

Amanda Karine Sivertsen  
Anders Næss Tollefsen

# Sammenligning av ekstraksjonsmetoder for vitamin A og vitamin E i grønnkål og crispisalat

Bacheloroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft  
Veileder: David Weissbrodt  
Medveileder: Gunn Merethe Bjørge Thomassen  
Mai 2024



Amanda Karine Sivertsen  
Anders Næss Tollefsen

# **Sammenligning av ekstraksjonsmetoder for vitamin A og vitamin E i grønnkål og crispisalat**

Bacheloroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft  
Veileder: David Weissbrodt  
Medveileder: Gunn Merethe Bjørge Thomassen  
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden



# Forord

Denne bacheloroppgaven ble utført som en del av det avsluttende arbeidet på studieprogrammet Matvitenskap, teknologi og bærekraft ved Institutt for Bioteknologi og Matvitenskap på NTNU i Trondheim. Oppgaven ble utført våren 2024 og teller 15 studiepoeng. Alt det praktiske arbeidet ble utført på prosess- og analytisk laboratorium ved Akrinn, Kalvskinnet. Oppgaven er finansiert av NTNU og er et samarbeid med prosjektet LunarPlant.

I forbindelse med veiledningen rundt det teoretiske arbeidet rettes det en takk til hovedveileder David Weissbrodt. Det rettes også en stor takk til medveileder Gunn Merethe Bjørge Thomassen for god veiledning rundt det praktiske og teoretiske arbeidet, samt en takk til John-Kristian Jameson for god støtte og veiledning på analytisk laboratorium.

Trondheim 21. mai 2024

*Amanda Sivertsen*

---

Amanda Karine Sivertsen

*Anders Næss Tollefsen*

---

Anders Næss Tollefsen

# Sammendrag

Oppgavens hovedmål var å etablere en god “in-house” metode for ekstraksjon av vitamin A (i form av  $\beta$ -karoten) og vitamin E (i form av  $\alpha$ -tokoferol) i plantemateriale som grønnkål og crispisalat. Hensikten var at metoden skulle brukes i fremtidige analyser på planter dyrket ved hydroponikk fra kildeseparerte urinnæringsstoffer i forbindelse med prosjektet LunarPlant.

Det ble testet ut to metoder for ekstraksjon av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol fra grønnkål og crispisalat. I metode 1 ble 0,150 g frysetørket grønnkål og crispisalat løst i kloroform:diklormetan (2:1). Videre ble prøvene thermomixet før de ble tilsatt natriumkloridløsning og sentrifugert i to omganger. Deretter ble supernatanten inndampet ved 60°C, løst i metanol:MTBE:vann (81:15:4), og til slutt analysert med høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC). I metode 2 ble 0,25 g, 0,50 g og 0,75 g frysetørket grønnkål og 0,1250 g, 0,1875 g og 0,2500 g frysetørket crispisalat løst i aceton:diklormetan (30:70). Videre ble prøvene dekket med nitrogen gass før de ble vortexmixet og sentrifugert. Deretter ble supernatanten inndampet ved 50°C eller 60°C, løst i metanol:MTBE:vann, og til slutt analysert med HPLC. For detektering og kvantifisering ble alle ekstraktene fra hver metode analysert med HPLC under de samme betingelsene. For ekstraksjon med grønnkål ga metode 1 høyest utbytte av  $\alpha$ -tokoferol og  $\beta$ -karoten med henholdsvis 0,667 mg og 5,271 mg per 100 g ferskt materiale. For ekstraksjon med crispisalat ga metode 2, med 0,1250 g prøvemateriale, høyest utbyttet av  $\alpha$ -tokoferol med 0,202 mg per 100 g ferskt materiale, mens metode 1 ga høyest utbytte av  $\beta$ -karoten med 3,631 mg per 100 g ferskt materiale. Det ble detektert mindre  $\alpha$ -tokoferol og mer  $\beta$ -karoten i begge plantene sammenlignet med verdier fra Matvaretabellen. Den lave mengden  $\alpha$ -tokoferol kan i hovedsak skyldes dekomponering, mens den høye mengden  $\beta$ -karoten i hovedsak kan skyldes variasjoner i prøvematerialet eller feil i standardkurvene.

Etter kvantifisering av vitamininnholdet ble metodene sammenlignet med hensyn på utbytte, utstyr, antall steg i utførelsen og kjemikalier. Basert på evalueringskriteriene ble metode 2 ansett som bedre enn metode 1. Metode 2 ble dermed gjennomført på nytt for å ha flere resultater å basere konklusjonen på. Grunnet utfordringer med  $\beta$ -karoten-standarden og teknisk feil på HPLC-instrumentet, ble de nye ekstraktene ikke analysert. Det var derfor vanskelig å fastslå hvorvidt metode 2 var en god metode for ekstraksjon av  $\alpha$ -tokoferol og  $\beta$ -karoten i grønnkål og crispisalat. For et bedre vurderingsgrunnlag er det nødvendig med videre utprøving og testing av metodene.

# Abstract

The main goal of this project was to establish a good in-house method for extracting vitamin A (in the form of  $\beta$ -carotene) and vitamin E (in the form of  $\alpha$ -tocopherol) from plant materials such as kale and crisp lettuce. The purpose was for the method to be used in future analyses of plants grown hydroponically using source-separated urine nutrients as part of the LunarPlant project.

Two methods were tested for the extraction of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol from kale and crisp lettuce. In method 1, 0,150 g of freeze-dried kale and crisp lettuce were dissolved in chloroform:dichloromethane (2:1). The samples were thermomixed before adding a sodium chloride solution and centrifuged twice. The supernatant was then evaporated at 60°C, dissolved in methanol:MTBE:water (81:15:4), the mobile phase, and finally analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The supernatant was then evaporated at 60°C, dissolved in methanol:MTBE:water (81:15:4), and finally analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). In method 2, 0,25 g, 0,50 g, and 0,75 g of freeze-dried kale and 0,1250 g, 0,1875 g, and 0,2500 g of freeze-dried crisp lettuce were dissolved in acetone:dichloromethane (30:70). The samples were then covered with nitrogen gas before being vortex-mixed and centrifuged. The supernatant was evaporated at 50°C or 60°C, dissolved in methanol:MTBE:water, and finally analyzed by HPLC. For detection and quantification, all extracts from each method were analyzed by HPLC under the same conditions. For extraction from kale, method 1 yielded the highest amount of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene, with 0,667 mg and 5,271 mg per 100 g of fresh material, respectively. For extraction from crisp lettuce, method 2, using 0,1250 g of sample material, yielded the highest amount of  $\alpha$ -tocopherol with 0,202 mg per 100 g of fresh material, while method 1 yielded the highest amount of  $\beta$ -carotene with 3,631 mg per 100 g of fresh material. Both plants showed lower levels of  $\alpha$ -tocopherol and higher levels of  $\beta$ -carotene compared to values from Matvaretabellen. The low amount of  $\alpha$ -tocopherol could mainly be due to decomposition, while the high amount of  $\beta$ -carotene could primarily be due to variations in the sample material or errors in the standard curves.

After quantifying the vitamin content, the methods were compared in terms of yield, equipment, number of steps involved, and chemicals used. Based on the evaluation criteria, method 2 was considered better than method 1. Method 2 was thus repeated to obtain more

results for a well-founded conclusion. Due to challenges related to the  $\beta$ -carotene standard and technical failure on the HPLC-instrument, the new extracts were not analyzed. Therefore, it was difficult to determine whether method 2 was a good method for extracting  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in kale and crisp lettuce. For a better assessment, further trials and testing of the methods are necessary.



# Innhold

1. Innledning .....	1
2. Teoretisk bakgrunn .....	2
2.1 Hydroponikk .....	2
2.2 Grønncål ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Sabellica</i> ).....	2
2.3 Crispisalat ( <i>Lactuca sativa</i> var. <i>Danstar</i> ).....	3
2.4 Vitaminer .....	3
2.5 Vitamin A.....	3
2.5.1 Kjemisk struktur.....	3
2.5.2 Funksjonen i kroppen.....	5
2.5.3 Stabilitet .....	6
2.6 Vitamin E.....	7
2.6.1 Kjemisk struktur.....	7
2.6.2 Funksjonen i kroppen.....	8
2.6.3 Stabilitet .....	9
2.7 Analyse av vitaminer .....	9
2.8 Frysetørring .....	10
2.9 Faststoff-væske ekstraksjon.....	10
2.10 Ekstraksjon av vitamin A.....	11
2.11 Ekstraksjon av vitamin E .....	12
2.12 Høypresisjonsvæskerkromatografi.....	12
2.13 Deteksjon av vitamin A .....	13
2.14 Deteksjon av vitamin E.....	14
3. Materialer og metoder.....	15
3.1 Plantematerialet.....	16
3.2 Behandling av plantematerialet.....	16
3.3 Metode 1 .....	17
3.3.1 Kjemikalier, reagenser, utstyr og standarder .....	17
3.3.2 Tillaging av standarder .....	18
3.3.3 Gjennomføring.....	18
3.4 Metode 2 .....	20
3.4.1 Kjemikalier, reagenser, utstyr og standarder .....	20

3.4.2	Tillaging av standarder .....	20
3.4.3	Gjennomføring.....	21
3.5	Evaluering av ekstraksjonsmetodene.....	22
3.6	Metode 2, andre forsøk .....	23
3.6.1	Kjemikalier, reagenser, utstyr og standarder .....	23
3.6.2	Tillaging av standarder .....	23
3.6.3	Gjennomføring.....	23
3.7	Deteksjon av $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol.....	24
3.7.1	Kjemikalier og reagenser .....	24
3.7.2	HPLC betingelser.....	24
3.7.3	Identifisering og kvantifisering av $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol.....	25
4.	Resultater .....	26
4.1	Resultater fra metode 1 (Ekstraksjon med kloroform:diklormetan).....	26
4.1.1	Mengde $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i grønnkål .....	26
4.1.2	Mengde $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i crispisalat .....	27
4.2	Resultater fra metode 2 (Ekstraksjon med aceton:diklormetan).....	27
4.2.1	Mengde $\beta$ - karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i grønnkål .....	27
4.2.2	Mengde $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i crispisalat .....	29
5.	Vurdering .....	29
5.1	Kvantifisert mengde $\beta$ -karoten .....	29
5.1.1	Variasjoner i prøvematerialet.....	30
5.1.2	Sammenligning med andre verdier .....	30
5.1.3	Mulige feil med standardkurvene .....	31
5.2	Kvantifisert mengde $\alpha$ -tokoferol.....	32
5.2.1	Dekomponering av $\alpha$ -tokoferol.....	33
5.2.2	Standardkurver basert på for høye konsentrasjoner.....	33
5.3	Vurdering av ekstraksjonsmetodene .....	34
6.	Videre arbeid.....	35
7.	Konklusjon.....	36
8.	Referanser .....	37

# 1. Innledning

Kunnskapen og erfaringene fra denne bacheloroppgaven er et bidrag til prosjektet LunarPlant; et tverrfaglig og internasjonalt samarbeid mellom CiRis, NTNU, SINTEF og VTT. Prosjektet har som formål å tilegne seg nye kunnskaper om resirkulering av næringsstoffer fra menneskelig avfall, som senere skal anvendes i utviklingen av lukkede systemer for selvforsyning. Systemene skal muliggjøre langsiktig opphold utenfor jorden i forbindelse med en fremtidig kolonisering av månen. Blant annet står hydroponisk plantedyrking av salat og grønnkål i vannbaserte substrater av kildeseparerte urinnæringsstoffer sentralt i denne forskningen. Instituttet for Bioteknologi og Matvitenskap ved NTNU er partner i prosjektet og skal gjøre en evaluering av mattryggheten og næringsinnholdet til plantene dyrket under slike forhold. Som en del av prosjektet skal derfor planters respons på urinbaserte næringskilder studeres. En målsetting er å kartlegge vitamininnholdet til plantene gjennom kvantitative metoder.

