  – volumen  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  za titracijo vzorca maščobe (L)

$M(I)$  – molska masa joda (126,7 g/mol)

$C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$  – množinska koncentracija  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (mol/L)

m (vzorca maščobe) – masa vzorca maščobe (g)

*Enačba 7: Formula za izračun jodovega števila z legendo (Arnes.si, 2024)*



Slika 23: Paralelki polhove masti 2023 po prekinitvi reakcije pred titracijo

## 4.6 TITRACIJSKO DOLOČANJE PEROKSIDNEGA ŠTEVILA

### 4.6.1 Teoretične osnove in enačbe reakcij

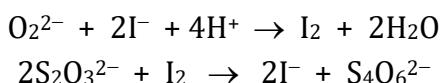
Peroksidno število je parameter za določanje vsebnosti kisika v obliki peroksida, še posebej hidroperoksidov, v snovi. Je merilo za prisotnost oksidiranosti. (The international fragrance association, 2011)

Peroksidno število je direktni pokazatelj primarne oksidacije maščob, kjer kisik v obliki peroksidne skupine prodre v maščobno molekulo. Parameter določa koncentracijo vodikovega peroksida, ki ni stabilen in hitro razpade v sekundarne oksidativne produkte (ketoni in aldehydi). Odgovoren je za poslabšanje kvalitete oksidiranega olja. (Yandie Yang, 2014)

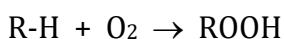
Oksidativni procesi potekajo z avtooksidacijo ali fotooksidacijo in so večinoma posledica shranjevanja maščob. (Pizarro, 2013)

Peroksidno število  $I_P$  je število, ki nam v miliekvivalentih aktivnega kisika pove količino peroksida v 1000 ml snovi. (European Pharmacopoeia 7nd Edition, 7.0 Volume 1, 2020)

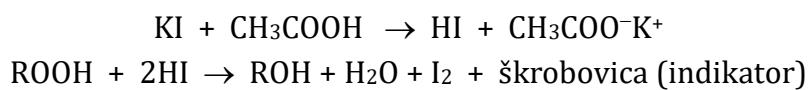
Splošna reakcijska shema:



Nastanek hidroperoksidov:



Nastanek joda:



Titracija:



Enačba 8: Enačbe reakcij pri določanju peroksidnega števila (The international fragrance association, 2011)

Glede na pričakovano nizko peroksidno število (od 0 do 2) je masa preiskovane maščobe od 2 do 5 gramov. (Gojkovič, Načrtovanje sestave in preučevanje stabilnosti krem s polhovim oljem, 2014)

#### 4.6.2 Raztopine reagentov in vzorcev

- standardizirana 0,1 M raztopina natrijevega tiosulfata,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (opis standardizacije v poglavju 4.5.3)
- raztopina 13,11 g KI v 10 mL destilirane vode
- indikator škrobovica (opis priprave v poglavju 4.5.2)
- vzorci polhove masti, letniki 2013, 2020 in 2023
- raztopina 20 ml kloroform in 30 ml ocetne kisline

#### 4.6.3 Opis postopka z izračunom

- V erlenmajerice smo natančno natehtale približno 5 g vseh treh vzorcev polhove masti v dveh paralelkah (tabela 9).

Tabela 9: Natehte polhove masti za določanje peroksidnega števila

	m (prve paralelke) (g)	m (druge paralelke) (g)
VZ 2013	5,1593	5,0021
VZ 2020	5,0107	5,2449
VZ 2023	5,0925	5,1007

- Vzorce masti smo raztopile v pripravljeni raztopini kloroform in ocetne kisline.
- Dodale smo 1 mL raztopine KI in močno pretresle (slika 24).
- Razredčile smo na približno 100 mL z destilirano vodo in ob mešanju na magnetnem mešalu titrirale z 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  do svetlo rumene barve.
- Dodale smo indikator, raztopino škrobovice (slika 25), pri čemer se je raztopina obarvala modro vijolično, in titrirale do razbarvanja (slika 26).
- Vse tri vzorce smo analizirale v dveh paralelkah. Sočasno smo naredile tudi slepi preizkus, to je titracijo zmesi reagentov brez dodane polšje masti.



Slika 24: Raztopina vzorca, kalijevega jodida, kloroform in ocetne kisline pred začetkom titracije



Slika 25: Raztopina vzorca (polhova mast 2013) med titracijo po dodatku indikatorja škrobovice



Slika 26: Raztopina vzorca (polhova mast 2013) po končani titraciji

#### Izračun za peroksidno število

$$I_P = \frac{10 \times (V_2 - V_1)}{m}$$

Legenda:

V<sub>1</sub> – volumen Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> za titracijo reagentov – slepi vzorec (mL)

V<sub>2</sub> – volumen Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> za titracijo vzorca maščobe (mL)

m (vzorca maščobe) – masa vzorca maščobe (g)

Enačba 9: Formula za izračun peroksidnega števila (European Pharmacopoeia 7nd Edition, 7.0 Volume 1, 2020)

## 4.7 DOLOČANJE HOLESTEROLA Z METODO TLC

### 4.7.1 Priprava TLC plošče

S svinčnikom in ravniliom smo 1,5 cm od spodnjega roba TLC plošče narisale tanko črto za nanos vzorcev. Vzorce smo na enakih razdaljah nanesle na mesta, označena na črti. Pripravile smo mobilno fazo (sestava 4.7.4) in jo vlile v TLC komoro, približno centimeter nad dnom.

### 4.7.2 Priprava vzorca

V 5 mL merilno bučko smo natehtale približno 0,5 g polhove masti (letnik 2023), jo raztopile v kloroformu in z njim dopolnile do oznake.

$$m \text{ (vzorca)} = 0,51 \text{ g}$$

### 4.7.3 Priprava standardov

Pripravile smo standardne raztopine holesterola, osnovno raztopino  $\gamma_0$  in tri redčene raztopine,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  in  $\gamma_3$  v štirih različnih koncentracijah: približno 50 ng/ $\mu\text{L}$ , 100 ng/ $\mu\text{L}$ , 200 ng/ $\mu\text{L}$ , 400 ng/ $\mu\text{L}$ . Pri izračunu masne koncentracije smo upoštevale čistoto standarda (99 %).

Osnovna raztopina  $\gamma_0$ : v 50 mL merilno bučko smo natehtale približno 20 mg holesterola, ga raztopile v kloroformu in z njim dopolnile do oznake.

Raztopine  $\gamma_1$  do  $\gamma_3$  smo pripravile z nadaljnjam redčenjem predhodnih raztopin s kloroformom. Redčitve in koncentracije so podane v tabeli 10.

Tabela 10: Raztopine za analizo holesterola s TLC

	Natehta (mg)	V / redčitve	$\gamma$ (ng/ $\mu\text{L}$ )
Osnovna raztopina $\gamma_0$	20,8	50	416,0
Raztopina $\gamma_1$	/	5,0 $\gamma_0$ / 10 mL	208,0
Raztopina $\gamma_2$	/	5,0 $\gamma_1$ / 10 mL	104,0
Raztopina $\gamma_3$	/	5,0 $\gamma_2$ / 10 mL	52,0

### 4.7.4 Mobilna faza

Za mobilno fazo smo uporabile mešanico toluena, acetona in mravljinčne kisline v razmerju prostornin 25/5/1,5.

### 4.7.5 Raztopina za razvijanje kromatograma (identifikacijo lis)

Pripravile smo kislo raztopino bakrovega sulfata, ki vsebuje 20 g CuSO<sub>4</sub>, 10 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in 190 mL destilirane vode. V čašo smo natehtale 62,58 g CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, ki ustreza 40 g CuSO<sub>4</sub>, dodale 20 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in 380 mL destilirane vode.

### 4.7.6 Postopek določitve holesterola v polšji masti

Na silikagelno ploščo velikosti 200 x 200 mm smo s pomočjo avtomatske pipete nanesle po 10  $\mu\text{L}$  raztopine vzorca polje masti in raztopin standarda  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  in  $\gamma_3$ .

TLC ploščo smo postavile v TLC komoro z mobilno fazo, tako da črta z nanosi ni bila potopljena v mobilno fazo, ter jo naslonile na notranjo steno komore. Komoro smo zaprle s pokrovom in vsebino pustile razvijati. Tik preden je mobilna faza dosegla vrh plošče, smo jo vzele ven in jo posušile s sušilnikom. Ploščo smo za obarvanje nastalih lis za nekaj sekund položile v pripravljeno raztopino za razvijanje kromatograma ter jo postavile v sušilnik na 120 °C. Po nekaj minutah so se pojavile lise, ki smo jih identificirale in določile približno koncentracijo holesterola v polšji masti.

## 4.8 DOLOČANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE Z METODO GC

### 4.8.1 Kromatografski parametri

- **Metoda:** GC
- **Kolona:** TR-WAX (30 m x 0,25mm x 0,20 µm)
- **Temperaturni program:** 80 °C (4 min)//10 °C/min//200 °C (4 min)//5 °C/min//210 °C (0 min)//20 °C/min//250 °C (6 min)
- **Temperatura injektorja:** 220 °C
- **Detektor:** FID
- **Temperatura detektorja:** 250 °C
- **Mobilna faza – nosilni plin:** helij
- **Pretok nosilnega plina:** 1,5 mL/min
- **Plamen:**  $H_2$ /zrak v razmerju 1/10
- **Pretok plina v detektorju:** 40 mL/min
- **Volumen injiciranja:** 1,0 µL; *split mode* (1/27)
- **Čas ločbe:** 30 min

### 4.8.2 Topilo

Za topilo smo uporabili metanolno raztopino NaOH in *n*-heptan.

### 4.8.3 Priprava plinskega kromatografa (GC)

V plinski kromatograf smo vstavili kolono, ki je namenjena določanju maščobnih kislin, nastavili ustrezne temperaturne in časovne parametre na instrumentu in ga približno dve uri kondicionirali.

### 4.8.4 Raztopine reagentov in vzorci:

- metanolna raztopina NaOH: v 100,0 mL merilno bučko smo natehtale okrog 2 g natrijevega hidroksida in ga počasi raztopliale v metanolu; ko se je ves NaOH raztopil, smo z metanolom razredčili do oznake;
- heptan;
- vzorci polhove masti, letniki 2013, 2020 in 2023.

### 4.8.5 Priprava raztopin standarda

Raztopine standardov smo pripravile iz mešanice Fame mix, ki je zmes metilnih estrov maščobnih kislin. Zmes smo redčile z *n*-heptanom.

Pripravile smo osnovni, neredčen standard (STD 3), dvakrat redčen standard (STD 2) in petkrat redčen standard (STD 1) (tabela 11). Za redčenje smo uporabljale polnilne pipete.

Tabela 11: Redčenje mešanice standarda Fame mix

	Volumen (mL)	
	Standard Fame mix	n-heptan
STD 1	0,2	0,8
STD 2	0,5	0,5
STD 3	1	/

#### 4.8.6 Priprava raztopin vzorcev

V 20 mL viale smo natehtale približno 100 mg vzorca polhove masti letnik 2013 (VZ 1), 2020 (VZ 2) in 2023 (VZ 3). Vsak vzorec smo natehtale v dveh paralelkah, A in B. Natančne mase so podane v tabeli 12. S polnilno pipeto smo dodale 4 mL metanolnega NaOH ter 4 mL n-heptana. V viale smo dale magnetna mešala in jih zaprle s kleščami za zapiranje. Viale smo postavile v vodno kopel na magnetno mešalo z grelcem in 20 minut segrevale na 60 °C. Po končanem segrevanju smo viale postavile v stresalnik in stresale 10 minut, da je potekla ekstrakcija. Po končanem stresanju smo počakale, da se fazi ločita, odvzele 1,0 mL zgornje n-heptanske faze ter jo prenesle v GC vialo. Tako pripravljen vzorec smo nato injicirale v GC kromatograf.

Tabela 12: Mase polhove masti za določitev izbranih maščobnih kislin

	Vzorci polhove masti					
	Letnik 2013		Letnik 2020		Letnik 2023	
Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B
m (polhovega olja) (g)	0,1088	0,1131	0,1099	0,1115	0,1085	0,1020

#### 4.8.7 Identifikacija kromatografskih vrhov

Ker so bili naši pogoji (kolona) drugačni od zapisanih na certifikatu standarda, ki je vseboval tudi retencijske čase posameznih maščobnih kislin, smo le-te morale identificirati tudi pri naši analizi.

V ta namen smo v dve viali natehtale približno 100 mg linolejske kisline in jo razredčile na enak način kot vzorec. Iz kromatograma smo ugotovile retencijski čas in ga primerjale z retencijskim časom te kisline v standardu mešanice kislin. Po zapisanem zaporedju maščobnih kislin na certifikatu standarda smo nato na kromatogramu standarda določile, kateri odzivi pripadajo ustrezni kislini (oziroma metilnemu estru kisline) glede na to, v kakšnem zaporedju si sledijo.

#### 4.8.8 Izbira maščobnih kislin za kvalitativno vrednotenje

Odločile smo se za vrednotenje miristinske, palmitinske, stearinske, *cis*-9-oleinske in linolenske kisline. Prve tri so nasičene, četrta je enkrat nenasičena in zadnja trikrat nenasičena maščobna kislina.

Glede na redčenje mešanice standardov (tabela 11) smo izračunale masne koncentracije ( $\gamma$ ) posameznih maščobnih kislin oziroma njihovih estrov v ustrezeni redčeni raztopini standardov, kar je prikazano v tabeli 13.

Tabela 13: Koncentracije posameznih maščobnih kislin (estrov) v raztopinah standardov

Spojina (metilni ester maščobne kisline)	$\gamma$ (mg/L)		
	STD 1	STD 2	STD 3
metil meristat	16	40	80
metil palmitat	24	60	120
metil stearat	16	40	80
metil <i>cis</i> -9- oleat	16	40	80
metil linoleat	8	20	40

#### 4.8.9 Umeritvene premice estrov maščobnih kislin

Iz podatkov na kromatogramih standardov smo v Excel izpisale ploščine vrhov posameznih estrov maščobnih kislin in za vsako narisale umeritveno premico odvisnosti ploščin od njihove koncentracije. Za vsak metilni ester maščobne kisline smo izrisale ustrezzo enačbo premice.

$$y = kx + n$$

y – ploščina estra maščobne kisline na kromatogramu standarda, A (pA\*min)

x – masna koncentracija estra maščobne kisline,  $\gamma$  (mg/L)

k – naklon premice,  $\Delta A / \Delta \gamma$  (pA\*min\*L/mg)

n – odsek na y-osi, A (pA\*min)

Enačba 10: Enačba umeritvenih premic

#### 4.8.10 Izračun vsebnosti maščobnih kislin v vzorcih

Iz podatkov enačb premic (naklon k in odsek n) in ploščin kromatografskih vrhov estrov posamezne maščobne kisline na kromatogramu vzorca (vrednost y) smo izračunale masne koncentracije ( $\gamma$ ) estrov maščobnih kislin v vzorcih. Ta pa je enaka masni koncentraciji same maščobne kisline. Z upoštevanjem volumna vzorca (4,0 mL) in molskih mas maščobnih kislin in njihovih estrov smo izračunale maso in masni delež maščobne kisline v posameznem vzorcu polje masti.

$$g = \frac{A - n}{k}$$

$$w = \frac{((g \times 4 \times M_{MK}) / (M_{ester} \times 1000)) \times 100}{m_{VZ}}$$

Legenda:

$\gamma$  – masna koncentracija estra maščobne kisline (mg/L)

A – ploščina kromatografskega vrha estra maščobne kisline

n – odsek na osi y umeritvene premice posameznega estra maščobne kisline

k – naklon umeritvene premice posameznega estra maščobne kisline

w – masni delež oziroma masni odstotek maščobne kisline v vzorcu

4 – prostornina vzorca v viali (mL)

$M_{MK}$  – molska masa maščobne kisline (g/mol)

$M_{ester}$  – molska masa estra maščobne kisline (g/mol)

1000 – pretvorba mL v L

100 – preračun v odstotke

$m_{VZ}$  – masa vzorca (mg)

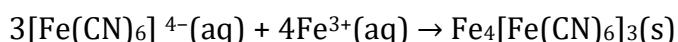
*Enačba 11: Izračun masne koncentracije estra maščobne kisline in masnega deleža maščobne kisline v vzorcu z legendo*

## 4.9 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV

### 4.9.1 Teoretične osnove

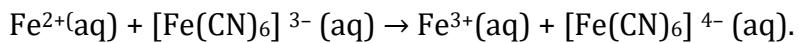
Poskus nam kvalitativno dokaže, ali vzorec vsebuje antioksidante ali ne. Osnova dokazne reakcije je nastanek temno modre oborine (železov(III) heksacianidoferat(II)) ali pruskega modrila. (Koradin Veronika, 2022)

Kalijev heksacianidoferat (II) ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ), ki vsebuje  $Fe^{2+}$  ione, reagira z raztopino železovega(III) klorida ( $FeCl_3$ ), ki vsebuje  $Fe^{3+}$  ione, pri čemer nastane temno modra oborina:



Za preizkus prisotnosti antioksidantov v vzorcu le-tega dodamo mešanici raztopin železovega(III) klorida ( $FeCl_3$ ) in kalijevega heksacianidoferata(III) ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ). Mešanica je rjave barve, saj vsebuje le  $Fe^{3+}$  ione. Če vzorec vsebuje antioksidante, v raztopini opazimo odtenek prusko modre barve.

Heksacianidoferatni(III) ioni oksidirajo  $Fe^{2+}$  v  $Fe^{3+}$ , pri čemer se sami reducirajo v heksacianidoferatne(II) ione:



Produkti te reakcije, železovi(III) in heksacianidoferatni(II) ioni tvorijo oborino železovega(III) heksacianidoferata(II) ali prusko modre barve. (Koradin Veronika, 2022)

#### 4.9.2 Priprava raztopin

- 1 % raztopina železovega(III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ ): v 50 mL merilno bučko smo natehtale približno 0,8 g železovega(III) klorida in ga raztopile v destilirani vodi, s katero smo dopolnile do oznake.
- Na enak način smo pripravile tudi 1 % raztopino kalijevega heksacianidoferata(II) (iz  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) in 1 % raztopino kalijevega heksacianidoferata(III) (iz  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Natančne mase spojin so zapisane v tabeli 14.
- Primerjalna raztopina: v epruveti smo zmešale dve kapljici raztopine  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in dvajset kapljic raztopine  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , nastala je prusko modra barva raztopine.

Tabela 14: Mase spojin za raztopine

	m (spojine) g	V (destilirane vode) (mL)
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,8305	50
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,5054	50
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,5071	50

#### 4.9.3 Opis postopka

V epruveto smo dale dve kapljici raztopine  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , zmešale z dvajsetimi kapljicami raztopine  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Pri tem je nastala rjava barva. Na tak način smo pripravile tri epruvete, za vsak vzorec polhove masti posebej.

Uporabile smo vzorce polhove masti vseh treh letnikov (2013, 2020, 2022). Za testiranje prisotnosti antioksidantov smo v epruvete z raztopinama  $\text{Fe}^{3+}$  ionov dodale deset kapljic olja.

Raztopine z vzorci smo primerjali s primerjalno raztopino.

## 4.10 DOLOČANJE E-VITAMINA Z METODO HPLC

#### 4.10.1 Kromatografski parametri

- **Metoda:** HPLC, izokratska elucija na normalni fazi
- **Kolona:** Spherisorb NH<sub>2</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 µm
- **Temperatura:** 25 °C
- **Detekcija:** UV, 294 nm
- **Mobilna faza:** 1,5 % izopropanol v heksanu
- **Pretok:** 1 mL/min
- **Volumen injiciranja:** 20 µl
- **Čas ločbe:** 10 minut
- **Programska oprema:** Chemstation, verzija 9.01

#### 4.10.2 Priprava raztopin standarda za linearnost metode in izračun v vzorcih

Pripravile smo standardne raztopine  $\alpha$ -tokoferola (vitamina E) v heksanu – osnovno raztopino  $\gamma_0$  in pet redčenih raztopin, od  $\gamma_1$  do  $\gamma_5$ , v šestih različnih koncentracijah. Pri izračunu masne koncentracije smo upoštevale čistočo standarda (98,2 %).

- Osnovna raztopina  $\gamma_0$ : v 100 mL merilno bučko smo natehtale približno 110 mg tokoferola, ga raztopile v heksanu in z njim dopolnile do oznake.
- Raztopine  $\gamma_1$  do  $\gamma_5$  smo pripravile z nadaljnjam redčenjem predhodnih raztopin s heksanom. Redčitve in koncentracije so podane v tabeli 15.

Tabela 15: Raztopine standarda E-vitamina za umeritveno premico

	Natehta (mg)	V / redčitve	$\gamma$ (mg/mL)
Osnovna raztopina $\gamma_0$	112,4	100	1,1038
Raztopina $\gamma_1$	/	2,0 $\gamma_0$ / 100 mL	0,02208
Raztopina $\gamma_2$	/	5,0 $\gamma_1$ / 10 mL	0,01104
Raztopina $\gamma_3$	/	5,0 $\gamma_2$ / 10 mL	0,00552
Raztopina $\gamma_4$	/	5,0 $\gamma_3$ / 10 mL	0,00276
Raztopina $\gamma_5$	/	2,0 $\gamma_4$ / 10 mL	0,000552

#### 4.10.3 Priprava raztopin vzorca polhove masti

- Pripravile smo raztopine polhove masti v heksanu s koncentracijo 0,0325 g/mL, tako da smo natehtale okrog 3,25 g masti posameznega vzorca v 100 mL merilno bučko, jo raztopile v heksanu in razredčile s heksanom do oznake.
- Vsak letnik polje masti smo pripravile v dveh paralelkah. Mase so podane v tabeli 16.

Tabela 16: Mase vzorcev polhove masti

Vzorci polhove masti po letih	Oznaka vzorca po paralelkah	m (vzorca) (g)
VZ1 - 2023	VZ1-1p	3,2491
	VZ1-2p	3,5613
VZ2 - 2020	VZ2-1p	3,3070
	VZ2-2p	3,2978
VZ3 - 2013	VZ3-1p	3,4454
	VZ3-2p	3,3122

#### 4.10.4 Opis postopka

- HPLC smo pred začetkom analize kondicionirale. Ko se je tlak na koloni uravnal in je bila bazna linija ravna, smo naredile sekvenco, v katero smo vnesle zaporedje analiziranih raztopin.
- Najprej smo injicirale topilo, sledilo je injiciranje osnovne raztopine standarda za preverjanje ponovljivosti injiciranja in po spiranju sistema s topilom injiciranje

redčenih raztopin standarda od najnižje,  $\gamma_5$ , do najvišje koncentracije,  $\gamma_1$ , za umeritveno premico.

- Na koncu smo analizirale vzorce polhove masti vseh treh letnikov (2013, 2020 in 2023), pripravljene v dveh paralelkah.
- Po končani analizi na HPLC smo v programu Excel iz koncentracij in odzivov standardov izrisale umeritveno premico in iz enačbe premice izračunale koncentracijo E-vitamina v analiziranih vzorcih. Z upoštevanjem zateht in redčitev vzorcev smo izračunale masni delež E-vitamina v posameznem vzorcu v odstotkih.

## 5 REZULTATI S KOMENTARIJ

### 5.1 DOLOČANJE NEUMILJIVEGA DELA

Iz razlik v masi prazne rotavaporske bučke, bučke z ostankom po rotavapiranju in mase vzorca izračunamo neumiljivi del (ND) po enačbi 2. Podatki so zbrani v tabeli 17.

Tabela 17: Podatki o analizah neumiljivega dela

Št. analize in paralelka	m (prazne bučke)	m (bučke z ND)	m (ND)	m (vzorca)	ND
	(g)				
1.	123,84	123,91	0,070	2,07	3,38
2.	1. paralelka	201,72	201,74	0,020	5,02
	2. paralelka	119,02	119,09	0,070	5,02
3.	1. paralelka	120,7082	120,8265	0,1183	5,04
	2. paralelka	124,0876	124,1832	0,1072	5,05
					2,12

#### Komentar:

Zagotovo je bila ta analiza med vsemi našimi najzahtevnejša, predvsem pa najdolgotrajnejša. Izvesti je bilo treba veliko število ekstrakcij in spiranj. Kljub temu da smo jih delale zelo pozorno in da smo upoštevale čase ločevanja ter na rotavaporju počasi odparevale organsko topilo in ostanek sušile v sušilniku, so bile količine ostanka na koncu zelo majhne.

Poskusile smo z originalnim postopkom (ekstrakcija z dietiletrom), a ugotovile, da je bila meja med etrno in vodno fazo precej slabo vidna. Zaradi tega je precej mogoče, da se ekstrakcije niso izvedle povsem kvantitativno. Boljša vidljivost med faznima mejama je bila pri ekstrakciji, kjer smo uporabile topilo heksan ter kombinacijo etra in heksana. V različnih postopkih, opisanih v različnih virih, se kot topilo navaja tako dietileter kot tudi mešanica heksana in dietiletra.

Največjo maso neumiljivega dela smo dobile, ko smo pri ekstrakciji uporabile mešanico topil, heksan in dietileter. Kortikosteroida sta v etru dobro topna, plasti organske in vodne faze pa se vidijo precej bolje kot ob uporabi samega etra.

Med postopkom ekstrakcij in spiranj se je občasno med plastema naredila emulzija, ki smo jo odpravile z izsoljevanjem z dodatkom natrijevega klorida (približno ena konica spatule).



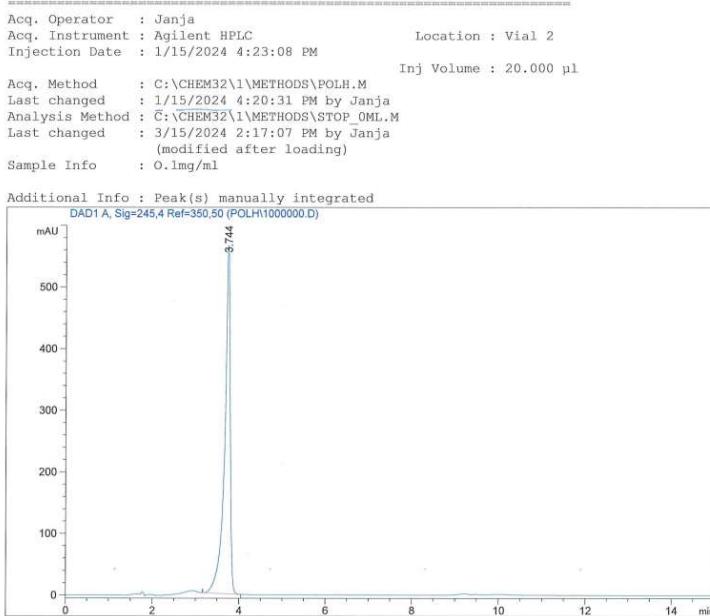
Slika 27: Nastanek emulzije pri spiranju

Analiza je bila za naše raziskovanje zelo pomembna, saj se neumiljivi trdni ostanek uporabi za analizo na morebitno prisotnost kortikosteroidov. Ker smo dobivale izredno majhno količino neumiljivega dela, je bilo že zato težko pričakovati zaznavno vsebnost kortikosteroidov. Razen zelo različnih mas neumiljivega dela je bil tudi videz suhega preostanka zelo različen, zaradi česar je postopek gotovo še potrebno optimizirati.

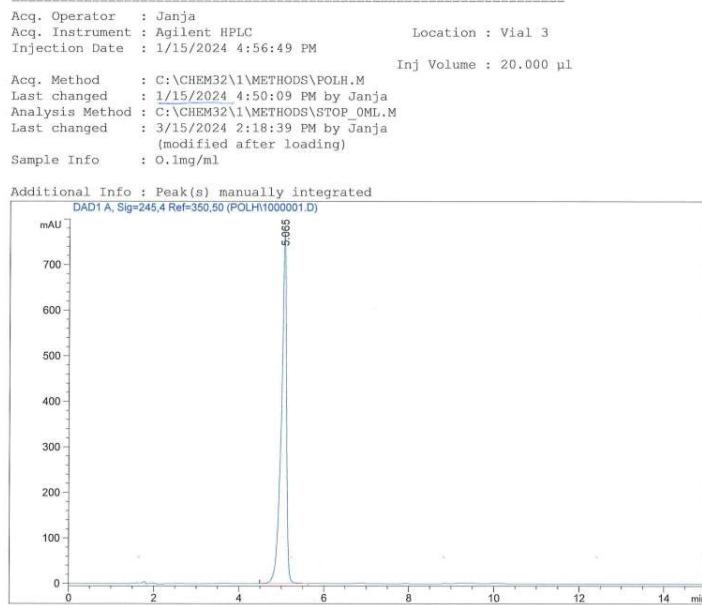
## 5.2 DOLOČANJE KORTIKOSTEROIDOV Z METODO HPLC IN PREVERJANJE METODE

### 5.2.1 Kromatogrami standardov obeh kortikosteroidov

Data File C:\CHEM32\1\DATA\POLH\1000000.D  
Sample Name: hidrokortizon



Data File C:\CHEM32\1\DATA\POLH\1000001.D  
Sample Name: kortikosteron (std)



Slika 28: Kromatograma osnovnih raztopin standardov hidrokortizona ( $R_t = 3,744$  min) in kortikosterona ( $R_t = 5,065$  min)

#### Komentar:

Kromatografska vrhova obeh kortikosteroidov sta med sabo dobro ločena, retencijska časa,  $R_t$ , sta 3,744 min za hidrokortizon oziroma 5,065 min za kortikosteron (slika 28).

### 5.2.2 Kromatogram vzorca in vzorca z dodanima standardoma ter topila

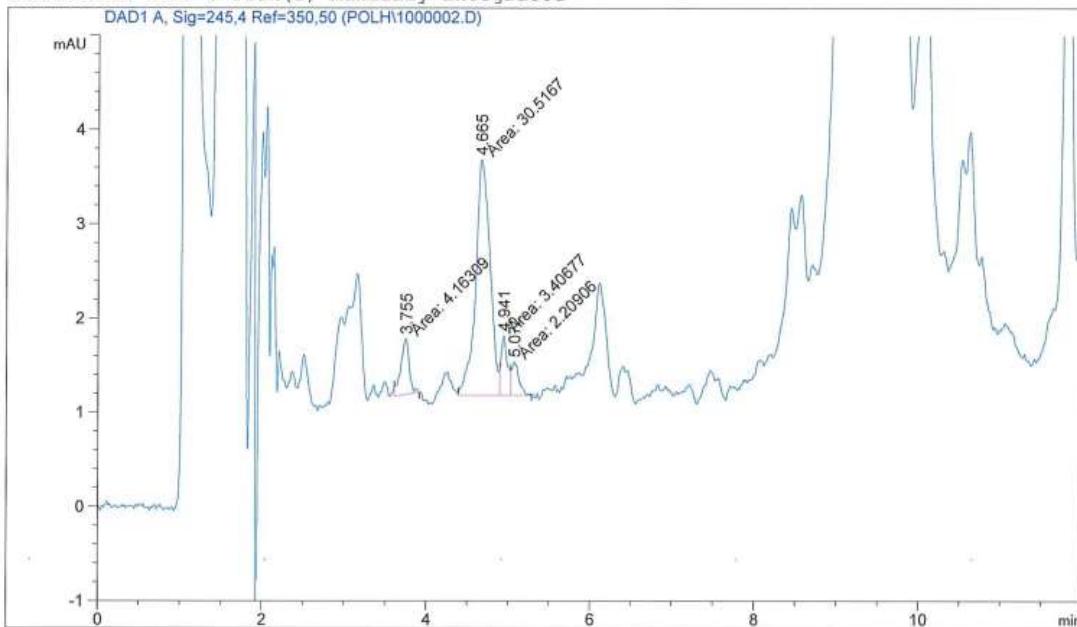
Posnele smo kromatogram vzorca iz leta 2023 po prvi analizi neumiljivega dela. Neumiljivi del smo raztopile v 2,0 mL metanola in ga direktno prefiltrirale v kromatografsko vialo.

V isto vialo smo kasneje dodale raztopini obeh standardov, da bi potrdile vrhova obeh kortikosteroidov v vzorcu. Vrhova kortikosteroidov smo primerjale na primerjalni sliki kromatogramov obeh standardov in vzorca.