Oppgavens hovedmål er å etablere en god “in-house” metode for ekstraksjon av vitamin A (i form av  $\beta$ -karoten) og vitamin E (i form av  $\alpha$ -tokoferol) i plantemateriale som grønnkål og crispisalat. Formålet er at metoden skal kunne brukes i framtidige analyser på prøvemateriale dyrket i forbindelse med prosjektet LunarPlant. Målet oppnås gjennom å teste og sammenligne to ulike ekstraksjonsmetoder med fokus på utbytte, utstyr, antall steg i utførelsen og kjemikalier. Innholdet av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol analyseres ved hjelp av HPLC, og forsøkene tar utgangspunkt i butikkjøpt crispisalat og grønnkål grunnet begrenset tilgang på prøvemateriale fra prosjektet.

## 2. Teoretisk bakgrunn

### 2.1 Hydroponikk

Hydroponikk er en jordfri kultiveringsmetode der planter dyrkes direkte i en flytende næringsmiddelløsning med eller uten mekanisk støtte. Det finnes flere ulike metoder for hydroponisk plantedyrking som innebærer både åpne og lukkede systemer. Fellesnevneren for de ulike systemene er at de ytre miljøfaktorene kan reguleres for å oppnå optimale vekstvilkår, i motsetning til konvensjonelle metoder. Blant annet kan betingelser som nærings- og gassammensetningen, luftfuktigheten, temperaturen og lysnivået bestemmes (Khan et al., 2021). Hydroponisk plantedyrking under slike kontrollerte forhold tillater bedre utnyttelse av næringsstoffer, vann og areal og muliggjør dermed plantedyrking i ekstreme miljøer selv uten dyrkbar jord (Maitra et al., 2020, s. 2). Grunnet sine fordeler, er hydroponisk plantedyrking derfor relevant i forbindelse med etableringen av lukkede systemer for selvforsyning på en mulig månebase. Hydroponikk egner seg også godt til kommersiell dyrking av matplanter, og benyttes stadig mer og mer (Kannan et al., 2022, s. 4). Grønne bladgrønnsaker som grønnkål og crispisalat egner seg til hydroponisk plantedyrking og er mye brukt til dette (Hoidal, 2022). Begge plantene er allment akseptert av forbrukere, og er forholdsvis enkle å tilberede (Baslam et al., 2011, s. 1).

### 2.2 Grønnkål (*Brassica oleracea* var. *Sabellica*)

*Brassica oleracea* var. *Sabellica*, også kjent som grønnkål, er en plante i kålslekten (*Brassica*) underordnet korsblomstfamilien (SNL, 2023a). Planten er forholdsvis enkel å dyrke, og stiller ikke store krav til verken jord eller klima (Grøtta, 2020). Den er hardfør og tåler kjøligere temperaturer, noe som gjør at den kan vokse gjennom hele vinteren (SNL, 2023a). Grønnkål høstes ved å plukke de nederste bladene, og kan lagres kjølig ved  $-2^{\circ}\text{C}$  til  $0^{\circ}\text{C}$  og høy luftfuktighet. Når bladene er høstet må de pakkes inn for ikke å tørke ut, og må omsettes raskt dersom de ikke skal prosesseres ytterligere (Grøtta, 2020). Det er vanlig å spise grønnkål både rå eller varmebehandlet og den er en god kilde til vitamin A, E, K og C (Bama, u.å.a).

## 2.3 Crispisalat (*Lactuca sativa* var. *Danstar*)

*Lactuca sativa* var. *Danstar*, også kjent som crispisalat, er en krysningsplante mellom isbergsalat og frisésalat i salatslekten (*Lactuca*) underordnet kurvplantefamilien (Bama, u.å.b; SNL, 2023b). Planten er lett å dyrke og er i sesong gjennom hele året i Norge. De fleste drivhusdyrkere av Crispisalat i Norge benytter seg allerede av et hydroponisk system kalt næringsfilmteknikk, eller på engelsk Nutrient Film Technique (NFT) (Knoop, 2019, s. 17). Etter innhøsting bør den helst oppbevares innpakket og kjølig ved 2°C til 4°C (Bama, u.å.b). På grunn av sitt høye vanninnhold blir crispisalat ansett som relativt næringsfattig, men salaten inneholder likevel noe vitamin K og vitamin B9 (folat) (Bama, u.å.b).

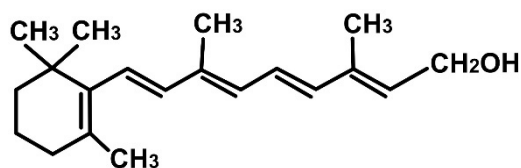
## 2.4 Vitaminer

Vitaminer er organiske og essensielle næringsstoffer som kroppen trenger i små mengder for å opprettholde en normal metabolisme (Ball, 2006, s. 3). I motsetning til andre essensielle næringsstoffer, gir ikke vitaminer energi, men de er viktige for kroppens normale funksjoner. Vitaminenes bruksområder er svært spesifikke, og det er derfor de kun trengs i små mengder. Det er stor variasjon i vitaminenes kjemiske oppbygning og deres kjemiske og fysiologiske funksjoner i kroppen. Noen av vitaminene fungerer som koenzymmer i enzymkatalyserte kjemiske reaksjoner, andre er biologiske antioksidanter, og noen av vitaminene har også hormonfunksjon (Combs, 2008, s.3). Hovedinndelingen av vitaminene baserer seg på løseligheten til de ulike vitaminene, nærmere bestemt om de er vannløselige eller fettløselige. De vannløselige vitaminene er vitamin B og C, og de fettløselige vitaminene er vitamin A, D, E og K (Ball, 2006, s. 3).

## 2.5 Vitamin A

### 2.5.1 Kjemisk struktur

Vitamin A er en samlebetegnelse på alle forbindelser som innehar den samme biologiske aktiviteten som all-trans-retinol (Combs, 2008, s. 43). Strukturen til all-trans-retinol kan ses i figur 1, og kjennetegnes ved å ha en  $\beta$ -iononring festet til en karbonkjede med metylgrupper, konjugerte dobbeltbindinger i trans-konfigurasjon og en hydroksylgruppe i enden.



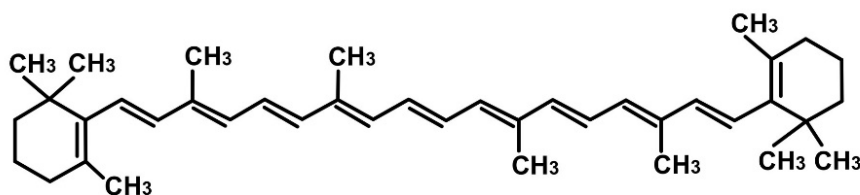
Figur 1: Den kjemiske strukturen til all-trans-retinol (Modifisert fra Ball, 2006, s. 40).

Sammenlignet med andre forbindelser er all-trans-retinol den mest aktive formen for vitamin A og fungerer derfor som en referanse for vitamin A-aktivitet som tilsvarer 100% (Ball, 2006, s.41). Videre i teksten vil all-trans-retinol kun omtales som retinol. For at en forbindelse skal kunne besitte lignende vitamin A-aktivitet som retinol må den ha minst en usubstituert  $\beta$ -iononring, riktig antall konjugerte dobbeltbindinger og metylgrupper, og riktig orientering av gruppene langs karbonkjeden. Forbindelsen bør helst også ha trans-konfigurasjon da cis-isomerene er mindre aktive enn de naturlig forekommende all-trans-forbindelsene (Burri, 2013; Eitenmiller, 2007, s. 23).

I animalske kilder foreligger vitamin A som ulike retinolmetabolitter, kalt retinoider (Combs, 2008, s.43). De er strukturelt nært beslektede og omtales gjerne som preformert vitamin A (Pedersen et al., 2013, s. 184). Retinolmetabolittene kan opptre i ulike former og flere isomerer (Combs, 2008, s.43). Med hydroksylgruppe (retinol), aldehydgruppe (retinal) eller karboksylsyregruppe (retinsyre) (Cole & Kramer, 2016, s.168). Disse forbindelsene kan også bli forestret av organiske syrer eller alkoholer. Det meste av vitamin A i animalske kilder foreligger som retinylesteren retinylpalmitat (Combs, 2008, s.97).

I vegetabiliske kilder finnes det kun forbindelser som er foreløpere til vitamin A. De foreligger som karotenoider i form av ulike karotener og xantofyller (Pedersen et al., 2013, s.184). Foreløpig er det identifisert over 600 ulike karotenoider, men kun 60 av disse forbindelsene kan omdannes til retinol i kroppen (Combs, 2008, s. 97; Eitenmiller, 2007, s.8). Karotenoider med slik vitamin A-aktivitet omtales gjerne som provitamin A (Pedersen et al., 2013, s. 184). De mest sentrale er  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, and  $\beta$ -cryptoxanthin (Eitenmiller, 2007, s. 23). Grønt fotosyntetiserende plantevev, som bladgrønnsaker, inneholder karotenoider bundet til proteinkomplekser i de indre membranene av kloroplastene. Mest vanlig er forekomsten av karotenet  $\beta$ -karoten (Ball, 2006, s.78).  $\beta$ -karoten er en  $C_{40}$ -forbindelse bestående av 8 isoprene enheter som utgjør en tetraterpenoid med konjugerte dobbeltbindinger (UIO, 2024). Strukturen kjennetegnes også av de to  $\beta$ -

iononringene på hver ende av hydrokarbonkjeden (Eitenmiller, 2007, s.8). Strukturen til  $\beta$ -karoten kan ses i figur 2.



Figur 2: Den kjemiske strukturen til  $\beta$ -karoten (Modifisert fra Ball, 2006, s. 42).

Ifølge Matvaretabellen er det 5,350 mg  $\beta$ -karoten i 100 g fersk grønnkål og 0,150 mg  $\beta$ -karoten i 100 g fersk isbergsalat (Mattilsynet, 2023a; Mattilsynet, 2023b). Mengden  $\beta$ -karoten påvirkes imidlertid av vekstbetingelsene. Blant annet spiller eksponeringen for lys en avgjørende rolle i dannelsen av plastider og biosyntesen av karotenoider i planter. Sterkt og mye lys virker stimulerende på biosyntesen, mens lite og svakt lys virker hemmende (Rocio, 2021, s. 1).