Sample Name: vzorec 2023

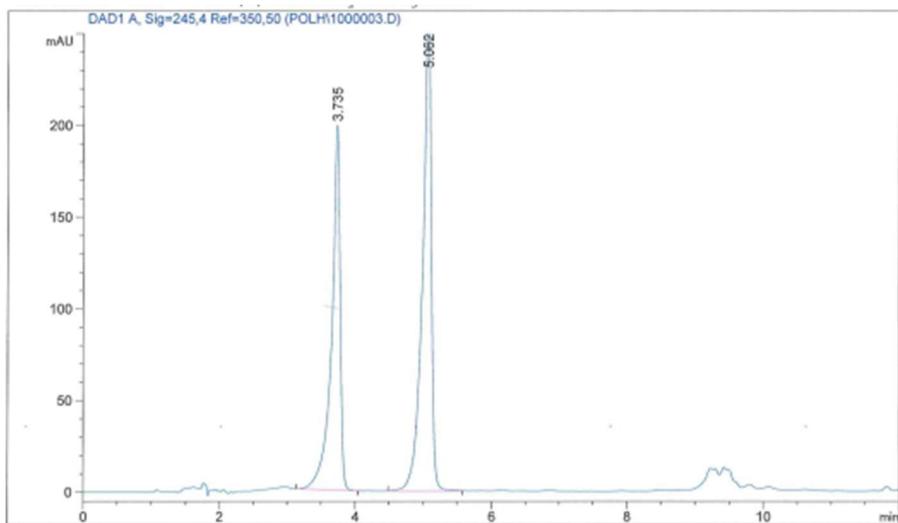
```
=====
Acq. Operator   : Janja
Acq. Instrument : Agilent HPLC
Location       : Vial 4
Injection Date  : 1/15/2024 5:38:16 PM
Inj Volume     : 20.000 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\POLH.M
Last changed   : 1/15/2024 5:23:50 PM by Janja
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STOP_0ML.M
Last changed   : 3/15/2024 3:18:58 PM by Janja
                           (modified after loading)
Sample Info    : nemiljivi del (15.1.2024)
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



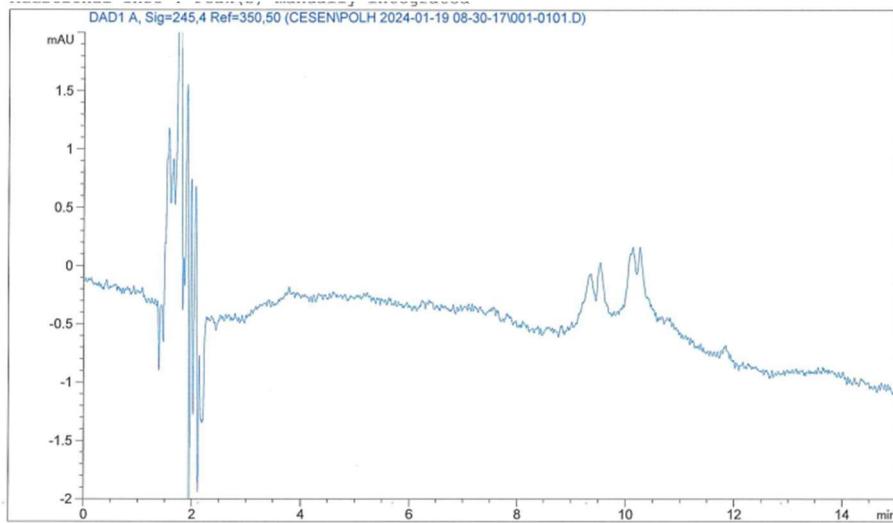
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.755	MM	0.1175	4.16309	5.90653e-1	10.3314
2	4.665	MF	0.2033	30.51670	2.50215	75.7320
3	4.941	MF	0.0896	3.40677	6.33529e-1	8.4544
4	5.072	FM	0.1041	2.20906	3.53709e-1	5.4821

Slika 29: Kromatogram vzorca iz prve analize neumiljivega dela z retencijskimi časi in pripadajočimi ploščinami (Area)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.735	BB	0.1240	1740.00305	199.05473	42.8501
2	5.062	VV	0.1214	2320.66919	269.63708	57.1499

Slika 30: Kromatogram vzorca po prvi analizi neumiljivega dela z dodanima standardoma, s pripadajočima ploščinama vrhov kortikosteroidov



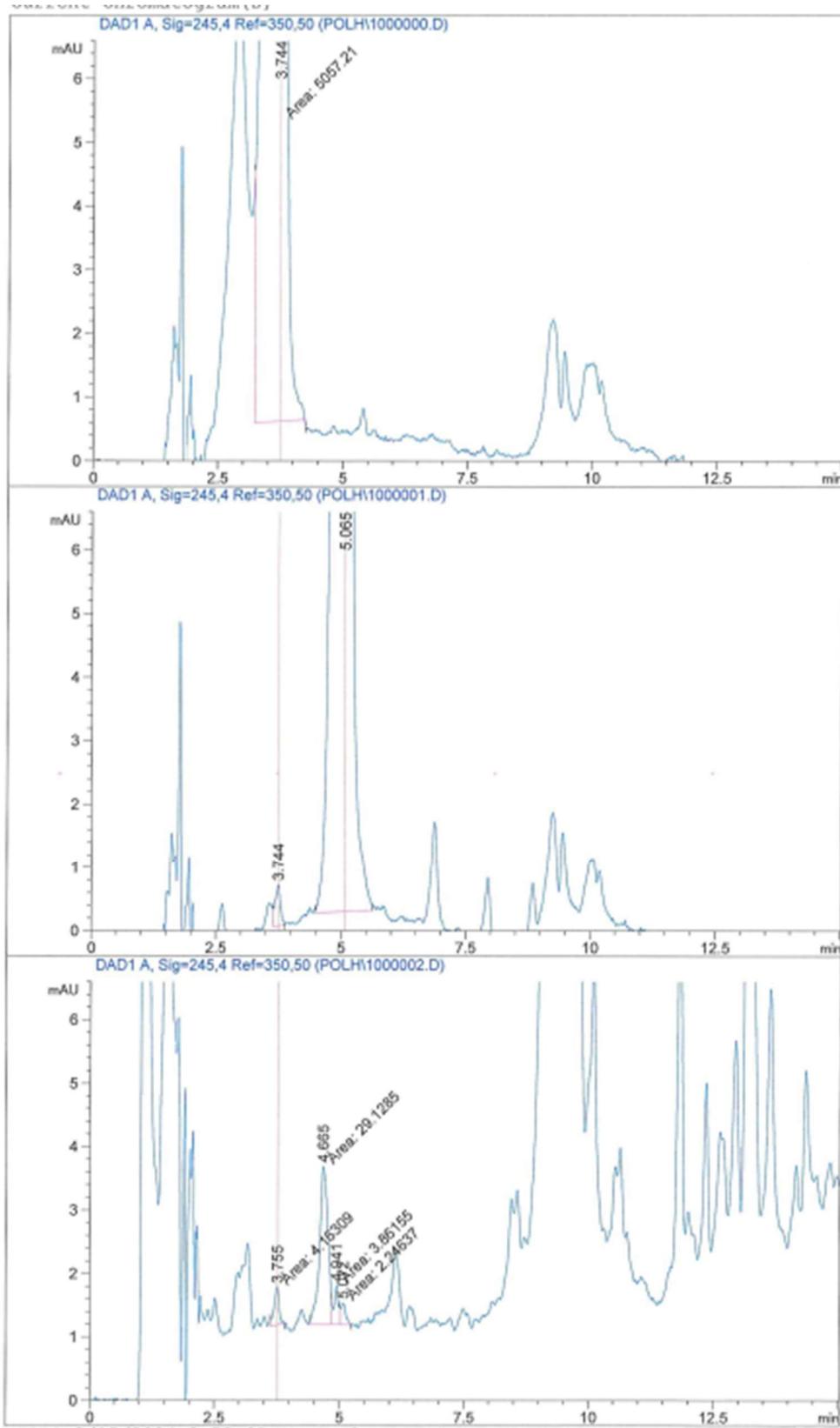
Slika 31: Kromatogram topila

#### Komentar:

Kromatografska vrha obeh kortikosteroidov sta med sabo dobro ločena (slika 30), ločena sta tudi od vseh prisotnih vrhov v topilu (slika 31), kar potrjuje selektivnost metode. Iz primerjave retencijskih časih kortikosteroidov je razvidno, da sta oba kortikosteroidea prisotna v vzorcu, pridobljenem pri prvi analizi neumiljivega dela (topilo za ekstrakcijo je bil dietileter).

Rt (hidrokortizon) = 3,755 min (vzorec) oziroma 3,735 min (kromatogram vzorca s standardoma)

Rt (kortikosteron) = 5,072 min (vzorec) oziroma 5,062 min (kromatogram vzorca s standardoma)



Slika 32: Primerjalna slika kromatogramov obeh standardov in vzorca prve analize neumiljivega dela

```

=====
Integration Results
=====

Signal 1: DAD1 A, Sig=245,4 Ref=350,50 (POLH\1000000.D)

Peak   Time    Type     Area      Height     Width     Start     End
# [min]          [mAU*s]    [mAU]    [min]    [min]    [min]
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 1  3.744  FM  5057.20557  567.00458  0.1487  3.243  4.274

Signal 2: DAD1 A, Sig=245,4 Ref=350,50 (POLH\1000001.D)

Peak   Time    Type     Area      Height     Width     Start     End
# [min]          [mAU*s]    [mAU]    [min]    [min]    [min]
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 1  3.744  VB   4.76045  6.48910e-1  0.0916  3.646  3.880
 2  5.065  VV   6494.02588  771.81158  0.1192  4.492  5.632

Signal 3: DAD1 A, Sig=245,4 Ref=350,50 (POLH\1000002.D)