### 2.5.2 Funksjonen i kroppen

Vitamin A har flere fysiologiske oppgaver i kroppen knyttet til blant annet vekst, beindannelse, celledifferensiering, reproduksjon, fosterutvikling og mørkesyn (Pedersen et al., 2013, s. 186-187). Både retinoider og karotenoider absorberes passivt via blandete miceller gjennom enterocytene i slimhinnen i tynntarmen (Pedersen et al., 2013, s. 185). Absorpsjonen er helt avhengig av fett fra kosten for at vitamin A-forbindelsene skal være dispergert i det vandige miljøet i tynntarmen (Pedersen et al., 2013, s. 185). Absorpsjonen av provitamin A-karotenoider i form av  $\beta$ -karoten ligger på rundt 10-20%, og omtrent halvparten omdannes til retinol (Pedersen et al., 2013, s. 184). Det antas at det i hovedsak finnes to mekanismer for dannelsen av retinol i kroppen fra karotenoider gjennom kosten (Burri, 2013). En sentral spaltingsmekanisme og en eksentrisk spaltingsmekanisme (Eitenmiller, 2007, s.23). Ved den sentrale spaltingsmekanismen splittes  $\beta$ -karoten i to av enzymet  $\beta$ -karoten-15,15-monoksygenase, og det settes inn oksygen for å danne to molekyler av retinal som videre reduseres til retinol (Cole & Kramer, 2016, s.168; Pedersen et al., 2013, s. 184). Denne mekanismen resulterer dermed i to mol retinol per mol  $\beta$ -karoten som splittes, eller et mol retinol per mol av andre provitamin A-karotenoider (Eitenmiller, 2007, s.23; Burri, 2013). Ved den eksentriske spaltingsmekanismen blir karotenoider splittet i andre

dobbeltbindinger langs karbonkjeden. Produkter fra disse reaksjonene kan metaboliseres videre til retinol. For eksempel kan  $\beta$ -karoten-9,10-oksigenase splitte  $\beta$ -karoten i 9'-10'-dobbeltbindingen for å danne  $\beta$ -ionon og  $\beta$ -apo-10-karotenal. Det er den sentrale spaltingsmekanismen som er mest dominerende under normale fysiologiske forhold (Burri, 2013).

Grunnet variasjoner i biotilgjengeligheten mellom ulike retinoider og karotenoider benyttes det som regel en standard måleenhet ved kvantifisering av vitamin A-innholdet, kalt retinolekvivalenter (RAE) (Pedersen et al., 2013, s. 183). 1 RAE tilsvarer 1  $\mu$ g retinol, og forutsetter 100% absorpsjon i kroppen (Pedersen et al., 2013, s. 185). Den ufullstendige absorpsjonen og omdannelsen av  $\beta$ -karoten tas i betraktning ved at 1 RAE tilsvarer 2  $\mu$ g  $\beta$ -karoten gjennom kosttilskudd og 6  $\mu$ g  $\beta$ -karoten gjennom kosten. Andre provitamin A aktive karotenoider har omtrent 50 % av den biologiske aktiviteten til  $\beta$ -karoten, og konverteringsfaktoren tilsvarer derfor at 1 RE er det samme som 12  $\mu$ g andre provitamin A karotenoider (Eitenmiller, 2007, s.4). I Nordic Nutrition Recommendations 2023 (NNR2023) anbefales det et daglig inntak på 700 RAE for kvinner og 800 RAE for menn (Blomhoff et al., 2023, s. 124).

### **2.5.3 Stabilitet**

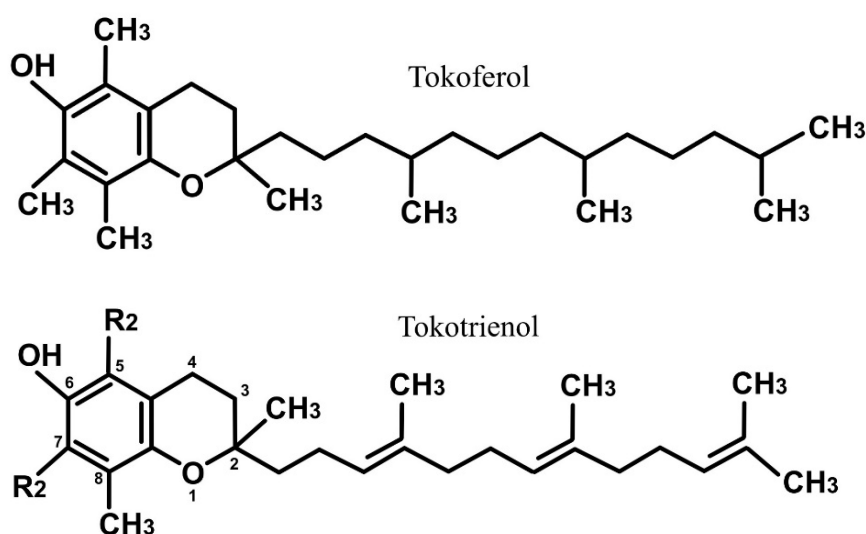
Utenfor sine biologiske matrikser er provitamin A-karotenoider, som  $\beta$ -karoten, eksponert for ulike prosesser som kan hemme deres funksjon som vitamin A-forløpere (Eitenmiller, 2007, s.16). Ved ekstraksjon, analyse og lagring er de blant annet svært utsatt for oksidasjon og trans til cis-isomerisering, spesielt i kombinasjon med eksponering for lys og varme (Combs, 2008, s. 44; Eitenmiller, 2007, s.17). For å unngå oksidasjon ved ekstraksjon bør det derfor benyttes en beskyttende antioksidant, en inert gass eller vakuum for å fortrenge luft (Combs, 2008, s. 44). Prøvematerialet bør også oppbevares kjølig, helst ved  $-20^{\circ}\text{C}$  eller lavere, og i luft- og lystett emballasje (Pedersen et al., 2013, s. 184). Lys og høye temperaturer kan også fremme trans til cis-isomerisering. Ekstraksjon og analyse bør derfor gjennomføres ved dempet belysning og den laveste temperaturen som er mulig (Eitenmiller, 2007, s.16) Det er også nevneverdig at klorofyll, som er naturlig tilstedeværende ved ekstraksjon fra grønne bladgrønnsaker, kan fremme fotoisomerisering av karotenoider til cis-form ved eksponering for hvitt lys (Ball, 2006, s. 45). Enzymer som lipooksigenase og peroksidase kan også inaktivere vitamin A-funksjonen til karotenoider (Pedersen et al., 2013, s. 184).



## 2.6 Vitamin E

### 2.6.1 Kjemisk struktur

Vitamin E er et fettløselig vitamin. Det er to kjemiske hovedgrupper som går under betegnelsen vitamin E; tokoferoler og tokotrienoler (Pedersen et al., 2013, s.201). Begge disse gruppene syntetiseres i planter, og de har veldig lik struktur. Tokoferoler og tokotrienoler består begge av en kromanolring, men det som skiller de fra hverandre er at tokoferolene har en mettet sidekjede og tokotrienolene har en umettet sidekjede med dobbeltbindinger (Pedersen et al., 2013, s. 201). Den strukturelle forskjellen kan ses i figur 3.



Figur 3: Kjemisk struktur av tokoferol og tokotrienol. (Modifisert fra Pedersen et al., 2013, s. 202).

Naturlig finnes det fire ulike tokoferoler og fire ulike tokotrienoler. De ulike variantene har fått navnet ut ifra antall og plasseringen av metylgruppa i kromanolringen og har navnene:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - og  $\delta$ -tokoferoler og tokotrienoler (Ball, 2006, s.120). Det er  $\alpha$ -tokoferol som forekommer i størst mengde i naturen og den varianten av vitamin E som har høyest biologisk aktivitet (Pedersen et al., 2013, s. 202). Det finnes både naturlige og kunstige tokoferoler. Den naturlige varianten har navnet RRR- $\alpha$ -tokoferol, mens den kunstige varianten har navnet all-rac- $\alpha$ -tokoferol. Den kunstige varianten dannes ved kondensering av trimetylhydrokinon med syntetisk fytol eller isofytol, og har ikke like høy biologisk aktivitet som den naturlige formen (Ball, 2006, s. 120).

### 2.6.2 Funksjonen i kroppen

Vitamin E er lagret i alle cellemembraner i kroppen, og finnes også i fettvev, lever, livmor, testikler og binyrer. Totalt utgjør dette Vitamin E-lageret et par gram i kroppen (Pedersen et al., 2013, s. 203). Den viktigste ernæringsmessige funksjonen til vitamin E er biologisk antioksidant (Combs, 2008, s. 191). Vitamin E kan virke direkte som en antioksidant, og hemme oksidasjon ved at  $\alpha$ -tokoferol reagerer med frie radikaler, og vitamin E forbrukes. Dette er spesielt gunstig for de flerumettede fettsyrene i cellemembranene. Ved oksidativ nedbrytning av flerumettede fettsyrer dannes det skadelige fettsyreperoksidene, som kan føre til at permeabiliteten til cellemembranen endres, slik at opptaket av ulike stoffer gjennom membranen endres (Pedersen et al., 2013, s. 203). Vitamin E kan også virke direkte som en antioksidant i cellemembranene for å hindre oksidasjon av vitamin A og D (Pedersen et al., 2013, s. 203). Det er også vist at vitamin E kan ha antioksidantfunksjon i samspill med andre kjemiske komponenter. Sammen med sporstoffet selen, beskytter vitamin E cellene mot frie radikaler. Vitamin E hindrer at de skadelige fettsyreperoksidene oppstår, mens enzymet glutation peroksidase, som har selen som kofaktor, medvirker til å fjerne fettsyreperoksidene hvis de først har oppstått (Pedersen et al., 2013, s. 203). Sammen med vitamin C, har vitamin E et samspill der vitamin C reaktiverer vitamin E, slik at vitamin E igjen kan fungere direkte som en antioksidant (Wahlgren, 2024, s. 39).

Vitamin E er en av de viktigste antioksidantene i kosten, og gode kilder til vitamin E er grønne planter, vegetabiliske oljer, nøtter og helkorn (Ball, 2006, s. 123). Ifølge Matvaretabellen er vitamin E innholdet i 100 g fersk grønnkål 5,4 mg, og i 100 g fersk isbergsalat er det 0,2 mg (Mattilsynet, 2023a; Mattilsynet 2023b). Av alt vitamin E som spises er det 51-86 % som absorberes i kroppen, og absorpsjonen er avhengig av normal gallesekresjon og bukspyttkjertelfunksjon (Pedersen et al., 2013, s. 203). Vitamin E er lite toksisk sammenlignet med de andre fettløselige vitaminene, og mangel på vitamin E er heller ikke et stort problem i Norge (Pedersen et al., 2013, s. 206). Siden de ulike formene av vitaminet finnes i ulik mengde og har ulik effekt i forskjellige produkter, er det vanlig å regne om til en felles måleenhet. Den vanligste måleenheten for vitamin E er  $\alpha$ -tokoferolekvivalent ( $\alpha$ -TE). 1  $\alpha$ -TE tilsvarer 1 mg naturlig RRR- $\alpha$ -tokoferol. De andre variantene og de kunstige variantene av  $\alpha$ -tokoferol, vil ha lavere biologisk aktivitet, så for de vil 1  $\alpha$ -TE tilsvare mer enn 1 mg av varianten man analyserer for (Pedersen et al., 2013, s. 202). Det er ingen konkret anbefaling av daglig inntak av vitamin E, men i NNR2023 står det at et daglig inntak på 8  $\alpha$ -

TE for kvinner og 9  $\alpha$ -TE for menn er tilstrekkelig for å dekke de ernæringsmessige kravene (Blomhoff et al., 2023, s. 130).

### **2.6.3 Stabilitet**

Tokoferoler og tokotrienoler er svært ustabile molekyler som raskt oksideres ved tilgang til oksygen. Oksideringen skjer også raskt ved eksponering for sollys og kunstig UV-lys, i tillegg til ved oppvarming (Ball, 2006, s. 122). I motsetning til andre vitaminer, oksideres også vitamin E ved dypfrysing (Pedersen et al., 2013, s. 202). Tokotrienolene er mer utsatt for oksidering, enn tokoferolene på grunn av dobbeltbindingene i den umettede sidekjeden (Ball, 2006, s. 1). Stabiliteten til vitamin E øker hvis vitaminet er forestret, det vil si bundet til eddiksyre eller en fettsyre (Pedersen et al., 2013, s. 202).

## **2.7 Analyse av vitaminer**

Vitaminene er essensielle og må fås gjennom kosten fordi kroppen ikke klarer å syntetisere dem selv. Det er derfor av stor ernæringsmessig interesse å gjennomføre kvantitative analyser av vitamininnholdet i ulike matvarer. På grunnlag av slike data kan det blant annet gis anbefalinger og kostråd om hvordan det daglige behovet for de ulike vitaminene kan dekkes. På en annen side finnes det et mangfold av faktorer som kan påvirke nærings sammensetningen til en matvare før den faktisk inntas, noe som gjør estimer av vitamininntaket utfordrende (Combs, 2008, s. 441). For matvarer med vegetabilsk opprinnelse kan innvirkende faktorer på vitamininnholdet blant annet være variasjoner i vekstbetingelser og fordelingen i selve plantevevet (Combs, 2008, s. 443, 446). Ved en kvantifisering av vitamininnholdet vil derfor nøyaktigheten til resultatene avhenge av porsjonsstørrelsen og antallet individuelle planter prøvematerialet baserer seg på (Booth et al., 1992, s.8). Før en slik vitaminanalyse vil det imidlertid i mange tilfeller være en form for forbehandling av prøvematerialet for å gjøre vitaminene mer tilgjengelige. Ulike forbehandlingstrinn kan blant annet innebære prosesser som kverning, tørking og frysetørking (Machmudah & Goto, 2013, s. 3371, 3374). Etter forbehandling kommer selve ekstraksjonstrinnet der de ønskelige vitaminene ekstraheres ut fra matriksen de befinner seg i. Det finnes flere ulike ekstraksjonsmetoder som for eksempel væske-væske-ekstraksjon, forsåpning, enzymatisk hydrolyse, alkoholyse, superkritisk-væske-ekstraksjon og faststoff-væske-ekstraksjon (Ball, 2006, s. 419). Når ekstraktene er klare, gjenstår det å separere og

detektere de ulike vitaminene i prøvematerialet. Det finnes flere separasjons- og deteksjonsmetoder som baserer seg på ulike varianter av spektroskopi, kromatografi og elektroforese (Zhang et al., 2018, s. 3). Den vanligste metoden for å kvantifisere vitaminer er HPLC (Zhang et al., 2018, s. 10).

## **2.8 Frysetørrking**

Frysetørrking er en tørkeprosess som det er vanlig å bruke for konservering av matvarer. Prosessen tar utgangspunkt i sublimasjon der væsken (vannet) i produktet går direkte fra fast form til gass/damp, ved lavt trykk og lav temperatur (Shukla, 2011, s. 3). Frysetørrkingsprosessen kan deles inn i tre hovedtrinn, der det første trinnet er frysing. Det er avgjørende at produktet er helt fryst når det skal frysetørkes. Dette er viktig for å sikre at sublimeringen skjer riktig, og at sluttproduktet blir slik det skal (Shukla, 2011, s. 4). Etter frysetrinnet kommer primærtørrkingen der trykket senkes, det blir laget et vakuum og det blir tilført varme slik at vannet i produktet kan sublimeres. Vanndampen blir deretter ført ut av kammeret, og fryser på nytt til is i et sidekammer. Det tredje og siste trinnet er sekundærtørrking. Her er hovedmålet å fjerne vannmolekyler som ikke er fryst, og som derfor ikke ble fjernet under primærtørrkingen. Tiden det tar for frysetørrkingsprosessen avhenger av type produkt. Etter de tre trinnene er frysetørrkingen ferdig og resultatet er et lagringsstabil produkt som i stor grad beholder sine sensoriske kvaliteter og egenskaper (Shukla, 2011, s. 4).

## **2.9 Faststoff-væske ekstraksjon**

Faststoff-væske ekstraksjon er en ekstraksjonsmetode som baserer seg på at et flytende løsemiddel blandes med et fast stoff (Ecolink, 2021). Det faste stoffet kan for eksempel være prøvemateriale fra en matvare som inneholder kjemisk bundne komponenter det er ønskelig å analysere for. En forutsetning for ekstraksjonen er at polariteten til løsemiddelet er i samsvar med polariteten til komponentene som skal ekstraheres (Machmudah & Goto, 2013, s. 3371, 3373). For vannløselige komponenter er det nødvendig med polare løsemidler, mens det for fettløselige komponenter derimot kreves upolare løsemidler (Machmudah & Goto, 2013, s. 3373). Når løsemiddelet og det faste stoffet blandes vil komponentene trekkes ut av matriksen, og over i den flytende fasen (Ecolink, 2021). Betegnelsen på denne flytende fasen

er supernatant (Språkrådet, u.å). Videre kan det benyttes andre metoder som sentrifugering, filtrering eller fordampning for å isolere de komponentene det er ønskelig å analysere for.

## 2.10 Ekstraksjon av vitamin A

Forsåpning og faststoff-væske ekstraksjon er de to vanligste metodene for ekstraksjon av vitamin A, mens superkritisk væskeekstraksjon er noe mindre brukt (Eitenmiller, 2007, s. 28). Forsåpning er et generelt begrep som refererer til alkalisk hydrolyse, og brukes når det er vanskelig for løsemidlene å trenge inn i prøvematriksen direkte (Eitenmiller, 2007, s. 49). Vanligvis brukes kaliumhydroksid (KOH) til forsåpningen, men enkelte prosedyrer krever natriumhydroksid (NaOH). Alkalisk hydrolyse resulterer blant annet i spalting av esterbindingene i acylglyceroler og frigjøring fra protein-, lipid- og karbohydratkomplekser, noe som muliggjør vitaminekstraksjon av fettløselige vitaminer som vitamin A i form av retinoider og karotenoider (Eitenmiller, 2007, s. 143). Når det er mulig, bør det imidlertid benyttes faststoff-væske ekstraksjon framfor forsåpning. Det er fordi forsåpning forlenger ekstraksjonstiden og krever mer løsemiddel (Eitenmiller, 2007, s. 28). I tillegg har det blitt påvist at flere forsåpningsmetoder kan fremme dannelsen av cis-isomere av  $\beta$ -karoten. Forsåpning bør dermed begrenses til bruk på prøvemateriale der lipidinnholdet er høyt og metoden er nødvendig (Ball, 2006, s.442). Det finnes flere organiske løsemidler og løsemiddelblandinger som kan ekstrahere retinoider og karotenoider direkte fra prøvematriksen (Eitenmiller, 2007, s.49). Dette muliggjør faststoff-væskeekstraksjon. Noen eksempler på løsemidler er etanol, metanol, aceton, n-heksan, kloroform, tetrahydrofuran og pentan, mens løsemiddelblandinger er diklormetan:metanol, aceton:petroleumeter, tetrahydrofuran:metanol, n-heksan:toluene, n-heksan:aceton, n-heksan:etylacetat, n-heksan:aceton:etanol og 2-propanol:diklormetan (Machmudah & Goto, 2013, s. 3371). Fellesnevneren til disse løsemidlene og løsemiddelblandingene er at de kan trenge inn i prøvematerialet og bryte opp lipoproteinkomplekset som retinoidene og karotenoidene er en del av (Ball, 2006, s.419). Det er avgjørende med fullstendig lipidekstraksjon for å ekstrahere vitamin A, og de upolare organiske løsemidlene nevnt over sikrer god oppløsning (Eitenmiller, 2007, s. 49).

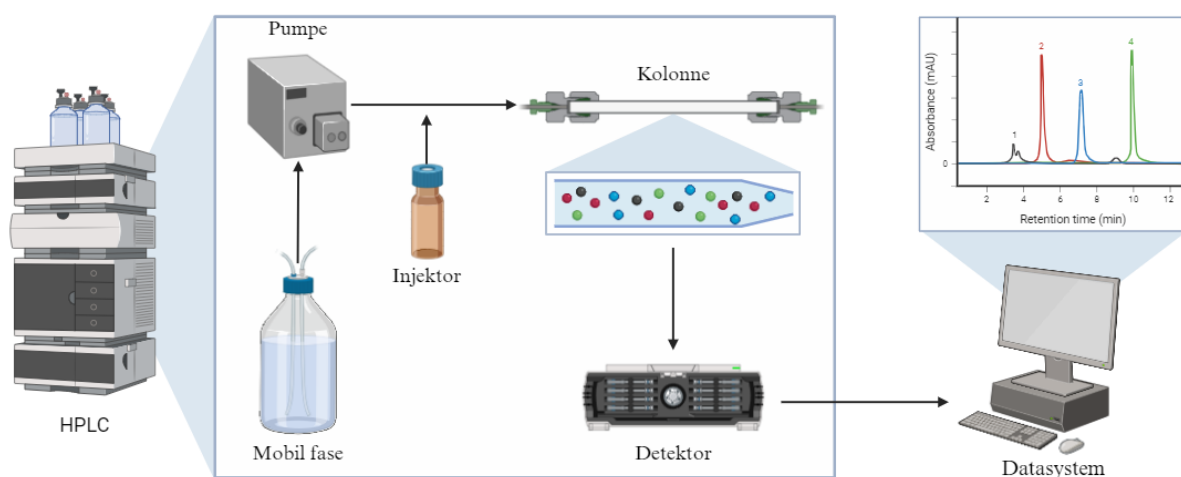
## 2.11 Ekstraksjon av vitamin E

Innholdet av vitamin E i ulike matvarer varierer, og hvis innholdet er lavt kan det være vanskelig å få ekstrahert ut alt av vitaminet. Den enkleste ekstraksjonsmetoden er faststoffvæskeekstraksjon med et upolart organisk løsemiddel (Zaaboul & Liu, 2022, s. 22). Den mest brukte ekstraksjonsløsningen er n-heksan, men for noen varianter av tokoferol vil ikke dette løsemiddelet ha like god effekt. Andre løsemidler som er mye brukt er blant annet acetone, metanol, etanol og kloroform. Hvis matvaren som skal analyseres har en kompleks struktur, eller har et veldig lavt vitamin E-innhold kan det være nødvendig med forsåpning. Ved forsåpning frigjøres mer vitamin E fra matmatriksen fordi esterbindingene hydrolyseres og spaltes til alkoholer og syrer. Dette er med på å ødelegge pigmenter og forstyrre matmatriksen (Zaaboul & Liu, 2022, s. 22). Andre ekstraksjonsmetoder som kan brukes og som er testet for vitamin E er væskefase-mikroekstraksjon, ultralyd-assistert faststoffvæskeekstraksjon og superkritisk væskeekstraksjon (Zaaboul & Liu, 2022, s. 22-23).