Peak   Time    Type     Area      Height     Width     Start     End
# [min]          [mAU*s]    [mAU]    [min]    [min]    [min]
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 1  3.755  MM   4.16309  5.90653e-1  0.1175  3.613  3.915
 2  4.665  MF   29.12851  2.48669  0.1952  4.417  4.841
 3  4.941  MF   3.86155  6.18068e-1  0.1041  4.841  5.011
 4  5.072  FM   2.24637  3.38248e-1  0.1107  5.011  5.238
=====
```

*Slika 33: Podatki (retencijski časi in ploščine) vrhov kortikosteroidov*

#### Komentar:

Tako primerjalna slika kot tudi podatki z retencijskimi časi potrdijo prisotnost obeh kortikosteroidov v vzorcu:

Rt (hidrokortizon, standard) = 3,744 min, Rt (hidrokortizon, vzorec) = 3,755 min

Rt (kortikosteron, standard) = 5,065 min, Rt (kortikosteron, vzorec) = 5,072 min

Na kromatogramu standarda kortikosterona je vidno, da le-ta vsebuje tudi nekaj hidrokortizona. Tega je po ploščini približno toliko kot v vzorcu.

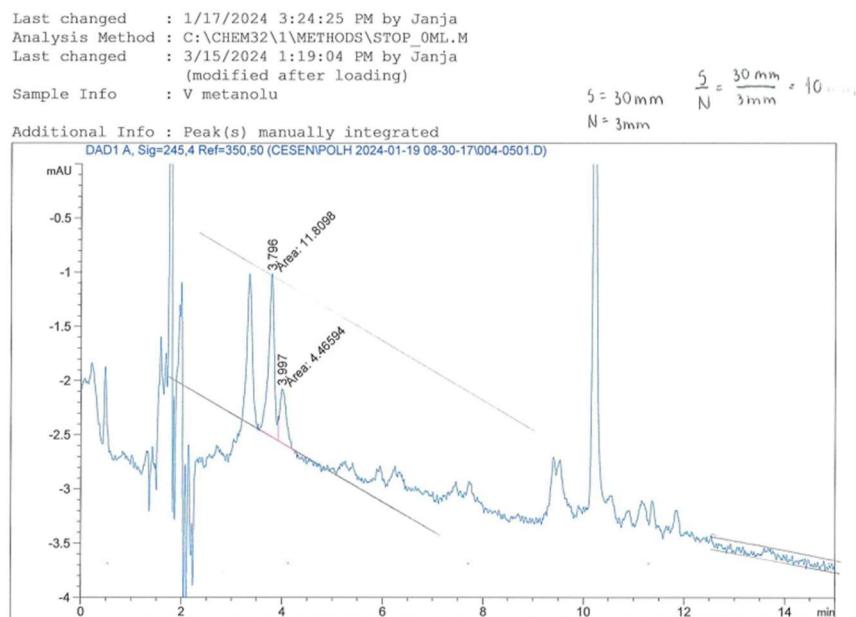
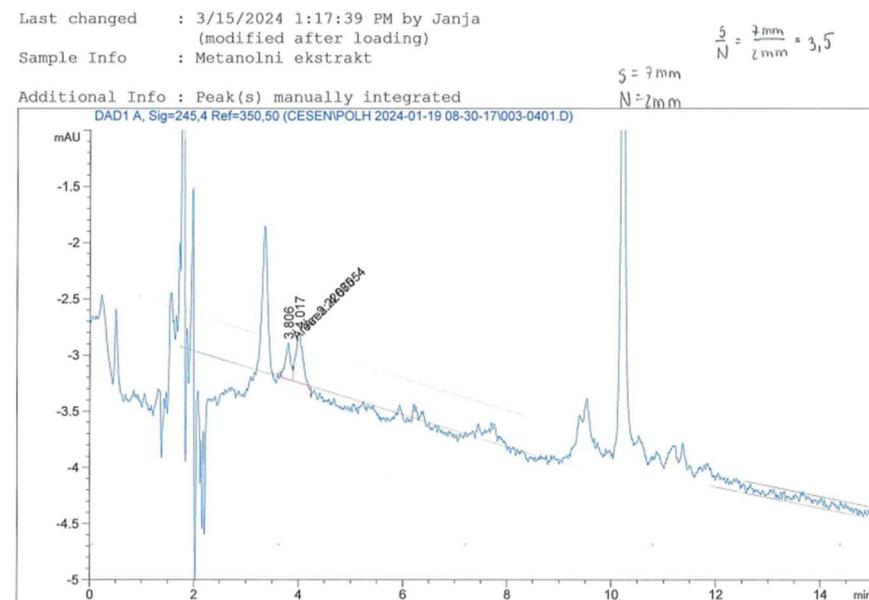
#### **5.2.3 Umeritveni premici hidrokortizona in kortikosterona ter določitev meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) za oba kortikosteroida**

V tabeli 18 so podane ploščine raztopin standarda hidrokortizona.

*Tabela 18: Redčitveni niz hidrokortizona za umeritveno premico*

	$\gamma$ (ug/ml)	A (mAU*s)
$S_{0,H}$	124,3	5062,8
$S_{1,H}$	62,1	2578,3
$S_{2,H}$	31,1	1291,6
$S_{3,H}$	3,11	113,3
$S_{4,H}$	0,311	15,6
$S_{5,H}$	0,0621	5,20

Na kromatogramih raztopin hidrokortizona smo z določitvijo meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) določile raztopini, ki po koncentraciji in dobljeni ploščini kromatografskih vrhov ustrezata temu mejama. LOD ozziroma LOQ smo določile iz razmerja med odzivom ( $S$  – ang. signal) in šumom bazne linije ( $N$  – ang. noise), ki mora biti za LOD minimalno 3 ter za LOQ najmanj 10. (ICH harmonization for better health, 1994)

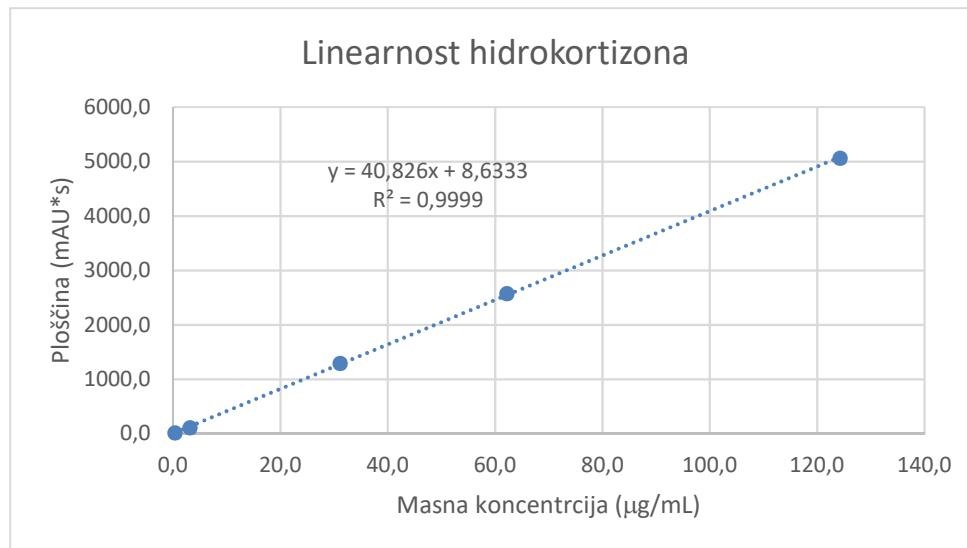


Slika 34: Kromatogram raztopine  $S_{5,H}$ , ki ustreza LOD (zgornja slika) in kromatogram raztopine  $S_{4,H}$ , ki ustreza LOQ (spodnja slika)

#### Komentar:

Raztopina standarda hidrokortizona s koncentracijo  $0,0621 \mu\text{g/mL}$  ( $S_{5,H}$ ) ustreza meji zaznavnosti (LOD), saj je razmerje med signalom in šumom (v nadaljevanju: S/N) enako 3,5. Raztopina standarda hidrokortizona s koncentracijo  $0,311 \mu\text{g/mL}$  ( $S_{4,H}$ ) ustreza meji določljivosti (LOQ), saj je S/N enako 10.

Premico za linearnost hidrokortizona smo izrisale brez raztopine standarda S<sub>5,H</sub>, ki je pod mejo določljivosti (LOQ).



Slika 35: Umeritvena premica hidrokortizona z enačbo premice in korelacijskim koeficientom,  $R^2$

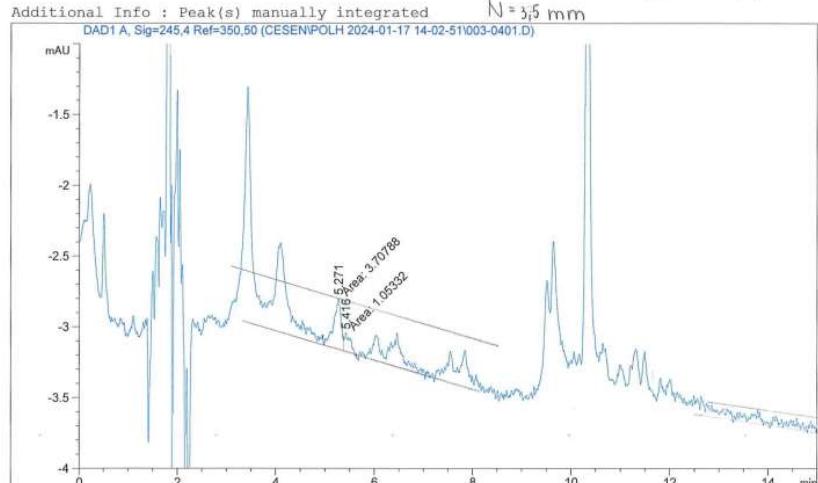
V tabeli 19 so podane ploščine raztopin standarda kortikosterona.

Tabela 19: Redčitveni niz kortikosterona za umeritveno premico

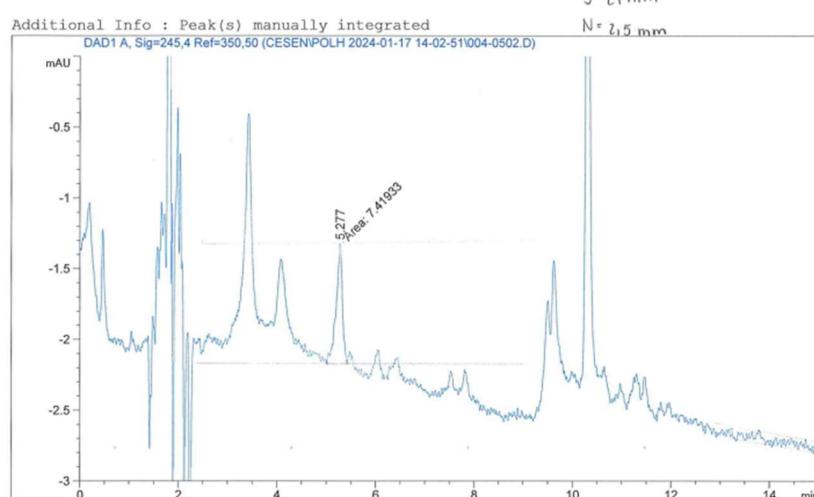
	$\gamma$ (ug/ml)	A (mAU*s)
S <sub>0,K</sub>	129,0	6432,2
S <sub>1,K</sub>	64,5	3265,0
S <sub>2,K</sub>	12,9	649,3
S <sub>3,K</sub>	1,29	62,6
S <sub>4,K</sub>	0,129	6,9
S <sub>5,K</sub>	0,0258	3,22

Tudi na kromatogramih raztopin kortikosterona smo z izračunom LOD in LOQ določile raztopini, ki po koncentraciji in dobljeni ploščini kromatografskih vrhov ustreza obema mejama.

Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STOP\_0ML.M  
 Last changed : 3/15/2024 12:16:14 PM by Janja  
 (modified after loading)  
 Sample Info : Metanolni ekstrakt       $S = 1 \text{ mm}$        $\frac{S}{N} = \frac{1 \text{ mm}}{3,5 \text{ mm}} = 3,14$   
 Additional Info : Peak(s) manually integrated       $N = 3,5 \text{ mm}$



Last changed : 3/15/2024 12:19:11 PM by Janja  
 (modified after loading)  
 Sample Info : V metanolu       $S = 27 \text{ mm}$        $\frac{S}{N} = \frac{27 \text{ mm}}{2,5 \text{ mm}} = 10,8$

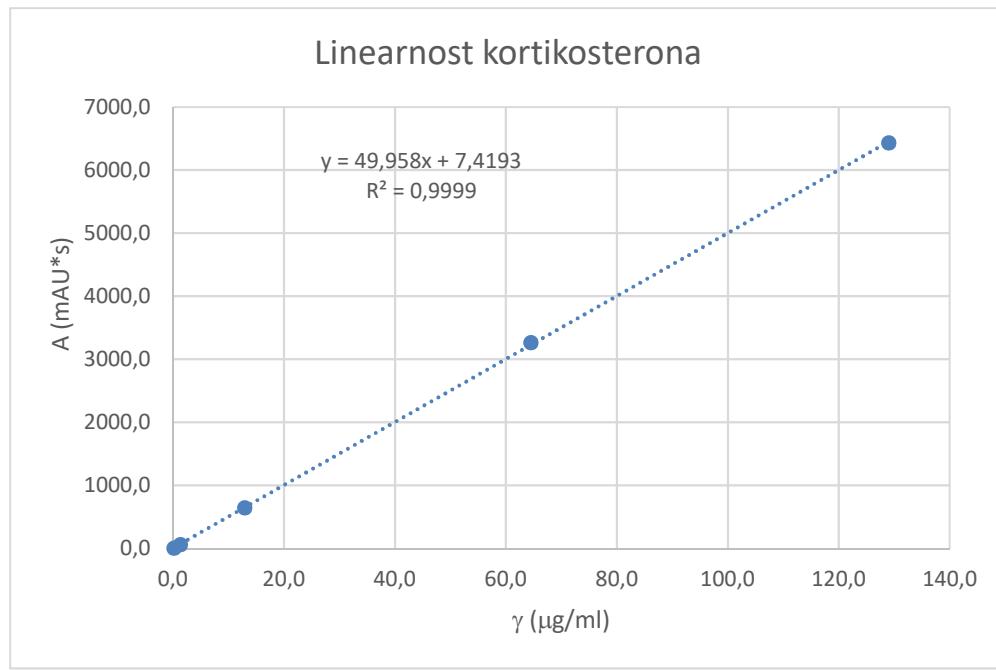


Slika 36: Kromatogram raztopine  $S_{5,K}$  ki ustreza LOD (zgornja slika), in kromatogram raztopine  $S_{4,K}$  ki ustreza LOQ (spodnja slika)

#### Komentar:

Raztopina standarda kortikosterona s koncentracijo  $0,0258 \mu\text{g/mL}$  ( $S_{5,K}$ ) ustreza meji zaznavnosti (LOD), saj je razmerje S/N enako 3,14. Raztopina standarda kortikosterona s koncentracijo  $0,129 \mu\text{g/mL}$  ( $S_{4,K}$ ) ustreza meji določljivosti (LOQ), saj je razmerje S/N enako 10,8.

Premico za linearnost kortikosterona smo izrisale brez raztopine standarda  $S_{5,K}$ , ki je pod mejo določljivosti ( $< \text{LOQ}$ ).

Slika 37: Umeritvena premica kortikosterona z enačbo premice in koreacijskimi koeficientom,  $R^2$ 

#### 5.2.4 Določitev ponovljivosti injiciranja

Ponovljivost injiciranja smo preverile s šestimi zaporednimi injiciranjimi standarda kortikosterona, izračunale smo povprečno vrednost, standardni odklon (STDEV) in relativni standardni odklon (RSD) v odstotkih (tabela 20).

Tabela 20: Ponovljivost injiciranja standarda kortikosterona

Št. injiciranja	A ( $\text{mAU} \cdot \text{s}$ )
1	6278,5
2	6698,2
3	6380,6
4	6340,2
5	6577,1
6	6318,4
povprečje	6432,2
STDEV	167
RSD (%)	2,6

#### Komentar:

Ponovljivost injiciranja je dobra, saj ima RSD dovolj nizko vrednost, 2,6 %.

### 5.2.5 Določitev stabilnosti raztopin standardov

Za preverjanje stabilnosti raztopin standardov hidrokortizona in kortikosterona smo obe osnovni raztopini injicirali sveže pripravljeni ( $t = 0$  h) ter po dvodnevnom hranjenju v hladilniku ( $t = 48$  h) (tabela 21).

Tabela 21: Stabilnost raztopin standardov kortikosteroidov

Standard	A (mAU*s)		Stabilnost (%)
	$t = 0$ h	$t = 48$ h	
hidrokortizon	4971,9	5062,8	<b>101,83</b>
kortikosteron	6494,3	6432,2	<b>99,04</b>

Komentar:

Tako raztopina standarda hidrokortizona kot tudi kortikosterona sta stabilni, če sta hranjeni v hladilniku vsaj 48 ur.

### 5.2.6 Določitev kortikosteroidov v vzorcih

V vzorcu, pridobljenem s prvo analizo neumiljivega dela, smo ugotovile prisotnost obeh kortikosteroidov. Iz površin na kromatogramu smo izračunale vsebnost v vzorcih v odstotkih oziroma ppm (*parts per million*). Izračun smo izvedle s pomočjo enačbe umeritvene premice, podatkov o redčitvi vzorca in mase vzorca za neumiljivi del.

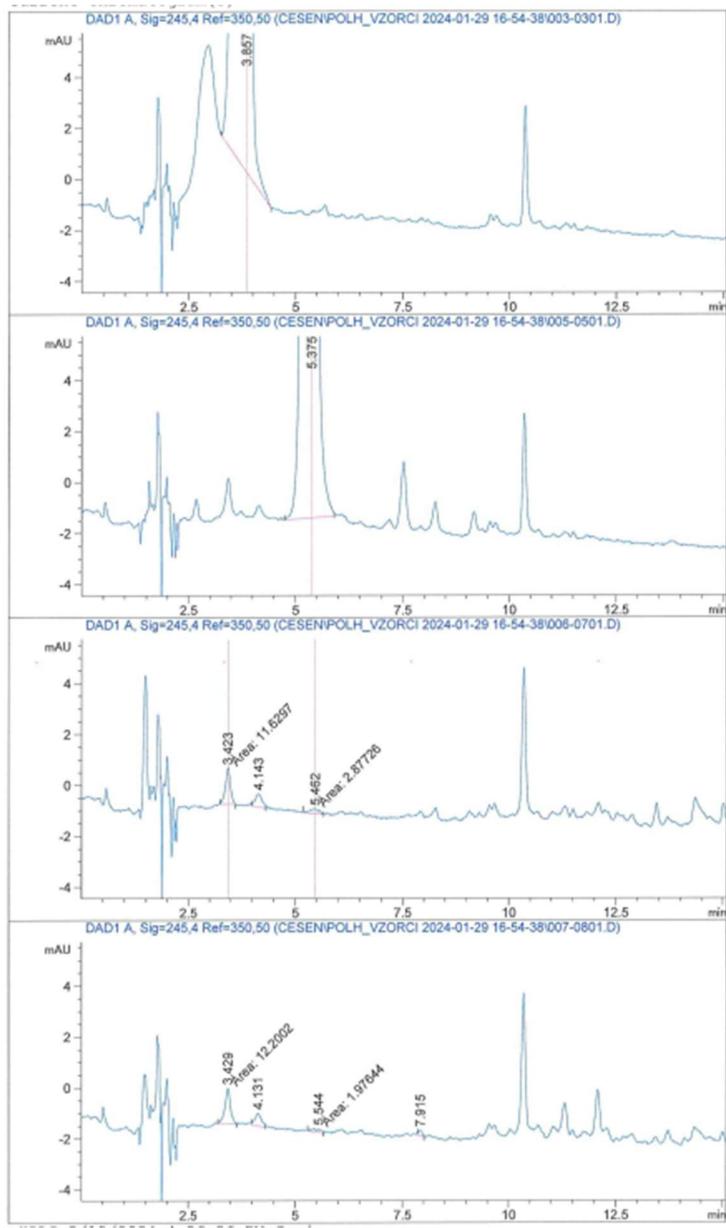
$$m \text{ (vzorca)} = 2,07 \text{ g} \text{ (prva analiza neumiljivega dela)}$$

Tabela 22: Vsebnost kortikosteroidov v prvem vzorcu

Kortikosteroid	A (mAU*s)	$\gamma$ (mg/ml)	m (mg)	Vsebnost v vzorcu	
				%	ppm
hidrokortizon	4,16309	0,0665	0,333	$1,61 \cdot 10^{-5}$	0,161
kortikosteron	2,6	0,0970	0,485	$2,34 \cdot 10^{-5}$	0,234

Komentar:

V neumiljivem delu, ki smo ga pridobile z dietiletrom kot topilom za ekstrakcijo, smo sicer ugotovile prisotnost obeh kortikosteroidov, hidrokortizona in kortikosterona, a sta koncentraciji obeh pod LOQ, zato tudi za izračunano koncentracijo ne moremo trditi, da je točna.



*Slika 38: Primerjalni kromatogram vzorca iz druge analize neumiljivega dela z retencijskimi časi in pripadajočimi ploščinami (Area)*

#### Komentar:

V vzorcu neumiljivega dela, ki smo ga izvedle s heksanom kot topilom za ekstrakcijo, smo ugotovile le prisotnost kortikosterona, a je odziv pod LOQ, odziva hidrokortizona na kromatogramu ni opaziti (pod LOD).

V vzorcu neumiljivega dela, izvedenega s heksanom in dietiletrom kot topilom, odzivov za kortikosteroida nismo opazile.

Zaradi vsebnosti kortikosteroidov pod mejo določljivosti (LOQ) oziroma celo zaznavnosti (LOD) tudi nismo mogle izvesti preverjanja točnosti metode. Poskusile smo z dodajanjem standarda v vialo prvega vzorca, a ob tako majhni vsebnosti kortikosteroidov točnosti ni mogoče izračunati.

## 5.3 DOLOČANJE JODOVEGA ŠTEVILA

### 5.3.1 Standardizacija 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Standardizacijo Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> smo izvedle v dveh paralelkah in koncentracijo izračunale po enačbi 6 (poglavlje 4.5.3). Poraba reagenta NaIO<sub>3</sub> za standardizacijo in izračunani točni množinski koncentraciji obeh paralelek in povprečna množinska koncentracija Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> so podani v tabeli 23.

Tabela 23: Standardizacija Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

	V Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mL)	C Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mol/L)
1. paralelka	19,90	0,09735
2. paralelka	19,22	0,09740
$\bar{C}$ Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mol/L)		<b>0,09742</b>

### 5.3.2 Določanje jodovega števila

Polhovo mast (letnik 2023) in nekaj drugih maščob za primerjavo smo analizirale v dveh paralelkah. Porabe titranta Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in izračunane vrednosti jodovega števila so podane v spodnji tabeli (tabela 24). Jodovo število smo izračunale po enačbi 7 (poglavlje 4.5.4). Poraba titranta Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> za titracijo vzorca posamezne maščobe je v enačbi 7 označena z V<sub>1</sub>.

Pred titracijo posamezne paralelke maščobe smo izvedle tudi slepi preizkus (V<sub>SLEPI</sub> = 57,09 mL). Titrirale smo zmes vseh reagentov, pripravljeno po enakem postopku kot vzorci, a brez dodane maščobe. Poraba slepega vzorca je v enačbi 7 označena kot V.

Tabela 24: Jodovo število polhove masti in nekaterih drugih maščob

Vrsta maščobe		Volumen Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , V <sub>1</sub> (mL)	Jodovo št.	Povprečna vrednost jodovega št.	Jodovo št. iz literature*
				(g joda / 100 g maščobe)	
Mandljevo olje	1. paralelka	7,20	96,6	94,1	93–105
	2. paralelka	2,50	91,6		
Oljčno olje	1. paralelka	17,44	79,9	79,7	79–80
	2. paralelka	23,50	79,5		
Olje grozdnih pešk	1. paralelka	2,80	123,3	126,6	94–157
	2. paralelka	2,70	129,8		
Karitejevo maslo	1. paralelka	30,16	59,4	58,8	30–75
	2. paralelka	11,60	58,2		
Polhova mast	1. paralelka	1,55	92,8	101,9	
	2. paralelka	6,30	110,9		

\* Naše rezultate smo primerjali z najdenimi v literaturi. (Iodine value, 2024)

**Komentar:**

Za primerjavo smo vzele eno maščobo v trdnem stanju (karitejevo maslo), za katero je značilno, da vsebuje manj nenasičenih maščobnih kislin in ima torej nižje jodovo število, ter tri olja, znana po večji vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin, ki pomenijo visoko jodovo število.

Kljub temu da za živalske maščobe velja, da vsebujejo več nasičenih kot nenasičenih maščobnih kislin, rezultat jodovega števila polhove masti pokaže, da še zdaleč ni tako. Jodovo število polhove masti je nižje zgolj od olja grozdnih pešk. Na to kaže že agregatno stanje polhove masti, ki je v resnici olje.

#### **5.4 TITRACIJSKO DOLOČANJE PEROKSIDNEGA ŠTEVILA**

Porabe titranta  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  in izračunane vrednosti peroksidnega števila ( $I_P$ ) so podane v spodnji tabeli (tabela 25). Peroksidno število smo izračunale po enačbi 9 (poglavlje 4.6.3). Poraba titranta  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  za titracijo vzorca posamezne maščobe je v enačbi 9 označena z  $V_2$ .

Pred titracijo posamezne paralelke maščobe smo izvedle tudi slepi preizkus ( $\text{VSLEP} = 0 \text{ mL}$ ). Titrirale smo zmes vseh reagentov, pripravljeno po enakem postopku kot vzorci, a brez dodane maščobe. Poraba slepega vzorca je v enačbi 9 označena kot  $V_1$ .

Tabela 25: Peroksidno število v vzorcih