## 2.12 Høypresisjonsvæskekromatografi

Høypresisjonsvæskekromatografi (High-performance liquid chromatography, HPLC) er en analysemetode som brukes til å separere, kvantifisere og identifisere ulike komponenter i en væske. HPLC-instrumentet består av en mobil fase, pumpe, injektor, kolonne, detektor og et datasystem (Bhardwaj et al., 2015, s. 1). Løsemiddelet som brukes med HPLC-instrumentet vil fungere som den mobile fasen, og selve kolonnen er den stasjonære fasen. Injektoren fungerer som en pumpe, og kontrollerer injiseringen av den mobile fasen. Den flytende prøven som skal analyseres, injiseres inn på HPLC-instrumentet, der den blandes med den mobile fasen. Blandingen av den mobile fasen og prøven injiseres inn på kolonnen, der selve separasjonen skjer. I kolonnen skilles de ulike komponentene fra hverandre etter polaritet og/eller størrelse (NTNU, 2018). HPLC-instrumentet kan være basert på normal-fase eller omvendt-fase. Det er omvendt-fase som er mest vanlig å bruke, og da fungerer kolonnen som den stasjonære fasen og er upolar, mens prøvewæsken (den mobile fasen) er polar. Ved normal-fase er den stasjonære fasen polar, mens den mobile fasen er upolar (NTNU, 2018). Det er flere ting ved HPLC-instrumentet som kan endres for å optimalisere analysemetoden. Både lengden og diameter på kolonnen som brukes kan variere, i tillegg til at det er mulig å endre kolonnetemperatur, flow, deteksjonsmetode og sammensetningen av den mobile fasen. Den mobile fasen bør passe prøvens kjemiske egenskaper, i tillegg til separasjonsmetoden som brukes (Bhardwaj et al., 2015, s. 2). Deteksjonen kan baseres på ulike

deteksjonsprinsipper, som for eksempel UV/VIS-lys eller fluorescens. Når de ulike komponentene i prøven er separert, vil detektoren registrere retensjonstiden til de ulike komponentene. Retensjonstiden er tiden det tar fra prøven injiseres på HPLC-instrumentet, til den registreres av detektoren. De ulike retensjonstidene kan leses av på datasystemet, og ved å studere de ulike retensjonstidene kan en bestemme hvilke komponenter som finnes i prøven, og også konsentrasjonen til de ulike komponentene (NTNU, 2018). En oversikt over prinsippet bak HPLC kan ses i figur 4.



Figur 4: En oversikt over prinsippet bak HPLC (modifisert fra Egeland, 2023. Laget med BioRender).

## 2.13 Deteksjon av vitamin A

Ved kvantitative analyser for vitamin A-innhold er HPLC den mest pålitelige metoden for å detektere innholdet av retinoider eller karotenoider (Ball, 2006, s.61). Kolorimetriske, spektrofotometriske og fluorometriske metoder samt papir, tynnsjikts- og åpen-kolonne kromatografiske metoder blir også benyttet (Eitenmiller, 2007, s. 23). Den raske utviklingen innen væskekromatografi de siste 30 årene har imidlertid resultert i at majoriteten av metodene i dag baserer seg på omvendt-fase C8, C18, eller C30 HPLC fremfor eldre tilnærminger (Eitenmiller, 2007, s.53). Etter at den ble kommersielt tilgjengelig har særlig bruken av C30 blitt inkorporert i studier av provitamin A-karotenoider og andre fettløselige vitaminer (Eitenmiller, 2007, s.23). Sammenlignet med andre kolonner har C30 kapasitet til å skille mellom cis- og trans isomerer i relativt komplekse karotenoideblandinger med høy presisjon (Eitenmiller, 2007, s. 23, 28, 55). Kolonnen opererer med isokratisk eluering der den mobile fasen består av tert- Butyl metyl eter (MTBE) og metanol. Det er avgjørende at injeksjonsvæsken er kompatibel med HPLC-mobilfasen. Dersom løseligheten til

karotenoidene er betydelig bedre i injeksjonsvæsken enn i den mobile fasen, vil karotenoidene felles ut ved injeksjon. Dette kan resultere i asymmetriske, brede eller doble toppe ved avlesning (Machmudah & Goto, s.3386). Grunnet sine mange konjugerte dobbeltbindinger har karotenoider sterk absorpsjon i det synlige spekteret av lys, og absorpsjonsmaksimumet ligger vanligvis mellom 400 og 500 nm (Eitenmiller, 2007, s.56). Absorpsjonsintensiteten til karotenoidene påvirkes imidlertid av løsemiddel- og mobilfasesammensetningen som de befinner seg i (Eitenmiller, 2007, s.14).  $\beta$ -karoten har et absorpsjonsmaksimum ved 450 nm løst i MTBE og metanol (Eitenmiller, 2007, s.15).

## 2.14 Deteksjon av vitamin E

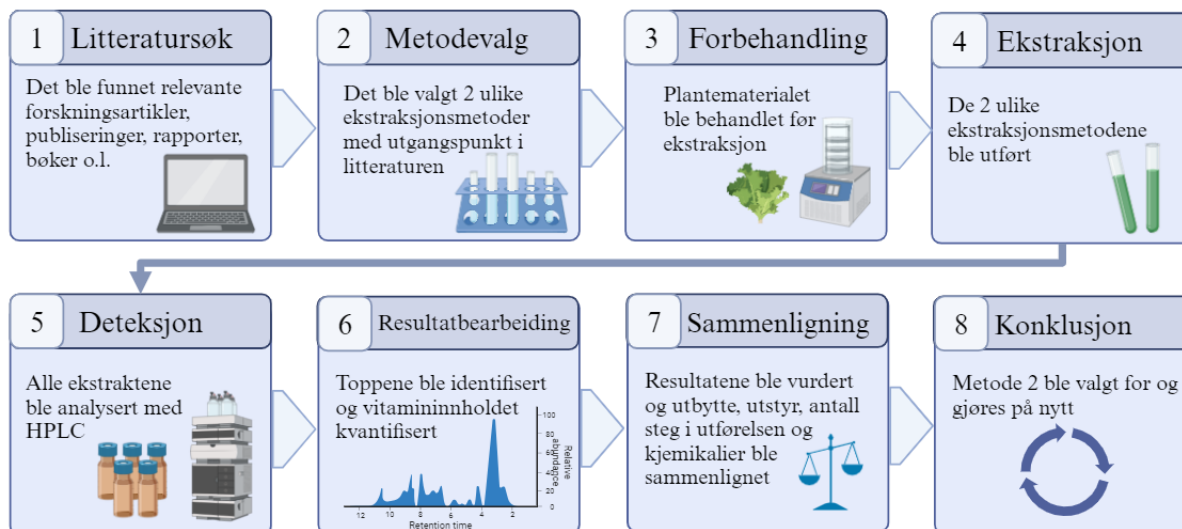
Det finnes ulike metoder for å detektere vitamin E. Noen eksempler er HPLC, FTIR (Fouriertransformasjon infrarød spektroskopi), RAMAN-spektroskopi og UV-VIS (ultrafiolett-synlig spektroskopi) (Gamna & Spriano, 2021, s. 10). Den enkleste og raskeste metoden for å detektere vitamin E er HPLC (Ball, 2006, s. 128). Med denne metoden kan man identifisere og kvantifisere tokoferoler og tokotrienoler i produktet. Separasjonen med HPLC kan basere seg på både normal-fase eller omvendt-fase. Normal-fase separasjon brukes til å separere alle de 8 ulike variantene av tokoferol og tokotrienol. Separasjonen baserer seg på tokoferol-polaritet som er omvendt proporsjonal med antall metylgrupper på kromanolringen og steriske hindringer disse gruppene har (Zaaboul & Liu, 2022, s. 23-24). Tokotrienoler har høyere polaritet enn tokoferoler, så rekkefølgen på separasjonen er  $\alpha \rightarrow \alpha_3 \rightarrow \beta \rightarrow \beta_3 \rightarrow \gamma \rightarrow \gamma_3 \rightarrow \delta \rightarrow \delta_3$ , der variantene med 3-tall symboliserer tokotrienoler, og bare bokstavene symboliserer tokoferoler. Ved omvendt-fase separasjon separeres de ulike variantene basert på forskjell i polaritet og grad av metning (antall dobbeltbindinger) i sidekjeden.

Tokoferolene med mettede sidekjerder vil ha høyere affinitet til den stasjonære fasen, så separasjonsrekkefølgen blir derfor omvendt av det den er med normal-fase. Det er omvendt-fase HPLC som er mest brukt fordi det ofte brukes farlige og flyktige organiske løsemidler ved normal-fase HPLC og reproduserbarheten er også dårligere enn ved omvendt-fase HPLC (Zaaboul & Liu, 2022, s. 24). C18 kolonne er mest brukt fordi den har høy kolonnestabilitet, kort utjevningstid, god reproduserbarhet og er miljøvennlig. Den mobile fasen består som oftest av polare løsemidler som vann, metanol, acetonitrill eller isopropanol (Zaaboul & Liu, 2022, s. 24). For deteksjon av tokoferoler og tokotrienoler i etanol har det vist seg at de har maksimal absorpsjon ved bølgelengder mellom 292 og 298 nm (Eitenmiller, 2007, s. 131).



### 3. Materialer og metoder

I denne oppgaven ble det sammenlignet to ekstraksjonsmetoder for  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol i grønnkål og crispisalat. Til å begynne med ble det gjennomført et litteratursøk for å kartlegge relevant teori og aktuelle metoder for kvantifisering av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol. I litteratursøket ble blant annet Oria og Google Scholar benyttet til å finne relevante forskningsartikler, bøker og andre publiseringer. I tillegg ble det utdelt litteratur fra veileder. Valget av metoder tok utgangspunkt i tidligere forsøk på ekstraksjon og deteksjon av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol utført på liknende prøvemateriale. I tillegg ble hensyn som utstyr, antall steg i utførelsen og kjemikalier tatt i betraktning med tanke på den praktiske gjennomføringen, og hvorvidt  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol kunne analyseres for samtidig. Det ble til slutt valgt to ulike metoder som det ble gått videre med. Den ene ekstraksjonsmetoden (metode 1) er hentet fra en forskningsartikkel publisert i *Plant Methods* og tar utgangspunkt i «A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography» av Gupta et al. (2015). Den andre ekstraksjonsmetoden (metode 2) er hentet fra Institutt for Materialteknologi og er en laboratorieøvelse i instrumentell analyse og biopolymere, og tar utgangspunkt i kvantitativ analyse av fettløselige vitaminer i vitamintablett. Metoden kan ses i vedlegg 1. Før ekstraksjon ble alt av prøvematerialet frysetørket og kvernet på prosesslaboratoriet ved Akrinn, Kalvskinnet. Deretter ble begge metodene utført med tilpasninger til utstyret tilgjengelig på analytisk laboratorium ved Akrinn, Kalvskinnet, og parametere som temperatur, mengden prøvemateriale og løsemidler ble også testet ut. Alle ekstraktene fra begge metodene ble analysert med HPLC under de samme betingelsene. Etter kvantifisering og vurdering av vitamininnholdet ble det kun gått videre med metode 2 for å gjenta forsøket en gang til. Ekstraktene fra metode 2 etter andre gjennomgang ble gjort klare, men ble ikke analysert med HPLC da det manglet en  $\beta$ -karoten-standard å basere standardkurven på. Det ble bestilt en ny  $\beta$ -karoten-standard, men leveringstiden var ikke innenfor tidsrammen til oppgaven. Grunnet en teknisk feil på HPLC-instrumentet ble det heller ikke analysert for innholdet av  $\alpha$ -tokoferol. En generell oversikt over gjennomføringen til hele oppgaven kan ses i flytskjemaet i figur 5.



Figur 5: Framstilling av gangen i hele forsøket i form av et flytskjema (Laget med BioRender).

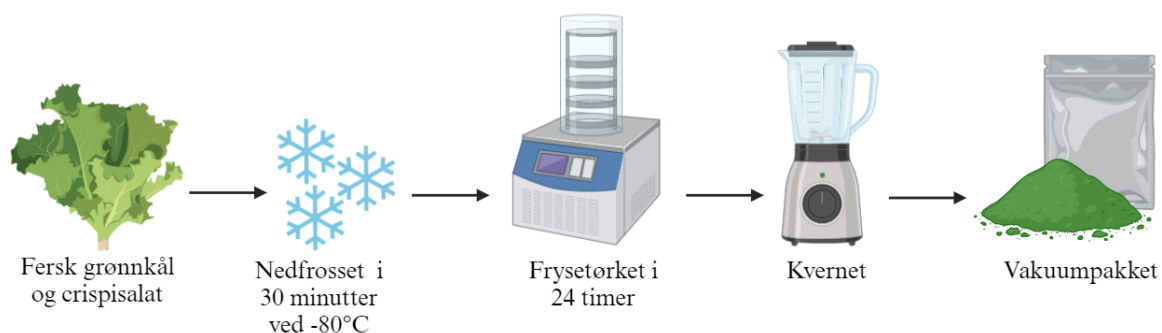
### 3.1 Plantematerialet

Plantematerialet som dyrkes av prosjektet LunarPlant er en begrenset ressurs. For å unngå unødvendig svinn i forbindelse med utprøving og metodeutvikling ble det derfor benyttet fersk grønnkål og crispisalat kjøpt på Coop Extra. Grønnkålen som ble brukt var “COOP Grønnkål” med opprinnelse fra Spania, og crispisalaten som ble brukt var “Coop Crispisalat” med opprinnelse fra Norge. Det ble bekreftet av daglig leder for Frisk-salat AS at crispisalaten var av arten *Lactuca sativa* var. *Danstar* (M, Skjeviek, personlig kommunikasjon, 25.april, 2024). Det ble ikke bekreftet av leverandør hvilken art av grønnkål de distribuerer, men det antas at grønnkålen er av samme art som omtales i delkapittel 2.2. Etter kjøp ble plantematerialet oppbevart kaldt og mørkt på fryserom ved -20°C frem til videre behandling.

### 3.2 Behandling av plantematerialet

Før gjennomføringen av ekstraksjonsmetodene ble alt av plantematerialet frysetørket. Frysetørkeren som ble brukt var “Labconco-FreeZone 12 (-50°C)”. Rett før frysetørring ble plantematerialet som skulle frysetørkes, lagt i -80°C-fryser i ca. 30 minutter. Grønnkålen og crispisalaten ble frysetørket hver for seg i fire batcher på ca. 150 g, der hver frysetørring varte i 22-25 timer. Batchene kan ses i vedlegg 2. Rett etter frysetørring ble hver batch med crispisalat eller grønnkål fortløpende vakuumert og dekket med aluminiumsfolie, for så å bli oppbevart på kjølerom (4°C). Når alt av plantematerialet var frysetørket ble alle batchene med grønnkål blandet og alle batchene med crispisalat blandet. De ble deretter “kvernet” hver

for seg til et fint pulver med hjelp av en kjøkkenstavmikser. Det miksede pulveret ble til slutt vakuumbært og oppbevart på kjølerom (4°C) frem til ekstraksjonsmetodene ble gjennomført. Figur 6 viser den overordnede gjennomføringen av forbehandlingen i form av et flytskjema.



Figur 6: Alle trinnene i forbehandlingen av prøvematerialet i form av et flytskjema (Laget med BioRender).

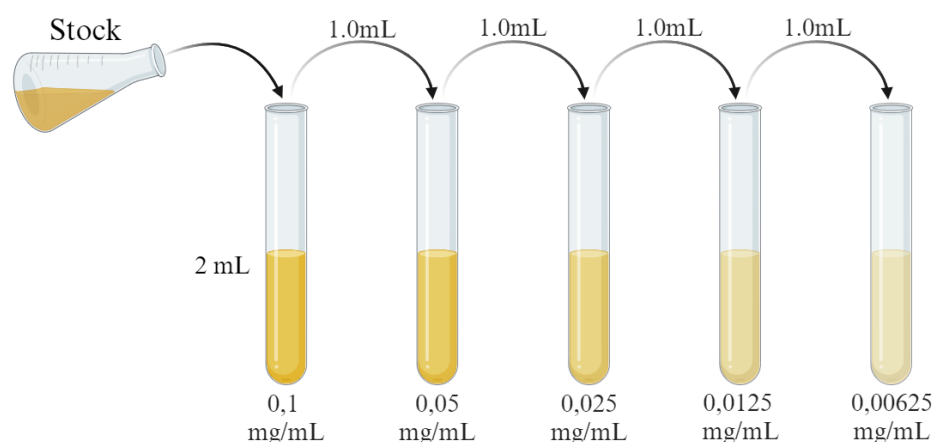
### 3.3 Metode 1

#### 3.3.1 Kjemikalier, reagenser, utstyr og standarder

Ekstraksjonsløsningen som ble benyttet var kloroform:diklormetan (2:1, v:v), og det ble brukt kloroform (22711.324,  $\geq 99,8\%$ , VWR Chemicals) og diklormetan (1.07020.2500,  $\geq 99,5\%$ , Emparta ACS) til å lage løsningen. I tillegg til ekstraksjonsløsningen ble det også brukt Natriumklorid (27810.295, 100,0%, VWR Chemicals) til å lage en 1 M natriumkloridløsning. Løsemiddelblandingen som ble brukt til å løse opp ekstraktene og standardene før HPLC var metanol: MTBE: vann (81:15:4, v:v:v) og kjemikaliene som ble brukt var metanol (20864.320, 99,9%, VWR Chemicals), MTBE (tert-Butyl metyl eter) (1.01845.2500,  $\geq 99,8\%$ , Merck) og avionisert vann. Alle kjemikaliene som ble brukt var av HPLC-kvalitet. Utstyret som ble benyttet var thermomixer (VWR Thermal Shake Lite), sentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804) med rotor A-4-44, nitrogeninndamper (Stuart Sample concentrator SBHCONC/1), 2 mL eppendorfrør, 2 mL engangssprøyter til HPLC, tilhørende sprøytefilter (0,45  $\mu\text{m}$ ) og 1,5 mL brune HPLC-vials med inserts.  $\beta$ -karotenstandarden som ble brukt var en ferdig oppløst standard med konsentrasjon 1 mg/mL. Løsemiddelet og opphavet til standarden er ukjent.  $\alpha$ -tokoferol-standarden ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (CAS-nummer: 10191-41-0,  $\geq 96\%$ ).

### 3.3.2 Tillaging av standarder

Som  $\beta$ -karotenstandard ble det brukt en ferdigblandet løsning med konsentrasjon 1 mg/mL som stockløsning. Ut ifra stockløsningen ble det laget fem standardfortynninger med konsentrasjonene: 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL og 0,00625 mg/mL. Den første konsentrasjonen på 0,1 mg/mL ble laget ved å blande 0,2 mL stockløsning med 1,8 mL metanol:MTBE:vann (81:15:4). De resterende konsentrasjonene ble laget ved 2-fold-seriefortynning av den sterkeste konsentrasjonen på 0,1 mg/mL med metanol:MTBE:vann. Fremgangsmåten for 2-fold-seriefortynningen kan ses i figur 7.



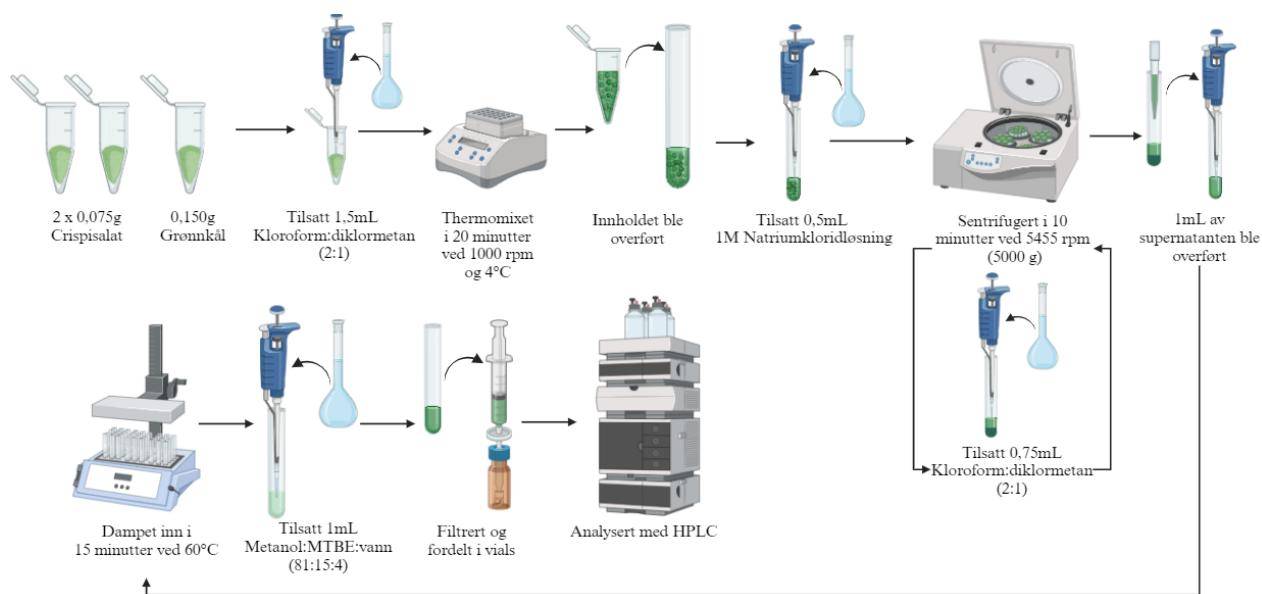
Figur 7: Fremgangsmåten for 2-fold-seriefortynningen (Laget med Biorender).

For  $\alpha$ -tokoferol ble det laget en 10 mL-stockløsning med konsentrasjon 2,53 mg/mL. Denne stockløsningen ble laget ved å blande 25,3 mg av  $\alpha$ -tokoferol og 10 mL metanol:MTBE:vann. For  $\alpha$ -tokoferol skulle standardkonsentrasjonene være de samme som for  $\beta$ -karoten: 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL og 0,00625 mg/mL. For å lage den første konsentrasjonen på 0,1 mg/mL, ble 0,079 mL stockløsning blandet med 1,921 mL metanol:MTBE:vann. De andre standardkonsentrasjonene ble laget ved 2-fold-seriefortynning av den sterkeste konsentrasjonen på 0,1 mg/mL med metanol:MTBE:vann. Alle konsentrasjonene av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol ble videre filtrert gjennom sprøytefilter og overført til brune HPLC-vials med inserts.

### 3.3.3 Gjennomføring

Det ble gjennomført 2 paralleller av crispisalat og 2 paralleller av grønnkål. Prøvemengden for hver parallell var 0,150 g for både crispisalat og grønnkål. Det ble veid opp frysetørket grønnkål i 2 eppendorfrør med 0,150 g i hver. Grunnet stort volum ble mengden crispisalat

fordelt på 4 rør med 0,075 g i hver. Deretter ble 1,5 mL av ekstraksjonsløsningen, kloroform:diklormetan (2:1 v/v) tilsatt rørene med grønnkål og 0,75 mL tilsatt rørene med crispisalat, før de ble satt i thermomixer i 20 minutter (1000 rpm ved 4°C). Etter thermomixing ble innholdet i de 4 eppendorfrørene med crispisalat fordelt på 2 10 mL-reagensrør av glass med kork. Innholdet i eppendorfrørene med grønnkål ble også overført til hvert sitt 10 mL-reagensrør av glass med kork. 1 M natriumkloridløsning ble laget ved å blande 0,5844 g natriumklorid i 10 mL avionisert vann. Så ble alle rørene tilsatt 0,5 mL 1M natriumkloridløsning, før de ble satt til sentrifugering (5455 rpm (5000 g) i 10 minutter). Etter dette ble det tilsatt 0,75 mL av ekstraksjonsløsningen, og rørene ble sentrifugert igjen (5455 rpm (5000g) i 10 minutter). 1 mL av supernatanten ble pipettert over i nye reagensrør av glass, og ekstraksjonsvæsken ble dampet bort under nitrogeninndamper (60°C i 15 minutter). Når prøvene var tørket inn, ble de fryst ned (-20°C) og lagret til de ble analysert med HPLC. Dagen prøvene skulle analyseres med HPLC ble 1 mL metanol:MTBE:vann (81:15:4) tilsatt i prøvene, før prøvene ble filtrert gjennom et sprøytefilter og overført i brune HPLC-vials med inserts. Til slutt ble alle prøvene, standardene og 2 blankprøver med metanol:MTBE:vann plassert i HPLC-instrumentet for analyse. Figur 8 viser den generelle gjennomføringen av metode 1 i form av et flytskjema.