	$V_2 (\text{mL})$	$I_P$	$\overline{I_P}$
Polhova mast, letnik 2013	0,5	0,97	0,985
	0,5	1,00	
Polhova mast, letnik 2020	0,6	1,20	1,265
	0,7	1,33	
Polhova mast, letnik 2023	0,5	0,98	0,980
	0,5	0,98	

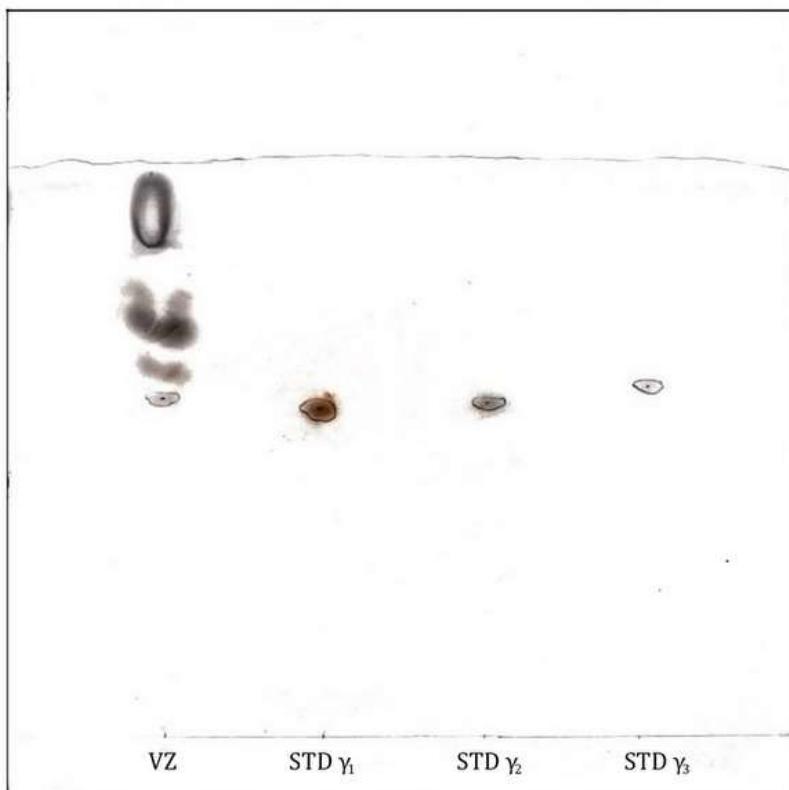
**Komentar:**

Po rezultatih izstopa vzorec, ki je po starosti na drugem mestu, hkrati pa sta si najstarejši in najnovejši vzorec povsem blizu. Zato razlik v vrednosti ne moremo pripisati starosti polhove masti, očitno je razlika pri vzorcu iz leta 2020 izhajala iz posebnosti maščobe tega leta. Žal pri analizi jodovega števila še nismo imele na razpolago starejših vzorcev, da bi lahko ugotovile, ali bi bila razlika zaznana že pri tem parametru. V nadaljevanju raziskovanja smo izvedle tudi kvantitativno določitev izbranih maščobnih kislin, ki ni pokazala občutnejših razlik med letniki polhove masti.

## 5.5 DOLOČANJE HOLESTEROLA Z METODO TLC

### 5.5.1 IDENTIFIKACIJA LIS IN DOLOČITEV KOLIČINE HOLESTEROLA

Na razvitem kromatogramu (slika 39) smo identificirale lise, ki pripadajo holesterolu, tako da smo jih primerjale z lisami v standardu.



Slika 39: Obdelana fotografija razvitega kromatograma

Lise od leve proti desni pripadajo:

- VZ – vzorec polhove masti, letnik 2023
- STD  $\gamma_1$  do STD  $\gamma_3$  – raztopine standarda, v koncentracijah 416,0 ng/mL, 104,0 ng/mL in 52,0 ng/mL (tabela 10)

Izmerile smo pot mobilne faze in pot holesterola (sredina lise, ki pripada holesterolu) ter izračunale retenzijske faktorje Rf.

- pot mobilne faze: 14,4 cm
- pot snovi – lise holesterola, standard  $\gamma_1$  = 8,3 cm
- pot snovi – lise holesterola, standard  $\gamma_2$  = 8,4 cm
- pot snovi – lise holesterola, standard  $\gamma_3$  = 8,6 cm
- pot snovi – lise holesterola, vzorec: = 8,5 cm

**Izračun Rf faktorja:**

- holesterol, standard  $\gamma_1$  :

$$Rf(\gamma_1) = \text{pot holesterola} / \text{pot mobilne faze} = 8,3 \text{ cm} / 14,4 \text{ cm} = 0,58$$

$$Rf(\gamma_2) = 0,58$$

$$Rf(\gamma_3) = 0,60$$

- holesterol, vzorec:

$$Rf = \text{pot holesterola} / \text{pot mobilne faze} = 8,5 \text{ cm} / 14,4 \text{ cm} = 0,59$$

### Določitev približne količine holesterola v vzorcu:

- S primerjavo velikosti lise v vzorcu in velikostmi lis posameznih raztopin standarda smo določile približno koncentracijo lise v vzorcu in iz koncentracije izračunale odstotek holesterola v vzorcu polšje masti.
- Glede na videz sklepamo, da je lisa holesterola v vzorcu po velikosti med liso pri STD  $\gamma_2$  ( $\gamma = 104,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) in liso pri STD  $\gamma_3$  ( $\gamma = 52,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ).
- Po naši oceni smo določile koncentracijo približno  $80 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .
- Nanesle smo  $10 \mu\text{L}$  posamezne raztopine, zato lisa v vzorcu pripada masi približno  $800 \text{ ng}$  ali  $0,0008 \text{ mg}$ . Ob upoštevanju redčitev standarda (tabela 10) je masa holesterola tako  $6400 \text{ ng}$  ali  $0,0064 \text{ mg}$ .

### Ocenjen delež holesterola v vzorcu:

$$w(\text{holesterola}) = m(\text{ocenjena masa holesterola, vzorec}) / m(\text{vzorca}) =$$

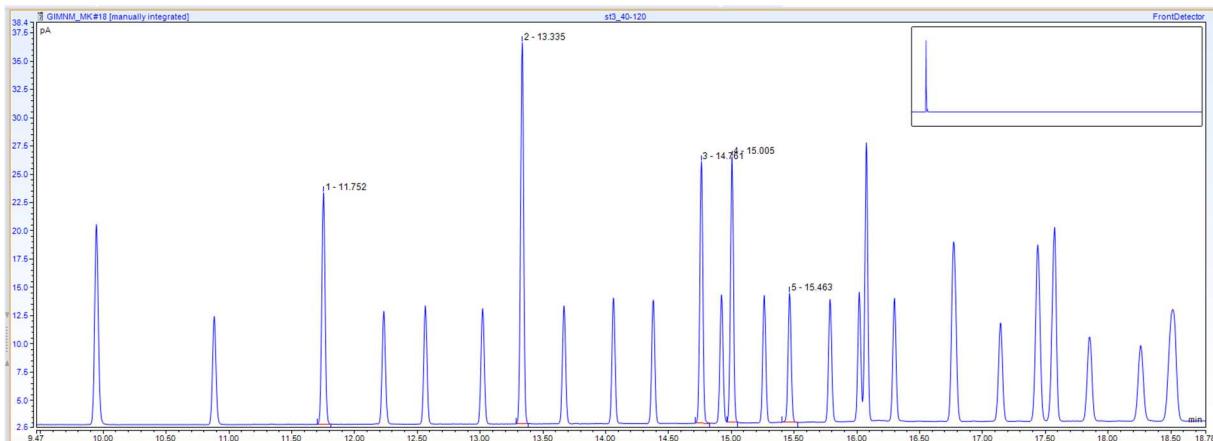
$$0,0064 \text{ mg} / 510 \text{ mg} = 0,000013 = 0,0013 \%$$

### Komentar:

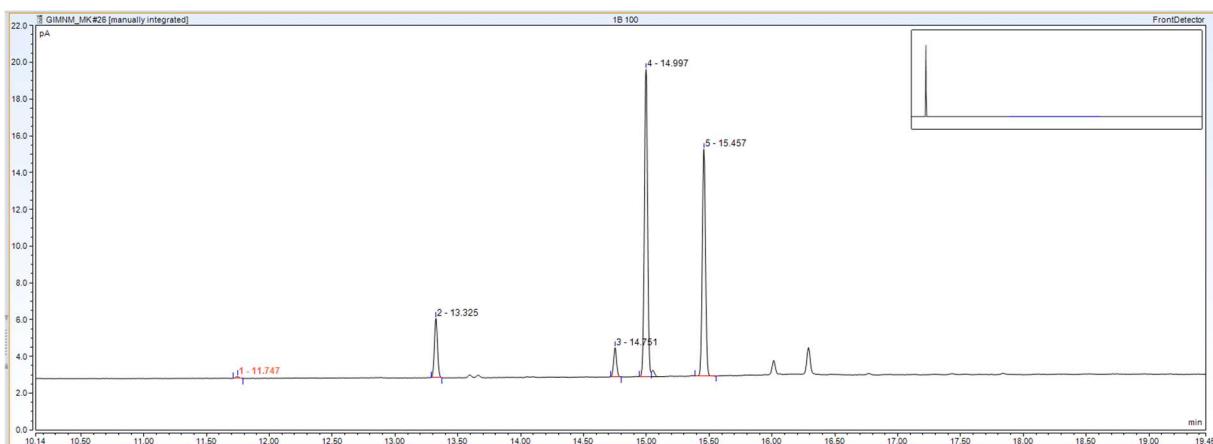
Rf faktorji za standard se med sabo malo razlikujejo, lisi za STD  $\gamma_1$  in STD  $\gamma_1$  sta rahlo nižje od lise za STD  $\gamma_3$ , a ima le-ta skoraj enako vrednost kot spodnja lisa pri vzorcu. Zato lahko z gotovostjo trdimo, da spodnja lisa vzorca po poziciji ustreza lisam standarda holesterola. Ravno tako lahko ugotovimo, da je količina holesterola v vzorcu zelo majhna, kar je tudi v skladu z našimi pričakovanji. Največ holesterola namreč vsebujejo maščobe, ki imajo veliko nasičenih maščobnih kislin, medtem ko ga v oljih z večjo vsebnostjo nenasicienih maščobnih kislin praktično ni.

## 5.6 DOLOČANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE Z METODO GC

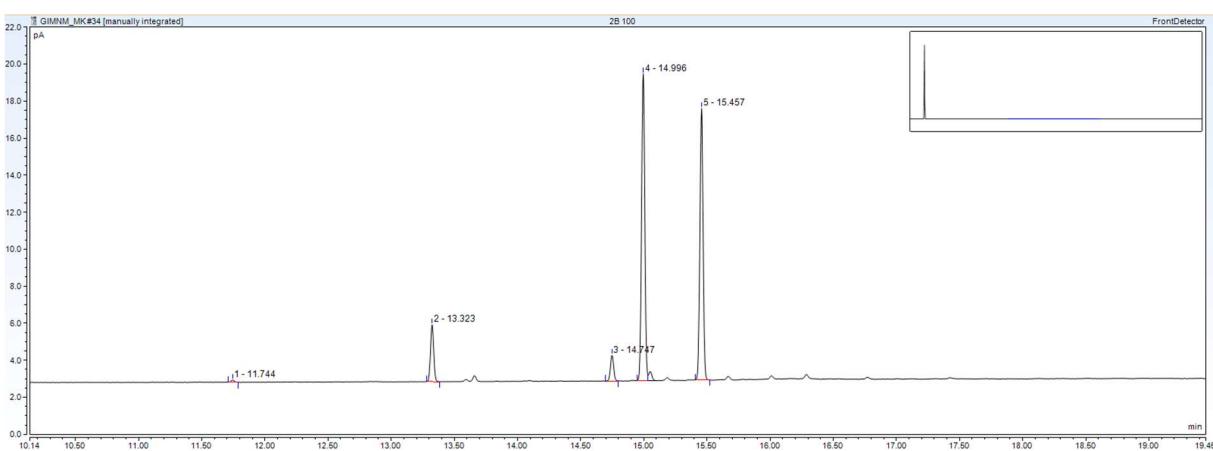
### 5.6.1 Kromatogrami



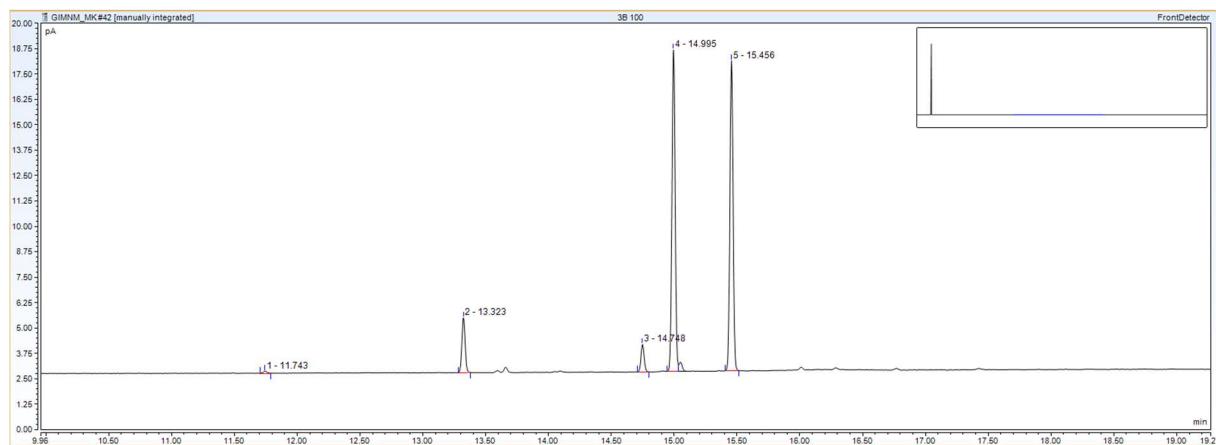
Slika 40: Kromatogram mešanice standarda Fame Mix z integriranimi odzvi izbranih maščobnih kislin



Slika 41: Kromatogram vzorca polhove masti iz leta 2013



Slika 42: Kromatogram vzorca polhove masti iz leta 2020



Slika 43: Kromatogram vzorca polhove masti iz leta 2023

**5.6.2 Identifikacija kromatografskih vrhov določevanih estrov maščobnih kislin**  
 Glede na retencijski čas linolejske kisline, ki smo jo uporabile za identifikacijo odzivov kislin oziroma njihovih estrov, smo iz podatkov na certifikatu standarda Fame Mix določile retencijske čase odzivov tistih estrov maščobnih kislin, ki smo jih kvantitativno ovrednotili. Retencijski časi so zbrani v tabeli 26.

Tabela 26: Retencijski časi estrov izbranih maščobnih kislin

zap. št.	Ester maščobne kisline	t <sub>R</sub> [min]
1	metil miristat	11,75
2	metil palmitat	13,33
3	metil stearat	14,76
4	metil cis-9-oleat	15,00
5	metil linoleat	15,46

### 5.6.3 Umeritvene premice standardov estrov maščobnih kislin

Uredile smo podatke (tabela 27) za posamezne maščobne kisline, iz kromatograma smo določile retencijske čase (t<sub>R</sub>), iz redčitev standarda Fame Mix masne koncentracije ( $\gamma$ ) v posamezni raztopini standarda ter dodale molske mase estrov maščobnih kislin (ester MK) ter maščobnih kislin (MK) samih.

Tabela 27: Podatki za maščobne kisline

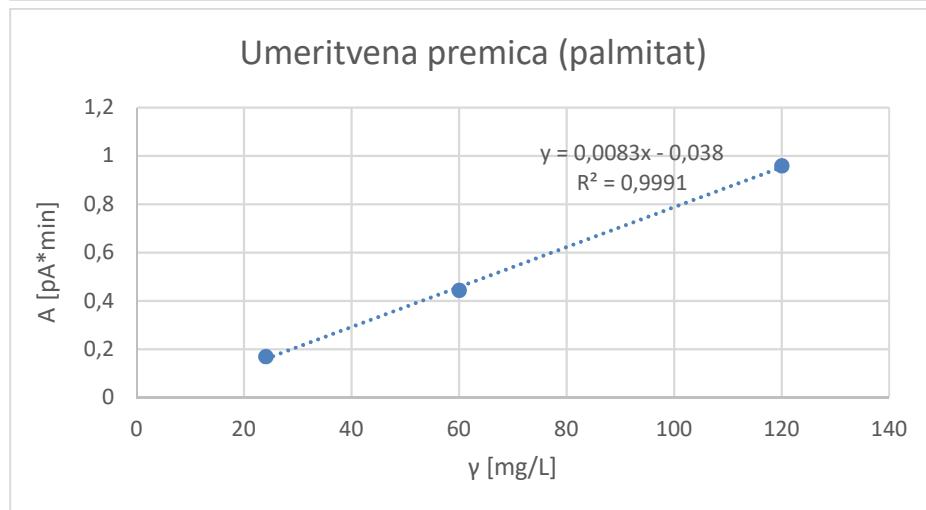
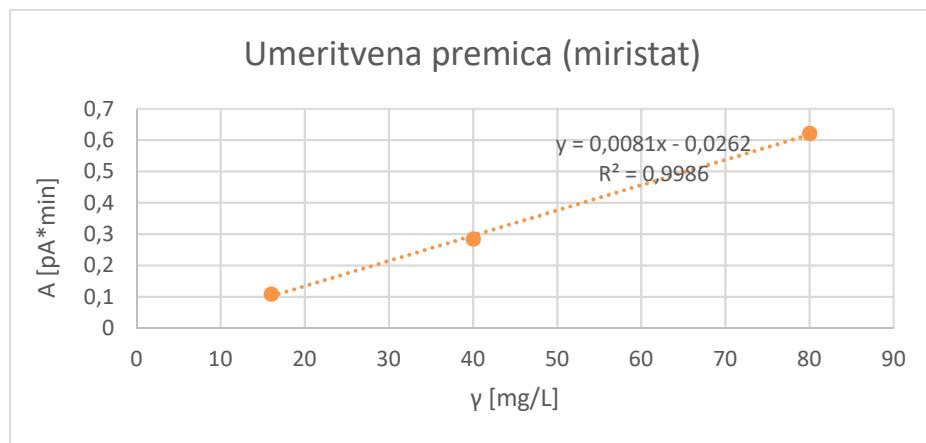
Spojina	t <sub>R</sub> [min]	$\gamma$ v različnih raztopinah standarda (mg/L)			M[g/mol]	
		ester MK	MK			
metil miristat	11,75	16	40	80	242,5	228,4
metil palmitat	13,33	24	60	120	270,5	256,4
metil stearat	14,76	16	40	80	298,5	284,4
metil cis-9-oleat	15,00	16	40	80	296,5	282,4
metil linoleat	15,46	8	20	40	294,5	280,4

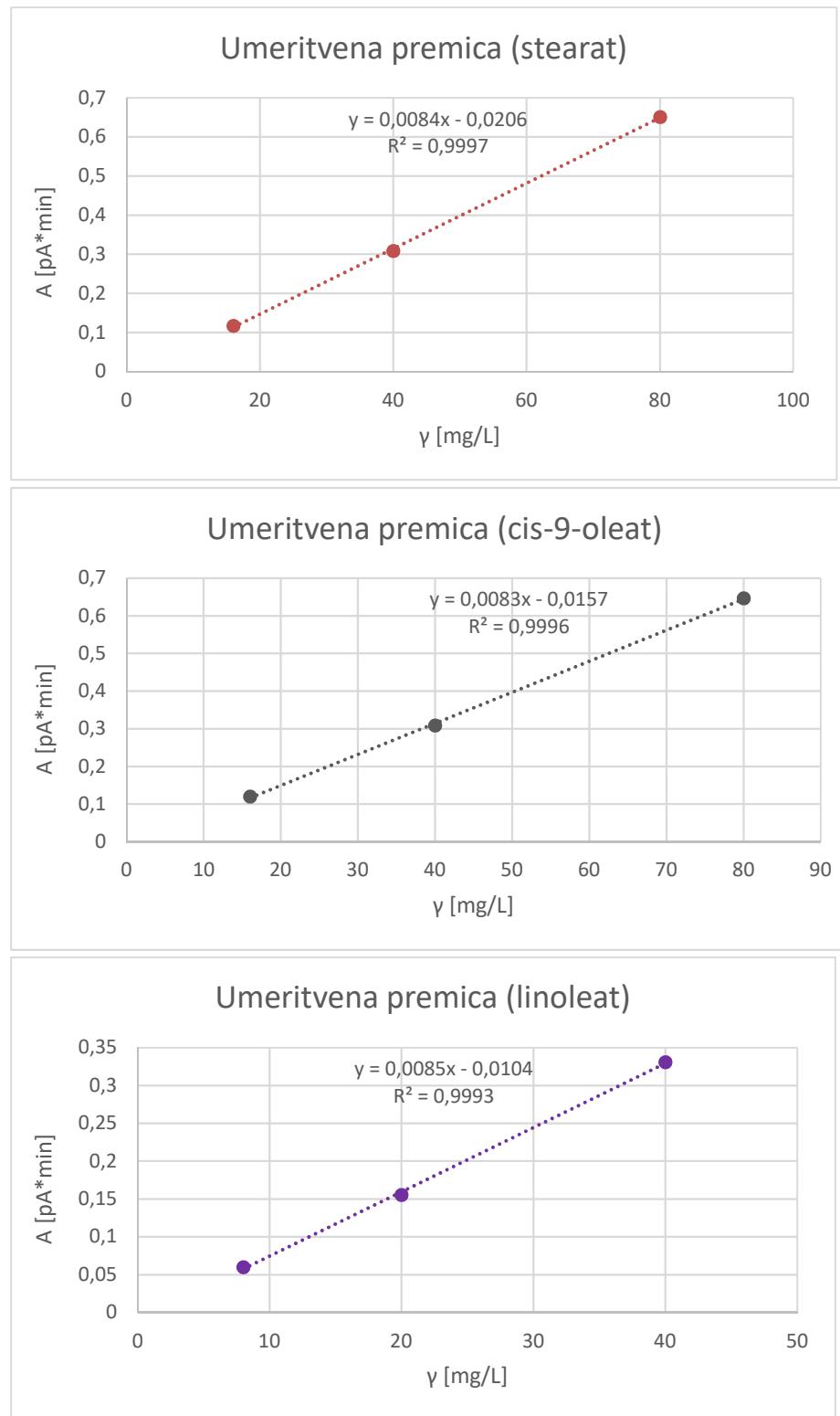
Iz kromatogramov posameznih standardov smo izpisale ploščine metilnih estrov maščobnih kislin (Tabela 28).

Tabela 28: Koncentracije estrov maščobnih kislin v standardih ( $\gamma$ ) in ploščine (A) njihovih kromatografskih vrhov

METIL MIRISTAT		METIL PALMITAT		MEIL STEARAT		METIL CIS-9-OLEAT		METIL LINOLEAT	
$\gamma$ (mg/L)	A (pA*min)								
16	0,1095	24	0,169	16	0,1169	16	0,1199	8	0,0601
40	0,2849	60	0,4438	40	0,3085	40	0,3086	20	0,1554
80	0,622	120	0,9586	80	0,6511	80	0,6466	40	0,3308

V Excel smo vnesle podatke o ploščinah kromatografskih vrhov in pripadajočih koncentracij ter izrisale umeritvene premice za vsak analit posebej. Enačbe premic, ki smo jih dobile na ta način, smo nato uporabile za izračune vsebnosti posameznih maščobnih kislin v vzorcih.





Slika 44: Umeritvene premice izbranih maščobnih kislin

#### 5.6.4 Izračun masnih koncentracij estrov maščobnih kislin in masnih deležev maščobnih kislin v vzorcih

Masne koncentracije estrov maščobnih kislin (tabela 29) in masne deleže maščobnih kislin (tabela 30) v vzorcih smo izračunale po enačbi 11.

Tabela 29: Rezultati masnih koncentracij estrov maščobnih kislin v vzorcih

Oznaka vzorca	$\gamma$ (mg/L)				
	miristat	palmitat	stearat	cis-9-oleat	linoleat
1A	37,9	1243,4	575,7	6380,7	4572,9
1B	39,0	1132,3	520,5	6125,3	4408,2
2A	48,5	1309,5	578,2	6406,0	5477,6
2B	49,2	1167,1	519,9	6084,3	5164,7
3A	39,3	1055,3	495,2	5656,6	5048,2
3B	42,7	994,3	464,5	5865,1	5394,1

Tabela 30: Rezultati masnih deležev maščobnih kislin v vzorcih

Oznaka vzorca	W (%)				
	miristinska kislina	palmitinska kislina	stearinska kislina	cis-9-oleinska kislina	linolejska kislina
1A	0,13	4,33	2,02	22,3	16,0
1B	0,13	3,80	1,75	20,6	14,8
<b>povprečje l. 2013</b>	<b>0,13</b>	<b>4,07</b>	<b>1,89</b>	<b>21,5</b>	<b>15,4</b>
2A	0,17	4,52	2,01	22,2	19,0
2B	0,17	3,97	1,78	20,8	17,6
<b>povprečje l. 2020</b>	<b>0,17</b>	<b>4,25</b>	<b>1,90</b>	<b>21,5</b>	<b>18,3</b>
3A	0,14	3,69	1,74	19,9	17,7
3B	0,16	3,70	1,74	21,9	20,1
<b>povprečje l. 2023</b>	<b>0,15</b>	<b>3,695</b>	<b>1,74</b>	<b>20,9</b>	<b>18,9</b>

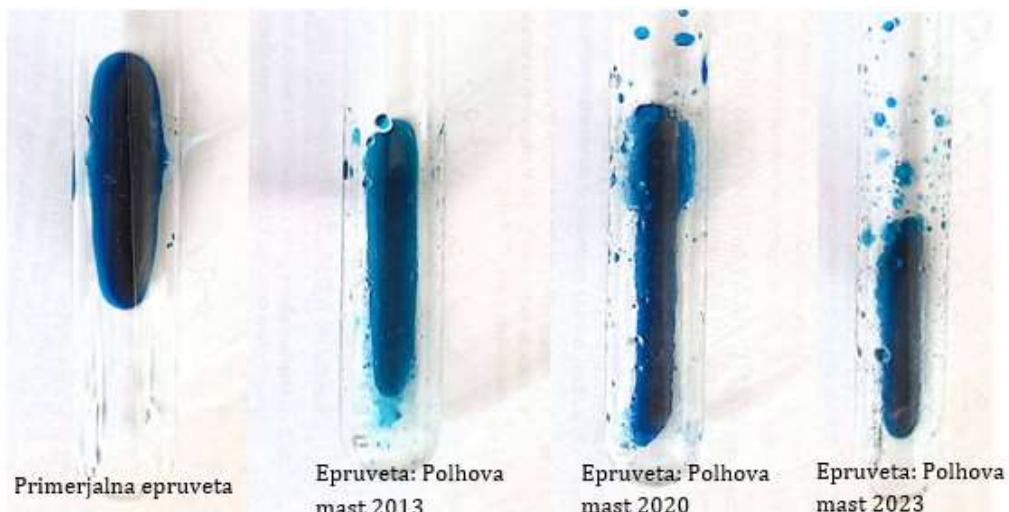
#### Komentar:

Rezultate smo izračunale s predpostavko, da je bila pri pripravi vzorcev esterifikacija maščobnih kislin in ekstrakcija v nepolarno topilo n-heptan popolna, saj je metoda priprave vzorcev optimizirana in preverjena. (Štos, 2019)

Z našimi rezultati lahko trdimo, da je v polhovi masti veliko večja vsebnost nenasičenih maščobnih kislin (cis-9-oleinske in linolejske maščobne kisline) kot nasičenih maščobnih kislin (miristinske, palmitinske in stearinske).

Tako velika količina nenasičenih maščobnih kislin pa je precej bolj značilna za rastlinske kot živalske maščobe.

## 5.7 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTOV



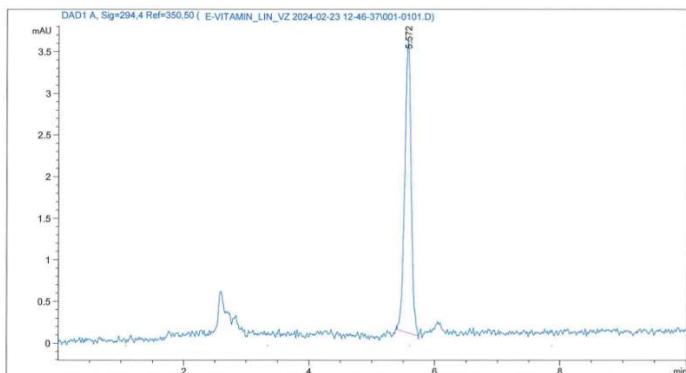
Slika 45: Primerjalna epruveta ter epruvete s polhovimi mastmi (2013, 2020, 2023)

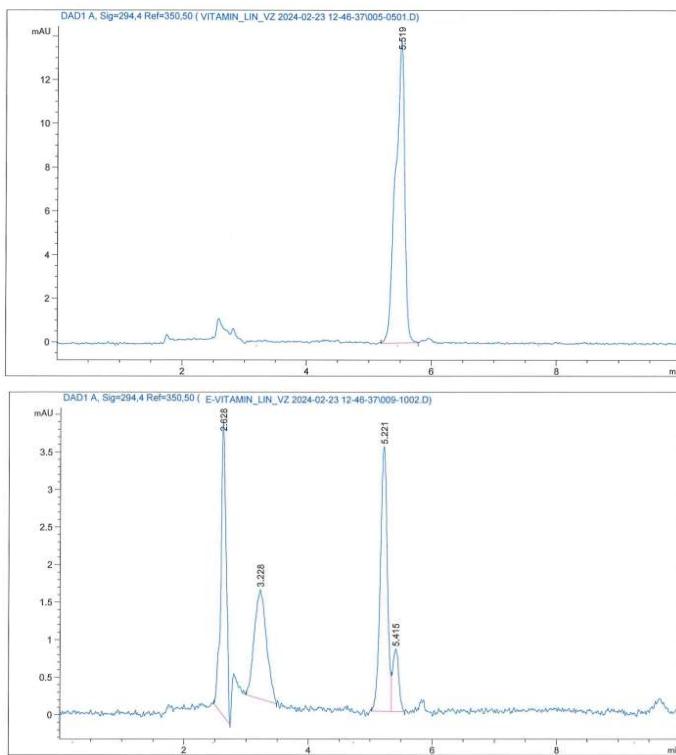
### Komentar:

Vsebine v vseh epruvetah s polhovo mastjo so se obarvale prusko modro, enako kakor vsebina primerjalne epruvete. To pomeni, da so v polhovi masti prisotni antioksidanti.

## 5.8 DOLOČANJE E-VITAMINA Z METODO HPLC

### 5.8.1 Kromatogrami





Slika 46: Kromatogram topila, standarda in vzorca

**Komentar:**

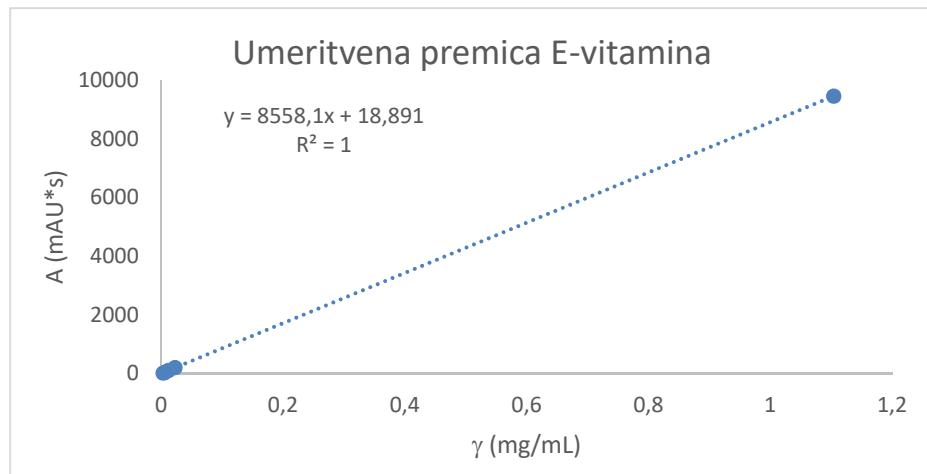
Na kromatogramu topila je zaznan vrh, ki se na kromatogramih standarda nižjih koncentracij ne loči od vrha standarda. Na kromatogramih vzorca je od vrha E-vitamina ( $\alpha$ -tokoferola) bolje ločen. Glede na to, da vrh, ki pripada topilu, in vrh E-vitamina na kromatogramih standardov nista povsem ločena, smo ploščino vrha topila odšteli od ploščine na kromatogramih standarda.

### 5.8.2 Umeritvena premica E-vitamina

Primerjali smo ploščine na kromatogramih redčenih raztopin standarda, od  $\gamma_4$  do  $\gamma_0$ , in koncentracije. Podatki so zbrani v tabeli 31. Iz podatkov smo v Excelu izrisale umeritveno premico (slika 48) in dobile enačbo premice za izračun koncentracij v vzorcih.

Tabela 31: Odvisnost ploščine vrha E-vitamina od koncentracije (podatki za umeritveno premico)

Raztopine standarda	$\gamma$ (E-vitamina) (mg/mL)	A (mAU*s)
$\gamma_0$	1,10	9464,759375
$\gamma_1$	0,0221	222,674625
$\gamma_2$	0,0110	115,88335
$\gamma_3$	0,00552	58,87664
$\gamma_4$	0,00276	32,621315



Slika 47: Umeritvena premica E-vitamina

**Komentar:**

Na kromatogramu raztopine  $\gamma_5$  standarda E-vitamina (masna koncentracija je 0,000552 mg/mL) ni zaznanega odziva za E-vitamin, zato umeritvena premica obsega koncentracije raztopin od  $\gamma_4$  do  $\gamma_0$ . Ploščine na kromatogramih redčenih raztopin standardov, od katerih smo odštele ploščino vrha na kromatogramu topila, so linearno odvisne od koncentracije E-vitamina ( $R^2 = 1$ ).

**5.8.3 Izračun E-vitamina v vzorcih**

Iz podatkov iz umeritvene premice, znane priprave raztopin (prostornina) in mase vzorcev smo izračunale količino E-vitamina v vzorcih polhovi masti.

Tabela 32: Izračun vsebnosti E-vitamina v vzorcih

Vzorec	A	m (E-vit.) (mg)	mvz (g)	W (E-vitamina) (%)	$\bar{W}$ (E-vitamina) (%)
2023, 1.p	26,14176	0,0863	3,249	0,266	
2023, 2.p	27,864735	0,1068	3,561	0,300	<b>0,283</b>
2020, 1.p	28,332355	0,1123	3,307	0,340	
2020, 2.p	28,080475	0,1093	3,298	0,332	<b>0,336</b>
2013, 1.p	25,77870	0,0820	3,445	0,238	
2013, 2.p	27,543785	0,1030	3,312	0,311	<b>0,274</b>