Figur 8: Alle trinnene i metode 1 i form av et flytskjema (Laget med BioRender).

## 3.4 Metode 2

### 3.4.1 Kjemikalier, reagenser, utstyr og standarder

Ekstraksjonsløsningen som ble benyttet var aceton:diklormetan (30:70, v:v) og det ble brukt aceton (20067.320, 100,0%, VWR Chemicals) og diklormetan (1.07020.2500,  $\geq 99,5\%$ , Emparta ACS) til å lage løsningen. Løsemiddelblandingen som ble brukt til å løse opp ekstraktene og standardene før HPLC var metanol: MTBE: vann (81:15:4, v:v:v) og kjemikaliene som ble brukt var metanol (20864.320, 99,9%, VWR Chemicals), MTBE (1.01845.2500,  $\geq 99,8\%$ , Merck) og avionisert vann. Alle kjemikaliene som ble brukt var av HPLC-kvalitet. Utstyret som ble benyttet var vortexmixer (IKA Vibrofix VF1), nitrogeninndamper (Stuart Sample concentrator SBHCONC/1), sentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804) med rotor A-4-44, 2 mL engangssprøyter til HPLC, tilhørende sprøytefilter (0,45  $\mu\text{m}$ ) og brune 1,5 mL HPLC-vials med inserts.  $\beta$ -karoten-standarden som ble brukt ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (CAS-nummer: 7235-40-7,  $\geq 95\%$ ), og  $\alpha$ - tokoferol-standarden ble også kjøpt fra Sigma-Aldrich (CAS-nummer: 10191-41-0,  $\geq 96\%$ ).

### 3.4.2 Tillaging av standarder

For  $\beta$ -karoten-standarden ble det brukt en glassampule som inneholdt 25 mg  $\beta$ -karoten i pulverform. Innholdet ble løst opp i 2 mL metanol:MTBE:vann (81:15:4). Den nye løsningen fikk da en konsentrasjon på 12,5 mg/mL. Fra løsningen på 12,5 mg/mL ble det laget en stockløsning på 2 mL og konsentrasjon 2 mg/mL, som videre ble fortynnet til standardkonsentrasjonene. Stockløsningen ble laget ved å pipettere ut 0,32 mL fra løsningen på 12,5 mg/mL, og blande det med 1,68 mL metanol:MTBE:vann. Resten av løsningen på 12,5 mg/mL ble overført til brune 1,5 mL HPLC-vials og lagt i fryseren ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Standardkonsentrasjonene var 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL og 0,00625 mg/mL. For å lage den første på 0,1 mg/mL ble 0,1 mL av stockløsningen blandet med 1,9 mL metanol:MTBE:vann. Fra den sterkeste konsentrasjonen på 0,1 mg/mL ble det gjort en 2-fold-seriefortynning med metanol:MTBE:vann for å lage de resterende standardkonsentrasjonene.

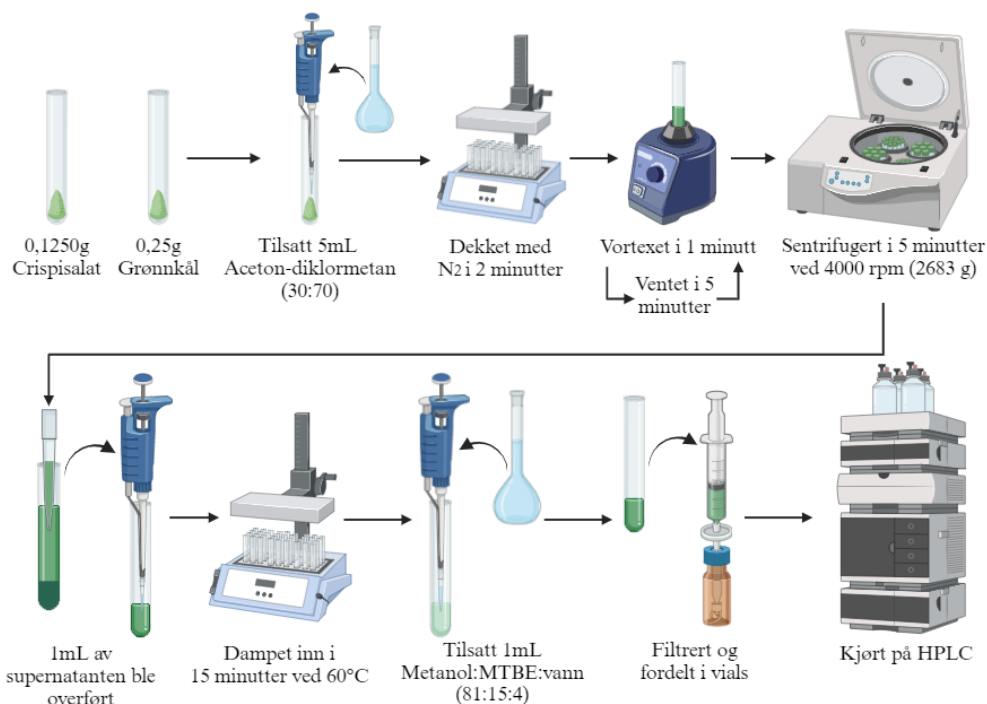
Det ble laget to standardkurver for  $\beta$ -karoten. Tillagingen av den andre standardkurven var helt lik som den første standardkurven, bortsett fra at den ble laget til en høyere konsentrasjon på 0,2 mg/mL. Den høyeste konsentrasjonen på 0,2 mg/mL ble laget ved å pipettere ut 32  $\mu\text{L}$  av standardløsningen med konsentrasjon 12,5 mg/mL, og blande det med 1,968 mL metanol:MTBE:vann. For å forsøke å løse ut  $\beta$ -karoten-standarden bedre, ble den høyeste

konsentrasjonen på 0,2 mg/mL thermomixet i 2 timer (1000 rpm ved 20°C). Videre ble de fem andre standardkonsentrasjonene laget ved 2-fold-seriefortynning fra den sterkeste konsentrasjonen på 0,2 mg/mL med metanol:MTBE:vann.

For  $\alpha$ -tokoferol ble det brukt samme standard som for metode 1. Fremgangsmåten var derfor lik som beskrevet under delkapittel 3.3.2. Alle konsentrasjonene av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol ble videre filtrert gjennom et sprøytefilter og overført til brune HPLC-vials med inserts.

### 3.4.3 Gjennomføring

Det ble testet 3 ulike prøvemengder av frysetørket grønnkål og crispisalat. Hver prøvemengde hadde to paralleller. For grønnkål ble prøvemengdene 0,25 g, 0,50 g og 0,75 g testet, og for crispisalat ble prøvemengdene 0,1250 g, 0,1875 g og 0,2500 g testet. De ulike prøvemengdene ble veid opp i 10 mL-reagensrør av glass med kork. Deretter ble det tilsatt 5 mL aceton:diklormetan (30:70). Prøvene ble plassert under nitrogeninndamperen og dekt med nitrogengass i 2 minutter for å beskytte mot oksidasjon, før de ble vortexet. Alle prøvene ble vortexet i 1 minutt, før de sto i ro på benken i 5 minutter, for så å bli vortexet igjen i 1 minutt til. Etter dette ble prøvene satt til sentrifugering i 5 minutter ved 4000 rpm (2683 g). Når sentrifugeringen var ferdig, ble 1 mL av supernatanten pipettert ut og overført til nye 10 mL-reagensrør. For grønnkålekstraktene ble det pipettert ut ytterligere 1 mL av supernatanten, som ble brukt til å teste 2 ulike inndampingstemperaturer. Ekstraksjonsvæsken ble deretter dampet bort under nitrogeninndamperen. 6 crispisalat- og 6 grønnkålekstrakter sto under nitrogengass i 15 minutter ved 60°C, mens de resterende 6 grønnkålekstraktene sto i 55 minutter ved 50°C. Når prøvene var tørre, ble de pakket inn i aluminiumsfolie og oppbevart i fryser (-20°C) frem til dagen de ble analysert med HPLC. Samme dag som prøvene ble analysert med HPLC, ble ekstraktene tatt opp fra fryseren og tilsatt 1 mL metanol:MTBE:vann. Deretter ble prøvene, i tillegg til 2 blankprøver (metanol: MTBE: vann) filtrert gjennom et sprøytefilter og overført på brune HPLC-vials med inserts. Til slutt ble alle prøvene, standardene og 2 blankprøver plassert i HPLC-instrumentet for analyse. Figur 9 viser den generelle gjennomføringen av metode 2 i form av et flytskjema.



Figur 9: Alle trinnene i metode 2 i form av et flytskjema. Det tar utgangspunkt i den minste prøvemengden for både grønnkål og crispisalat, og 60°C inndampingstemperatur (Laget med BioRender).

### 3.5 Evaluering av ekstraksjonsmetodene

Etter gjennomgang av metode 1 og metode 2 ble det gjort en vurdering av begge ekstraksjonsmetodene. Grunnet tidsrammen og størrelsen på bacheloroppgaven ble det kun gått videre med en av metodene. Valget baserte seg på ulike evalueringskriterier. En av kriteriene var hvilken av metodene som ga høyest mulig utbytte av vitaminene i forhold til Matvaretabellen. Et annet kriterium var bruken av utstyr og antall steg i den praktiske utførelsen. I tillegg ble helseisikoen knyttet til bruken av de ulike kjemikaliene vurdert. På grunnlag av disse evalueringskriteriene ble det kun gått videre med metode 2.



## **3.6 Metode 2, andre forsøk**

### **3.6.1 Kjemikalier, reagenser, utstyr og standarder**

Kjemikalier, reagenser og utstyr var helt likt som første gjennomgang av metode 2, og er derfor som beskrevet under delkapittel 3.4.1.

### **3.6.2 Tillaging av standarder**

For  $\beta$ -karoten ble det ikke laget en ny standardkurve, fordi den nye  $\beta$ -karoten-standardene ikke kom i tide. Planen var derfor å basere resultatene på en tidligere standardkurve fra metode 1.

For  $\alpha$ -tokoferol ble det brukt samme standard som for første gjennomgang av metode 1 og metode 2. Fremgangsmåten er derfor lik som beskrevet i delkapittel 3.3.2, med noen unntak. Det ble laget en standardkurve som baserte seg på lavere konsentrasjoner av  $\alpha$ -tokoferol, enn standardkurvene som ble laget for tidligere analyser. Det ble laget en stockløsning som beskrevet i delkapittel 3.3.2, med en konsentrasjon på 2,66 mg/mL. Den sterkeste konsentrasjonen på 0,05 mg/mL ble laget ved å blande 38  $\mu$ L av stockløsningen med 1,962 mL metanol:MTBE:vann (81:15:4). De resterende standardkonsentrasjonene: 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,00625 mg/mL, 0,003125 mg/mL og 0,0015625 mg/mL ble laget ved 2-fold-seriefortynning av den sterkeste konsentrasjonen 0,05 mg/mL og metanol:MTBE:vann.