**Komentar:**

Rezultati vsebnosti E-vitamina so med leti sicer precej različni, a ne kažejo trenda upadanja s staranjem vzorca.

## 6 RAZPRAVA

Prisotnost kortikosteroidov v polhovi masti smo dokazovale z metodo HPLC, vzorce pa smo pripravile iz neumiljivega dela polhove masti, ki smo ga pridobile z reakcijo umiljenja. V želji, da bi metodo validirale, smo celoten postopek kljub dolžini postopka izvedle trikrat. Prvič smo pri pridobivanju neumiljivega dela kot topilo uporabile dietil eter. V tem vzorcu je bila vsebnost kortikosteroidov tudi najvišja (za hidrokortizon  $1,61 \cdot 10^{-5} \%$  (0,161 ppm), za kortikosteron  $2,34 \cdot 10^{-5} \%$  (0,234 ppm)). Sicer smo ugotovile prisotnost obeh kortikosteroidov, hidrokortizona in kortikosterona, a sta koncentraciji obeh pod mejo določljivosti (<LOQ), zato tudi za izračunano koncentracijo ne moremo trditi, da je točna. Pri pripravi drugega vzorca smo uporabile neumiljivi del, pri katerem smo za topilo namesto dietil etra uporabile heksan, saj je bila pri spiranju z dietil etrom meja med fazama pri ločevanju v liju ločniku zelo slabo vidna. Pri tem vzorcu smo ugotovile le prisotnost kortikosterona, a je odziv pod mejo določljivosti (< LOQ), odziva hidrokortizona na kromatogramu ni bilo opaziti. Ker je bila vsebnost kortikosteroidov v vzorcu z neumiljivim delom, pri katerem smo kot topilo uporabile heksan, nižja kot pri vzorcu, kjer smo za neumiljivi del uporabile topilo dietil eter, smo pri pripravi neumiljivega dela za tretji vzorec uporabile pri prvi ekstrakciji kombinacijo obeh topil, v nadaljevanju pa le heksan. V tem vzorcu odziva kortikosteroidov sploh ni bilo zaznati. Zaradi vsebnosti kortikosteroidov pod mejo določljivosti (LOQ) nismo mogle izvesti točnosti metode. Poskusile smo z dodajanjem standarda v vialo prvega vzorca, a tudi tu je tako malo kortikosteroidov, da točnosti ni mogoče izračunati. Metodo smo tako le delno preverile. Precej dobro smo preverile ustreznost metode HPLC, saj smo dokazale linearnost in selektivnost metode, določile mejo zaznavnosti (LOD) in mejo določljivosti (LOQ) ter stabilnost raztopin standardov. Nismo pa potrdile ponovljivosti metode, to je pripravo vzorcev oz. pripravo neumiljivega dela polhove masti, ki ga potrebujemo za pripravo vzorcev. Tako smo lahko le delno potrdile našo prvo hipotezo: ***V polhovi masti bomo dokazale vsebnost nekaterih kortikosteroidov in preverile ustreznost metode za njihovo določanje.***

Pri raziskavi smo določile precej visoko jodovo število polhove masti, to je 102, kar je neznačilno za živalske maščobe (slanina svinjine 60, maslo 33, goveja ali ovčja mast 45). Te so za razliko od polhove masti tudi v trdnem stanju. (Wikipedia The Free Encyclopedia, 2024) Tako smo potrdile našo drugo hipotezo: ***Jodovo število polhove masti bo zaradi vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin visoko.***

Jodovo število polhove masti (102) je primerljivo z mandljevim oljem (94) in oljem grozdnih pešk (127), medtem ko ima oljčno olje presenetljivo nižje jodovo število (80). Prav tako ima karitejevo maslo pričakovano nižjo vrednost (59), saj je pri sobni temperaturi v trdnem stanju. Našo tretjo hipotezo smo tako delno potrdile: ***Primerjava jodovega števila polhove masti z nekaj znanimi olji z visoko vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin bo pokazala primerljive vrednosti.***

Vzorca polhove masti iz leta 2013 in 2023 sta si bila po rezultatih določanja peroksidnega števila precej podobna, izstopalo pa je leto 2020, kar lahko pripisemo posebnostim maščobe tega leta, možne pa so tudi analitske napake.

Peroksidno število polhove masti se z leti ni bistveno spremajalo (za leto 2013 znaša 0,985, za leto 2020 je 1,265 in za leto 2023 je 0,980), kar smo tudi predvidevale v četrti hipotezi, ki jo lahko potrdimo: **Peroksidno število polhove masti bo nizko in se ne bo bistveno povečevalo s starostjo olja.**

Za ugotovitev vsebnosti holesterola smo uporabile metodo TLC. Na TLC ploščo smo nanesle raztopino vzorca polhove masti iz leta 2023 in različne koncentracije standarda ter primerjale dobljene lise. Iz lise vzorca in lis standarda smo ocenile približno količino holesterola v polhovi masti (2023), ki po naši oceni znaša 0,0013 %. Tako lahko potrdimo našo peto hipotezo: **Vsebnost holesterola bo nizka.**

Iz dobljenega peroksidnega števila je razvidna dobra obstojnost polhove masti. To ugotovitev smo že zelele še dodatno potrditi oz. ugotoviti, kakšne so spremembe v sestavi polhove masti z leti, zato smo preučile vsebnost maščobnih kislin v polhovi masti z metodo plinske kromatografije (GC). Ugotovile smo, da polhova mast vsebuje tako nasičene (miristinska, palmitinska, stearinska) kot tudi nenasičene (cis-9-oleinska, linolejska) maščobne kisline, vendar je vsebnost slednjih občutno večja. Vsebnost maščobnih kislin se z leti bistveno ne spreminja. Primerjava po starosti polhove masti pokaže še največje odstopanje najstarejšega letnika (2013) v vsebnosti trikrat nenasiciene linolenske maščobne kisline, kar ni presenetljivo, saj je ta zagotovo najbolj izpostavljena oksidativnim procesom. A tudi ta najstarejši vzorec še vedno vsebuje zelo velik delež te kisline, medtem ko je delež enkrat nenasiciene cis-9-oleinske kisline povsem nespremenjen. Poleg peroksidnega števila je to le še en dokaz dobre obstojnosti polhove masti. To dejstvo je zelo zanimivo, saj je običajno maščoba z več nenasičenimi maščobnimi kislinami manj obstojna. Z rezultati kvantitativne GC analize maščobnih kislin lahko tako potrdimo našo šesto hipotezo: **Polhova mast bo vsebovala velik delež enkrat in večkrat nenasičenih maščobnih kislin, sestava pa se s starostjo ne bo veliko spreminja.**

S poskusom dokazovanja antioksidantov smo v polhovi masti dokazale prisotnost antioksidantov in s tem potrdile našo sedmo hipotezo: **V polhovi masti bodo prisotni antioksidanti.**

Z uporabo metode HPLC smo potrdile prisotnost vitamina E v polhovi masti, ki je za vsako leto malo drugačna, a kljub temu lahko s tem potrdimo našo osmo hipotezo: **Polhova mast bo vsebovala določljive vrednosti vitamina E.**

## 7 ZAKLJUČEK

V sklopu te raziskovalne naloge smo preučevale značilnosti in uporabnost polhove masti na podlagi njene sestave. Naša analiza je pokazala, da polhova mast izkazuje velik potencial pri pospeševanju procesa celjenja ran, kar lahko potrdimo z vsebnostjo vitamina E, ki deluje kot antioksidant, prispeva k obstojnosti masti in ima koristi pri negi kože. Visoko jodovo število, ki je neznačilno za živalske maščobe, podpira trditev o visoki vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin v polhovi masti. Ugotovitev je pomembna, saj je visoka vsebnost nenasičenih maščobnih kislin povezana z izboljšano sposobnostjo celjenja in obnavljanja kože. Nizko peroksidno število pomeni majhen delež peroksidnih snovi v masti, kar kaže na dobro stabilnost in obstojnost polhove masti skozi leta. Polhova mast ponuja učinkovito alternativo sestavinam, ki jih najdemo v komercialnih kremah, saj je naravnega izvora in ne vsebuje potencialno škodljivih kemikalij.

Pri preverjanju metode za določanje kortikosteroidov smo dosegle nekaj uspeha, vendar smo prepoznale potrebo po nadaljnji optimizaciji. Zaradi številnih ekstrakcij in izpiranj menimo, da je sam izkoristek pri pripravi vzorcev majhen. Kolikšen je dejanski izkoristek priprave vzorcev, bi lahko preverile z dodajanjem standarda v sam vzorec pred ekstrahiranjem in izpiranjem. Z zmanjšanjem števila ekstrakcij in izpiranj bi lahko povečale izkoristek in skrajšale čas priprave vzorcev. Glede na rezultate, ki smo jih doobile, smo ugotovile, da je izkoristek metode priprave vzorcev večji, če za topilo uporabimo dietil eter namesto heksana. Vendar se pri ekstahiranju z dietil etrom faze slabše ločijo, zato je ekstahiranje s heksanom lažje in natančnejše. Zato menimo, da bi bilo ekstahiranje najoptimalnejše, če za topilo uporabimo mešanico heksana in dietil etra. Pomembno je nadaljevati z optimiziranjem metode ekstrakcije, da bi zagotovile zanesljivejše rezultate o vsebnosti kortikosteroidov v vzorcih. To bi omogočilo natančnejšo oceno terapevtskega potenciala polhove masti in boljšo primerjavo z drugimi formulacijami.

Opravljeno delo je bilo izjemno poučno in koristno. Pridobile smo dragocena znanja in izkušnje na področju analitskih metod. Prvič smo se srečale z metodami HPLC in GC ter zahtevnimi titracijami in ekstrakcijami. Naučile smo se tudi iznajdljivosti in prilagodljivosti, saj smo, razen metode GC, celotno raziskovalno nalogo izvedle v šolskem laboratoriju, kjer pogosto nismo imele na voljo vseh potrebnih pripomočkov. Prav tako je treba poudariti, da šolski laboratoriji ni analitski laboratorijski. Nadaljnje raziskovalno delo na tem področju bi lahko vključevalo razširitev raziskave na večjo vzorčno populacijo, dodatne analize in postopke predvsem na področju priprave neumiljivega dela ter morebitno vključitev kliničnih preskušanj za potrditev terapevtske učinkovitosti polhove masti.

Na podlagi vsega zapisanega smo prepričane, da je polhova mast obetaven naraven izdelek, ki lahko prinese številne koristi v kontekstu zdravljenja in negovanja kože. Nadaljnje raziskave na tem področju so ključne za boljše razumevanje njenega potenciala in širšo uporabo v medicini in kozmetiki.

## 8 VIRI

(brez datuma). *Navadni polh.* Pridobljeno iz <https://zelenilovec.com/prostozivec-zivali/sesalci/navadni-polh/>

(3. avgust 2021). *POLHOVA MAST / OLJE tradicionalno ljudsko zdravilo.* Pridobljeno 12. marec 2024 iz <https://e-trip.si/polhova-mast-olje-tradicionalno-ljudsko-zdravilo/>

Alldredge, B. K., Corelli, R. L., Ernst, M. E., Guolielmo, J. B., Jacobson, P. A., Kradjan, W. A., & Williams, B. R. (2012). *Koda-Kimble and Young's Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs, 10th, North America Edition.*

American Oil Chemists Society. (2003). *AOCS official method Cd 8b - 90 peroxide value acetic acid-isooctane method.* Champaign: AOCS Headquarters.

AOCS. (2021). *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 7th Edition.* Urbana: The American Oil Chemists' Society.

Arnes.si. (10. marec 2024). *Jodovo število.* Pridobljeno iz Arnes.si:  
<http://www2.arnes.si/~ssmbszs1s/srednja/projekti/karmen/jodovost.htm>

Arsovski, N. (1. 3 2024). *ABCzdravja.* Pridobljeno iz Maščobne kisline in vpliv na zdravje:  
<https://www.abczdravja.si/hrana/mascobne-kisline-in-vpliv-na-zdravje/>

Aryal, S. (6. 6 2023). *Microbe notes.* Pridobljeno iz HPLC: Principle, Parts, Types, Uses, Diagram: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>

Baniya, S. (30. 12 2023). *Microbe online.* Pridobljeno iz Thin Layer Chromatography (TLC): Principle, Procedure, and Applications: <https://microbeonline.com/thin-layer-chromatography/>

Boris Kryštufek, B. F. (2007). *Polh in človek.* Ljubljana: Ekološki forum LDS v sodelovanju z Liberalno akademijo.

Boris Pihlar, H. P. (2019). *Osnove analizne kemije.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije.* Ljubljana: Študentska založba.

Charles R Yates, C. C. (10. marec 2024). Structural determinants of P-glycoprotein-mediated transport of glucocorticoids. *Pharm Res.* Pridobljeno iz <https://go.drugbank.com/drugs/DB00443>

Dolenc, D. (2008). *Vaje iz organske analize.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

- Dolenc, D. (2021). *Praktikum iz organske kemije*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- Dolenjski list. (17. Maj 2015). *Lokalno-aktualno.si*. Pridobljeno iz Polhovo olje - Pozabljeno ljudsko zdravilo z novo veljavo:  
[https://lokalno.svet24.si/2015/05/17/134549/aktualno/DL\\_Polhovo\\_olje\\_\\_Pozabljeno\\_ljudsko\\_zdravilo\\_z\\_novo\\_veljavo/?cookie=ok](https://lokalno.svet24.si/2015/05/17/134549/aktualno/DL_Polhovo_olje__Pozabljeno_ljudsko_zdravilo_z_novo_veljavo/?cookie=ok)
- Dr. Frank Antwerp, P.-D. D. (30. maj 2013). *DocCheck Flexikon*. Pridobljeno iz Fluocinonid: <https://flexikon.doccheck.com/de/Fluocinonid>
- drug.com. (23. avgust 2023). Pridobljeno iz Betamethasone Topical :  
<https://www.drugs.com/betamethasone-topical.html>
- Društvo za osvoboditev živali. (10. marec 2024). *Pobuda za prepoved lova na polhe ter kakršnegakoli ubijanja polhov*. Pridobljeno iz Društvo za osvoboditev živali:  
<https://www.osvoboditevzivali.si/aktivnosti-varuha-pravic-zivali/lov-2/pobuda-za-prepoved-lova-na-polhe-ter-kakrsnegakoli-ubijanja-polhov/>
- European Pharmacopoeia 7nd Edition, 7.0 Volume 1. (2020). *Iodine number*. Strasbourg Cedex France: Council of Europe.
- Fornstedt, T. F. (2015). Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. *Analytical Separation Science*, 1-24.
- GBIF - Global Biodiversity Information Facility. (15. Marec 2024). *Glis glis (Linnaeus, 1766)*. Pridobljeno iz Classification : Animalia Chordata Mammalia Rodentia Gliridae Glis: <https://www.gbif.org/species/5706486>
- Gojkovič, T. (2014). *Načrtovanje sestave in preučevanje stabilnosti krem s polhovim oljem*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo.
- Gojkovič, T. (10. Julij 2015). *Repository of the University of Ljubljana*. Pridobljeno iz Načrtovanje sestave in preučevanje stabilnosti krem s polhovim oljem : magistrski študijski program industrijska farmacija: [https://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2014/Gojkovic\\_Tadeja\\_mag\\_nal\\_2014.pdf](https://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2014/Gojkovic_Tadeja_mag_nal_2014.pdf)
- Goldson-Barnaby, C. B.-F. (2024). *Fats*. West Indies: The University of the West Indies, Kingston, Jamaica.
- H. Wagner, D. N. (1991). Steroid profiles of brown adipose tissue. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 39, No. 3, pp 405-407.
- Harris, D. C. (2009). *Exploring chemical analysis. Fourth Edition*. New York: W. H. Freeman and Company.

Helena Prosen, I. K. (2014). *Praktikum iz analizne kemije*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Helena Prosen, I. K. (2018). *Praktikum iz analizne kemije*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Hironori Ando, K. U. (2021). *Handbook of Hormones, Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*. Elsevier.

HMDB. (4. November 2023). Pridobljeno iz Showing metabocard for Palmitic acid : <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000220>

HMDB. (2. 1 2024). Pridobljeno iz Stearic acid: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000827>

HMDB. (2. 1 2024). Pridobljeno iz Oleic acid: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000207>

ICH harmonization for better health. (27. Oktober 1994). *Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Pridobljeno iz ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

Iodine value. (4. januar 2024). Pridobljeno 20. januar 2024 iz Wikipedia: [https://en.wikipedia.org/wiki/Iodine\\_value](https://en.wikipedia.org/wiki/Iodine_value)

J A Miller, D. D. (1980). Topical corticosteroids: clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, Feb;19(2):119-34. Pridobljeno iz <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7363838/>

Janežič, N. (1990). *Fizikalno kemijska analiza maščobe navadnega polha (Glis Glis L.) diplomsko delo*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za naroslovje in tehnologijo, VTOZD Farmacija.

JAZMP. (11. september 2018). Centralna baza zdravil. *POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA*. Pridobljeno iz POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA: [http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/5414FD0D56FEFCFBC12579EC001FF3DE/\\$File/s-020792.pdf](http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/5414FD0D56FEFCFBC12579EC001FF3DE/$File/s-020792.pdf)

JAZMP. (15. Marec 2024). *Hidrokortizon*. Pridobljeno iz Centralna baza zdravil: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView)

kislina, L. (2. 1 2024). HMDB. Pridobljeno iz Linoleic acid: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000673>

kislina, e. (2. 1 2024). HMDB. Pridobljeno iz 11Z-Eicosenoic acid: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0002231>

kislina, L. (2. 1 2024). *HMDB*. Pridobljeno iz alpha-Linolenic acid:

<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001388>

Kolar, M. (december 2008). *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*. Pridobljeno iz Osnove kvantitativne analizne kemije I: Prenovljena elektronska izdaja navodil za vaje / Mitja Kolar. - Maribor:

<https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/mitjakolarvajeakiskripta.pdf>

Koradin Veronika, Č. K. (12. December 2022). *Preučevanje oljčnih olj Slovenskega primorja z metodami termične analize in uporaba olj v šolskih kemijskih poskusih*. Pridobljeno iz Repozitorij Univerze v Ljubljani: <https://repositorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=143279>

Korošec, Ž. (2. 3 2023). *Zdrava prehrana*. Pridobljeno iz Vitamin E:

<https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/vitamini/191-vitamin-e.html>

Lana Pađen, S. P. (1. 3 2024). *National Library of Medicine*. Pridobljeno iz Fatty Acid Composition of M. Biceps Femoris of Edible Dormouse (*Glis glis* L.): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9735602/>

Lovska zveza Slovenije. (10. marec 2024). *Lovne dobe*. Pridobljeno iz Lovska zveza Slovenije: <https://www.lovska-zveza.si/prostozivece-zivali/lovne-dobe/>

Luís Uva, D. M. (2012). Mechanisms of Action of Topical Corticosteroids in Psoriasis. *International Journal of Endocrinology*.

Marič, K. (brez datuma). *Zimsko spanje ali hibernacija*. Pridobljeno 15. marec 2024 iz <https://www.dpaе.si/wp-content/uploads/2015/05/Aktualni-list-DPAE-december-2018-pdf-oblika.pdf>

Mateja Lisjak, d. m.-v. (15. Marec 2024). *Zdravje Plus*. Pridobljeno iz Kortikosteroidi: so takšna zdravila res bavbav?: <https://www.zdravje.si/kortikosteroidi>

*Mediately*. (brez datuma). Pridobljeno iz ACT klasifikacija:

<https://mediately.co/si/atcs/D07AA/kortikosteroidi-z-blagim-ucinkom-skupina-i>

*Medlineplus*. (2018. februar 2018). Pridobljeno iz Fluocinonide Topical:

<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a601054.html>

Merck. (28. Februar 2024). *Sigma Aldrich*. Pridobljeno iz miristic acid:

<https://www.sigmaaldrich.com/SI/en/search/miristic-acid?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=MIRISTIC%20acid&type=product>

Merck. (28. Februar 2024). *Sigma Aldrich*. Pridobljeno iz Oleic acid:

<https://www.sigmaaldrich.com/SI/en/search/oleic>

acid?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=Oleic%20acid&type=product

Merck. (28. Februar 2024). *Sigma Aldrich*. Pridobljeno iz hydrocortisone:  
<https://www.sigmaaldrich.com/SI/en/search/hydrocortisone?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=Hydrocortisone&type=product>

Merck. (28. Februar 2024). *Sigma Aldrich*. Pridobljeno iz Linolenic acid:  
<https://www.sigmaaldrich.com/SI/en/search/linolenic-acid?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=Linolenic%20acid&type=product>

Merck. (4. Marec 2024). *Sigma Aldrich*. Pridobljeno iz Cholesterol:  
<https://www.sigmaaldrich.com/SI/en/product/sigma/c3045>

Merck. (15. marec 2024). *Sigma Aldrich*. Pridobljeno iz Vitamin E:  
<https://www.sigmaaldrich.com/SI/en/product/cerillian/v020>

Moura Fe, J. A. (1975). Unsaponifiable matter of crude and processed coconut oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(4), 523 - 531. Pridobljeno iz  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740260417>

Ogorelec, D. Ž. (21. november 2022). Dormouse trapping in southern Slovenia. Slovenija. Pridobljeno 12. marec 2024 iz <https://bushguide101.com/dormouse-trapping-in-southern-slovenia/>

Ogorelec, D. Ž. (29. marec 2023). *Skinning and processing of dormice in Slovenia*. Slovenija. Pridobljeno 11. marec 2024 iz <https://bushguide101.com/skinning-and-processing-of-dormice-in-slovenia/>

Pizarro, C. E.-D.-T.-S. (2013). Food Control. *Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra*, str. 34(1), 158–167.

*Prehrana.si*. (25. 1 2024). Pridobljeno iz Antioksidanti:  
<https://www.prehrana.si/clanek/181-antioksidanti>

*PubChem*. (brez datuma). Pridobljeno iz Triamcinolone:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triamcinolone#section=KEGG-ATC>

Služba Vlade RS za zakonodajo. (10. marec 2024). *PIS - Pravno informacijski sistem*. Pridobljeno iz Zakon o divjadi in lovstvu (ZDLov-1) :  
<http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAK03780#>

Štos, J. (Februar 2019). Razvoj in validacija GC-FID/MS analiznega postopka za določitev maščobnih kislin v žiru in polhovi masti. Maribor.

Štrancar, A. (1998). *Skripta Tečaj osnove HPLC tehnik, Zbornik predavanj*. Ljubljana: BIA Separations d.o.o.

The Arena Group Holdings. (22. December 2023). *Owlcation*. Pridobljeno iz Thin Layer Chromatography (TLC): Principle and Procedure:  
<https://owlcation.com/stem/tlc-thin-layer-chromatography-Principle-Procedure>

The Free Encyclopedia. (4. Marec 2024). *Wikipedia*. Pridobljeno iz Steroid:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Steroid>

The international fragrance association. (17. oktober 2011). *Determination of the peroxide value*. Pridobljeno iz Infra analytical method:  
[https://ifrafragrance.org/docs/default-source/guidelines/20190910-revised-ifra-analytical-method-on-peroxide-value.pdf?sfvrsn=c4a931e2\\_0](https://ifrafragrance.org/docs/default-source/guidelines/20190910-revised-ifra-analytical-method-on-peroxide-value.pdf?sfvrsn=c4a931e2_0)

Thomas L. Lemke, D. A. (2012). Foye's Principles of Medicinal Chemistry, SEVENTH EDITION.

Vončina, D. B. (maj 2006). *Analizna kemija II*. Pridobljeno 25. februar 2024 iz  
[https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/analizna2\\_gradivo.pdf](https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/analizna2_gradivo.pdf)

Wikipedia The Free Encyclopedia. (18. Marec 2024). *Iodine value*. Pridobljeno iz Wikipedia:  
<https://www2.arnes.si/~ssmbszs1s/srednja/projekti/karmen/jodovost.htm>

Yandie Yang, Q. L. (2014). Food Control. *A novel method for determining peroxide value of edible oils using electrical conductivity*, str. 39, 198–203.

ZZS. (30. april 2021). *Centralna baza zdravil*. Pridobljeno iz POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA BELODERM:  
[http://www.cbz.si/zzs/pao/bazazdr2.nsf/o/2917B2FB0880A90AC12579C2003F4DFD/\\$File/s-025356.pdf](http://www.cbz.si/zzs/pao/bazazdr2.nsf/o/2917B2FB0880A90AC12579C2003F4DFD/$File/s-025356.pdf)

## 9 VIRI SLIK

Vse slike, ki nimajo dodanih virov, so avtorske fotografije.

## 10 PRILOGE

### 10.1 SPECIFIKACIJE STANDARDOV

#### 10.1.1 STANDARD MEŠANICE ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN FAME MIX

**Supelco** [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

**Certificate of Analysis - Certified Reference Material**

**Supelco 37 Component FAME Mix**

**Product no.:** CRM47885  
**Lot no.:** LRAC3241  
**Expiry Date:** April 2022  
**Manufacturing Date:** April 2019  
**Storage:** Freeze  
**Solvent/Matrix:** METHYLENE CHLORIDE  
**Certificate version:** LRAC3241.02 (Note: Certificates may be updated due to the availability of new data. Check our website at: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) for the most current version.)

**Certified Values:**

Analyte	Units	Certified Value	Raw Material Purity, %	Raw Material Lot
METHYL BUTYRATE (C4:0)	µg/ml	401 ± 31	99.9	MKCF9233
METHYL HEXANOATE (C6:0)	µg/ml	401 ± 27	99.9	MKBZ3038V
METHYL OCTANOATE (C8:0)	µg/ml	401 ± 25	99.9	MKBZ3038V
METHYL DECANOATE (CAPRATE) (C10:0)	µg/ml	401 ± 23	99.9	LC04160
METHYL UNDECANOATE (C11:0)	µg/ml	200 ± 15	99.0	BCBN7141V
METHYL LAURATE (C12:0)	µg/ml	401 ± 22	99.5	LB97859
METHYL TRIDEcanoate (C13:0)	µg/ml	200 ± 15	99.5	BCBV4347
METHYL MYRISTATE (C14:0)	µg/ml	401 ± 23	100.0	LC17239
MYRISTOLEIC ACID METHYL ESTER (Methyl myristoleate) (C14:1)	µg/ml	200 ± 15	99.0	U-36M-F28-C
METHYL PENTADECANOATE (C15:0)	µg/ml	200 ± 15	99.7	BCBR2231V
CIS-10-PENTADECENOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-10 pentadecenoate) (C15:1)	µg/ml	200 ± 15	99.0	U-38M-M15-C
METHYL PALMITATE (C16:0)	µg/ml	615 ± 39	99.0	LC17089
METHYL PALMITOLEATE (METHYL CIS 9-HEXADECENOATE) (C16:1)	µg/ml	201 ± 16	100.0	SLBX9802
METHYL HEPTADECANOATE (C17:0)	µg/ml	200 ± 16	96.4	BCBR1790V

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;  
Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 855-831-9211; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).  
Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 6      Certificate version 02



CIS-10-HEPTADECENOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-10-heptadecenoate) (C17:1)	µg/ml	200 ± 15	100.0	SLBX7914
METHYL STEARATE (C18:0)	µg/ml	401 ± 27	99.1	LC13654
TRANS-9-ELAIDIC ACID METHYL ESTER (Methyl trans-9 elaidate) (C18:1)	µg/ml	201 ± 15	99.0	U-47M-M31-C
CIS-9-OLEIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-9 oleate) (C18:1)	µg/ml	401 ± 29	99.6	MKcj0804
LINOLELAIDIC ACID METHYL ESTER (Methyl linolelaidate) (C18:2)	µg/ml	200 ± 15	100.0	SLBZ6933
METHYL LINOLEATE (C18:2)	µg/ml	200 ± 15	99.0	BCBT9852
METHYL ARACHIDATE (C20:0)	µg/ml	401 ± 30	99.0	0000007888
GAMMA-LINOLENIC ACID METHYL ESTER (Methyl γ-linolenate) (C18:3)	µg/ml	200 ± 16	99.6	MKCD9174
METHYL CIS-11 EICOSENOATE (C20:1)	µg/ml	200 ± 15	99.0	MKcj2391
METHYL LINOLENATE (C18:3)	µg/ml	200 ± 14	99.0	SLBX5834
METHYL HENEICOSANOATE (C21:0)	µg/ml	201 ± 14	99.6	LC08970
CIS-11,14-EICOSADIENOI C ACID METHYL ESTER (Methyl cis-11,14-eicosadienoate) (C20:2)	µg/ml	201 ± 16	99.0	U-68M-A4-D
METHYL BEHENATE (C22:0)	µg/ml	401 ± 29	99.6	SLBW0605
CIS-8,11,14-EICOSATRIEN OIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-8, 11, 14-eicosatrienoate) (C20:3)	µg/ml	199 ± 15	99.0	U-69M-N30-C
METHYL ERUCATE (CIS-13-DOCOSENOATE) (Methyl cis-13-docosenoate) (C22:1)	µg/ml	200 ± 16	99.4	BCBX7574
CIS-11,14,17-EICOSATRIE NOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-11, 14, 17- eicosatrienoate) (C20:3)	µg/ml	201 ± 15	99.0	U-70M-S20-C
METHYL TRICOSANOATE (C23:0)	µg/ml	200 ± 15	99.6	SLBZ1076

METHYL CIS-5,8,11,14-EICOSATE	µg/ml	200 ± 14	100.0	LC15184
TRAENOATE (Methyl arachidonate) (C20:4)				
CIS-13,16-DOCOSADIENOI C ACID METHYL ESTER (Methyl cis-13, 16- docosadienoate) (C22:2)	µg/ml	201 ± 15	99.0	U-81M-M22-C
METHYL LIGNOCERATE (Methyl tetracosanoate) (C24:0)	µg/ml	401 ± 30	100.0	SLBZ6342
METHYL CIS-5,8,11,14,17-EICOS APENTAENOATE (C20:5)	µg/ml	200 ± 16	99.0	U-99M-JY30-C
METHYL NERVONATE (Methyl cis-15-tetracosenoate) (C24:1)	µg/ml	200 ± 14	99.8	BCBX0854
METHYL CIS-4,7,10,13,16,19-DO COSAHEXAENOATE (C22:6)	µg/ml	200 ± 15	100.0	SLBZ9656

**Elution details:**

<u>EO</u>	<u>RT(MIN)</u>	<u>ANALYTE</u>
1	7.33	Methyl butyrate (C4:0)
2	8.37	Methyl hexanoate (C6:0)
3	9.79	Methyl octanoate (C8:0)
4	11.26	Methyl decanoate (C10:0)
5	11.94	Methyl undecanoate (C11:0)
6	12.58	Methyl laurate (C12:0)
7	13.21	Methyl tridecanoate (C13:0)
8	13.86	Methyl myristate (C14:0)
9	14.51	Methyl myristoleate (C14:1)
10	14.56	Methyl pentadecanoate (C15:0)
11	15.31	Methyl cis-10 pentadecenoate (C15:1)
12	15.36	Methyl palmitate (C16:0)
13	16.1	Methyl palmitoleate (C16:1)
14	16.27	Methyl heptadecanoate (C17:0)
15	17.12	Methyl cis-10 heptadecenoate (C17:1)
16	17.33	Methyl stearate (C18:0)
17	17.89	Methyl trans-9 eladiate (C18:1)
18	18.16	Methyl cis-9 oleate (C18:1)
19	18.78	Methyl linolelaidate (C18:2)
20	19.4	Methyl linoleate (C18:2)
21	19.72	Methyl arachidate (C20:0)
22	20.37	Methyl-gamma-linolenate (C18:3)
23	20.6	Methyl cis-11-eicosanoate (C20:1)
24	20.89	Methyl linolenate (C18:3)
25	21	Methyl heneicosanoate (C21:0)
26	21.96	Methyl cis-11,14-eicosadienoate (C20:2)
27	22.33	Methyl behenate (C22:0)
28	22.96	Methyl cis-8, 11, 14-eicosatrienoate (C20:3)
29	23.24	Methyl erucate (C22:1)
30	23.48	Methyl cis-11, 14, 17- eicosatrienoate (C20:3)
31	23.63	Methyl tricosanoate (C23:0)
32	23.72	Methyl cis-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoate (C20:4)
33	24.54	Methyl cis-13, 16- docosadienoate (C22:2)
34	24.93	Methyl lignocerate (C24:0)
35	25.27	Methyl cis-5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoate (C20:5)
36	25.76	Methyl nervonate (C24:1)
37	28.6	Methyl cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoate (C22:6)

**Additional Information:**

## Method Parameters:

Column: SP 2560, 100 m, 0.25 mm, 0.20 µm (Column #218)

Inlet Temp: 220 °C, Split mode with 35:1 split ratio

Oven Temp Program: 100 °C (4 min) @ 25 °C/ min to 200 °C (8 min) and @ 5 °C/ min to 250 °C (6 min)

Injection volume: 1 µL

Column Flow: 2.4 mL/min

Detector: MSD in FS mode (m/z 40-400), Scan rate: 4 Hz. Solvent delay: 7.20 min, Transfer line: 250 °C

**Metrological traceability:**

Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/-0.0001 g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

**Measurement method:**

Where applicable, the assigned value is based on a purity determination by mass balance and gravimetrically prepared value.

**Intended use:**

Intended for R&amp;D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.

**Packaging:**

1 ML IN AMBER AMPULE

### 10.1.2 HOLESTEROL

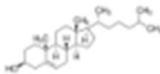
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)Email USA: [techserv@slal.com](mailto:techserv@slal.com)Outside USA: [eurtchserv@slal.com](mailto:eurtchserv@slal.com)

### Certificate of Analysis

Product Name:  
Cholesterol - Sigma Grade, ≥99%

Product Number: C8667  
 Batch Number: SLCP9543  
 Brand: SIGMA  
 CAS Number: 57-88-5  
 MDL Number: MFCD00003646  
 Formula: C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O  
 Formula Weight: 386.65 g/mol  
 Storage Temperature: Store at -20 °C  
 Quality Release Date: 15 FEB 2023  
 Recommended Retest Date: FEB 2029



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Very Faint Yellow	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
100 mg/mL, CHCl <sub>3</sub> (APHA NMT 20)		
Proton NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Water (by Karl Fischer)	≤ 1.0 %	0.0 %
Purity (GC)	> 99 %	99 %
Carbon	83.0 - 84.7 %	83.0 %

Brian Dulle, Supervisor  
 Quality Assurance  
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of Invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



10.1.3 E-VITAMIN ( $\alpha$ -TOKOFEROL)

Sigma-Aldrich®

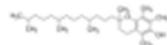
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)Email USA: [techserv@stal.com](mailto:techserv@stal.com)Outside USA: [eurtechserv@stal.com](mailto:eurtechserv@stal.com)

## Certificate of Analysis

Product Name:  
 $\alpha$ -Tocopherol -  $\geq 95.5\%$

Product Number: 258024  
 Batch Number: MKCT0474  
 Brand: SIGMA  
 CAS Number: 10191-41-0  
 MDL Number: MFCD00006848  
 Formula: C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>  
 Formula Weight: 430.71 g/mol  
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C  
 Quality Release Date: 13 FEB 2023



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Yellow to Very Dark Yellow and Faint Brown to Brown	Brown
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (HPLC)	$\geq 95.5\%$	98.2 %

Larry Coers, Director  
 Quality Control  
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



## 10.1.4 HIDROKORTIZON

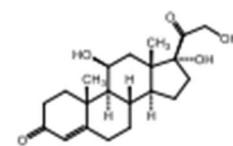
Supelco

www.sigmaaldrich.com

## Certificate of Analysis – Certified Reference Material

### HYDROCORTISONE

<b>Product no.:</b>	PHR1014-500MG
<b>Lot no.:</b>	LRAD1246
<b>Description of CRM:</b>	White powder
<b>Expiry date:</b>	31 March 2026
<b>Storage:</b>	2°C - 30°C
<b>Certificate version:</b>	LRAD1246.2 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: <a href="http://www.sigma-aldrich.com">www.sigma-aldrich.com</a> for the most current version.)
<b>Chemical formula:</b>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molecular mass:</b>	362.46
<b>CAS No.:</b>	50-23-7



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty U, U=k·u (k=) (Mass Balance/basis)
Hydrocortisone	99.7 % U <sub>CRM</sub> = ± 0.2 %, k = 2.0 (as is basis)

<b>Metrological traceability:</b>	Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.
<b>Measurement method:</b>	Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.
<b>Intended use:</b>	Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.
<b>Minimum sample size:</b>	5 MG
<b>Instructions for handling and correct use:</b>	Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.
<b>Health and safety information:</b>	All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
<b>Accreditation:</b>	Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.
<b>Certificate issue date:</b>	23 August 2023



(Andy Ommen; Quality Control)

(Shawn Stetler; Quality Assurance)

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;  
Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)  
Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



## 10.1.5 KORTIKOSTERON

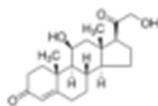
**Sigma-Aldrich.**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)Email USA: [techserv@slal.com](mailto:techserv@slal.com)Outside USA: [eurtechserv@slal.com](mailto:eurtechserv@slal.com)**Certificate of Analysis**

Product Name:  
Corticosterone - ≥98.5% (HPLC)

Product Number: 27840  
 Batch Number: BCCJ6406  
 Brand: SIGMA  
 CAS Number: 50-22-6  
 Formula: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>  
 Formula Weight: 346.46 g/mol  
 Quality Release Date: 18 NOV 2022



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off White	Off White
Appearance (Form)	Powder or Crystals	Crystals
Purity (HPLC)	≥ 98.5 %	99.2 %
Specific Rotation (20/D) c = 1 In Ethanol	220.0 - 226.0 deg	221.6 deg
Melting Point	179 - 183 °C	183 °C
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms

Dr. Reinhold Schwenninger  
 Quality Assurance  
 Buchs, Switzerland CH

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of Invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