### **3.6.3 Gjennomføring**

Det ble gjennomført 5 paralleller av grønnkål og 5 paralleller av crispisalat. For hver parallell av grønnkål ble det veid opp 0,250 g frysetørket materiale og for hver parallell av crispisalat ble det veid opp 0,125 g frysetørket materiale. Resten av utførelsen var lik som beskrevet i delkapittel 3.4.3, men med et par unntak. Prøvene sto stille på benken i 6 minutter og ikke 5, før de ble vortexet på nytt i 1 minutt. Dette grunnet logistikk. Det ble også kun tatt ut 1 mL av supernatanten og ekstraksjonsvæsken ble dampet bort under nitrogeninddamper i 15 minutter ved 60 °C. Ekstraktene ble også oppbevart i kjøleskap (4°C) og ikke fryser frem til dagen de skulle bli analysert med HPLC. Prøvene, 2 blankprøver (metanol:MTBE:vann) og standardkonsentrasjonene av  $\alpha$ -tokoferol ble satt til analyse, men ble ikke analysert grunnet teknisk feil på HPLC-instrumentet.

## 3.7 Deteksjon av $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol

For deteksjon av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol i ekstraktene ble det brukt HPLC. Instrumentet som ble brukt var Agilent 1290 Chromatograph med DAD-detektor. Innstillingene på HPLC-instrumentet var likt for begge metodene som ble testet. Innstillingene baserte seg på en «in-house» metode optimalisert for karotenoider og er brukt tidligere på Akrinn, Kalvskinn (J-K, Jameson, personlig kommunikasjon, 29. april 2024).

### 3.7.1 Kjemikalier og reagenser

Den mobile fasen/ løsningsmiddel A (Metanol: MTBE: vann, (81:15:4)) ble laget ved å blande 810 mL metanol, 150 mL MTBE og 40 mL avionisert vann i en 1 L-målekolbe.

Løsningsmiddel B (10% metanol og 90% MTBE) ble laget ved å blande 100 mL metanol og 900 mL MTBE i en målekolbe som rommet 1 L.

### 3.7.2 HPLC betingelser

En oversikt over HPLC-betingelsene som ble benyttet for alle forsøkene står i tabell 1.

**Tabell 1:** Viser en oversikt over HPLC-betingelsene som ble brukt i forsøkene.

Innstillinger	Beskrivelse
Instrument	Agilent 1100 series Chromatograph
Detektor Nanometer	Agilent 1100 DAD-Detector, måler ved 450nm ( $\beta$ -karoten) og 295nm ( $\alpha$ -tokoferol)
Programvare	ChemStation for LC Systems, Rev. B.04.03 [52]
Kolonne	YMC Pack YMC C30 250x 4,6 mm i.d. S-5 $\mu$ m
Løsning A	81% Metanol, 15% MTBE, 4% vann
Løsning B	10% Metanol, 90% MTBE
Elueringsbetingelser	<ul style="list-style-type: none"><li>100 % løsningsmiddel A (81% methanol, 15% MTBE, 4% vann) og 0 % løsningsmiddel B (10% methanol, 90% MTBE), med en startflyt på 1 mL/minutt.</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fra 0 til 60 minutter: Gradientendring fra 100 % løsningsmiddel A til 33,5 %, og 0 % løsningsmiddel B til 66,5 %, over en periode på 60 minutter.</li> </ul>
Kolonnetemperatur	20°C
Injeksjonsvolum	10 µL
Injeksjonsintervall	60 minutter

### 3.7.3 Identifisering og kvantifisering av $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol

Når alle prøvene var ferdig analysert med HPLC, ble kromatogrammene fra alle prøvene og standardene hentet ut. Retensjonstiden til  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol ble bestemt ved å studere toppene i kromatogrammene til standardkonsentrasjonene. De ulike konsentrasjonene av standardløsningene ble laget ved 2-fold-seriefortynning, og konsentrasjonene var derfor en halvering av hverandre. Denne halveringen var også proporsjonal med arealene og toppene som ble detektert i kromatogrammene til standardkonsentrasjonene. Ved å se på hvilke topper som halverte seg for de ulike konsentrasjonene, ble retensjonstiden til både  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol bestemt. For å identifisere innholdet av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol i selve prøvene ble retensjonstiden til toppene i kromatogrammene sammenlignet med den bestemte retensjonstiden til standardkonsentrasjonene. For å beregne konsentrasjonen av vitaminene ble det laget to ulike standardkurver, en for  $\beta$ -karoten og en for  $\alpha$ -tokoferol. Standardkurvene ble laget i Microsoft Excel, ved å plote inn standardkonsentrasjonene med tilsvarende arealer og lineær regresjon. Konsentrasjonen av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol ble bestemt ved å sammenligne arealene til prøvene ved den bestemte retensjonstiden til hver av vitaminene. Arealene ble plottet inn i standardkurvene, for å identifisere hvilken konsentrasjon arealene tilsvarte. Konsentrasjonene fikk enheten mg/mL.

For å bestemme vitamininnholdet per 100 g ferskt materiale ble det først beregnet tørrstoff % i plantematerialet. Beregningene er beskrevet i vedlegg 2. Deretter ble det brukt formel 1 for bestemmelse av vitamininnhold per 100 g ferskt materiale. Vedlegg 3 viser utledning av formel 1.

mg vitamin pr. 100 g plantemateriale

$$= \frac{\text{vitaminkonsentrasjon} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) * \text{mengde ekstraksjonsvæske (mL)}}{\text{plantemateriale (g)}} * \text{tørrstoff \% (1)}$$

## 4. Resultater

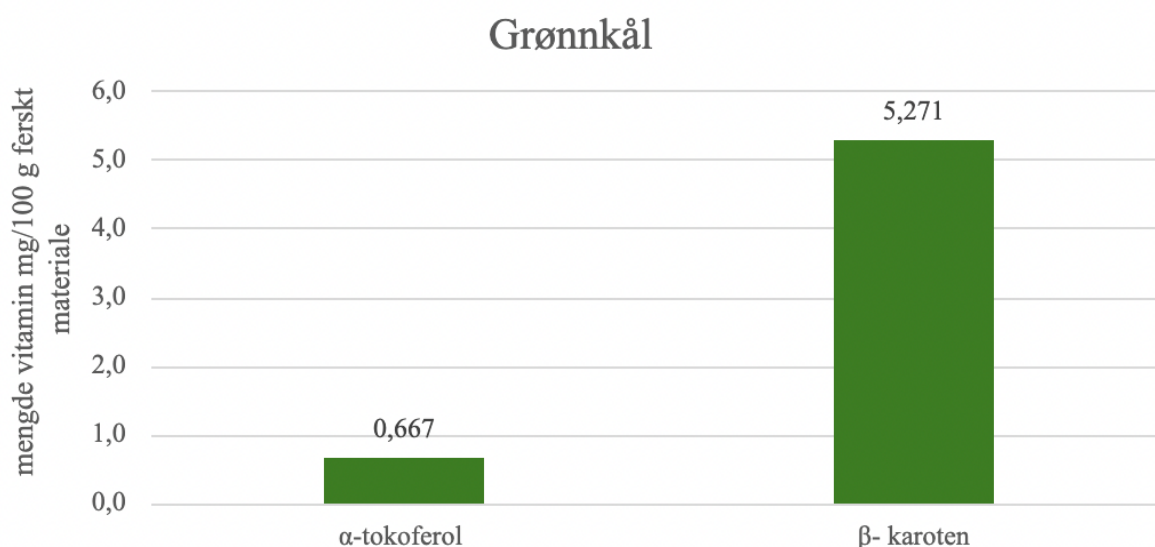
Resultatene i denne oppgaven er kvantifisert vitamininnhold per 100 g ferskt materiale fra de to forskjellige metodene. Standardkurver, arealer og beregnede konsentrasjoner som er brukt for å beregne vitamininnholdet per 100 g ferskt materiale finnes i vedlegg 4 for metode 1, og i vedlegg 5 for metode 2. Verdiene er et gjennomsnitt av 2 paralleller og all rådata finnes i vedlegg 6 for metode 1 og i vedlegg 7 for metode 2.

### 4.1 Resultater fra metode 1 (Ekstraksjon med kloroform:diklormetan)

#### 4.1.1 Mengde $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i grønnkål

Vitamininnholdet av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g fersk grønnkål kan ses i figur 10.

Rådata som figuren baserer seg på kan ses i vedlegg 6. Det ble kvantifisert 0,667 mg  $\alpha$ -tokoferol, og 5,271 mg  $\beta$ -karoten per 100 g fersk grønnkål.

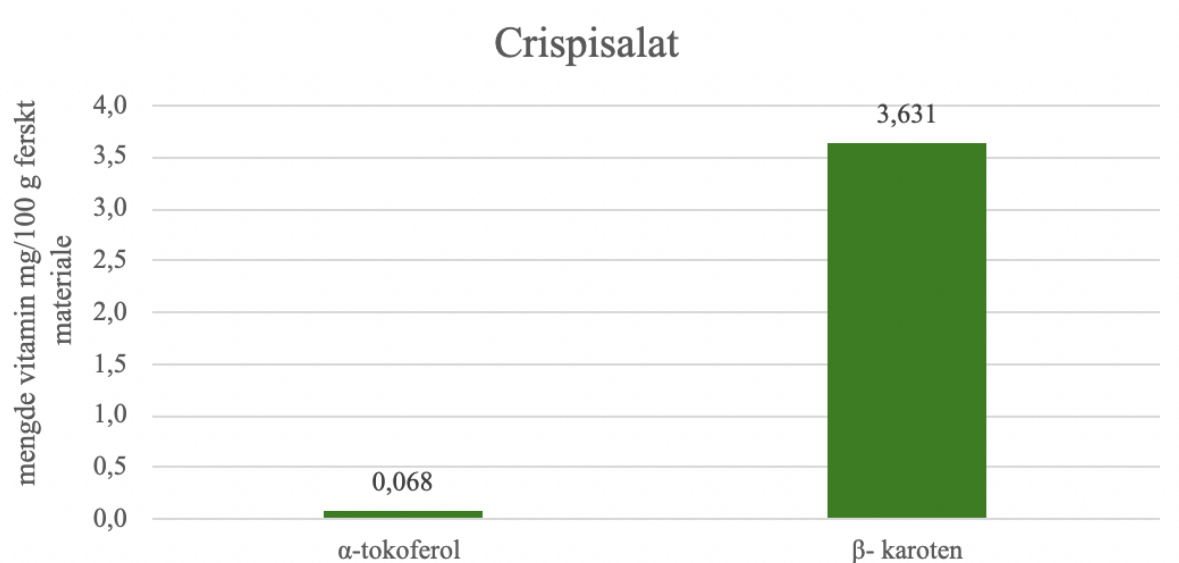


Figur 10: Viser mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i grønnkålprøvene. Enheten er mg/ 100 g fersk grønnkål.

#### 4.1.2 Mengde $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i crispisalat

Vitamininnholdet av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g fersk crispisalat kan ses i figur 11.

Rådata som figuren baserer seg på kan ses i vedlegg 6. Det ble kvantifisert 0,068 mg  $\alpha$ -tokoferol, og 3,631 mg  $\beta$ -karoten per 100 g fersk crispisalat.

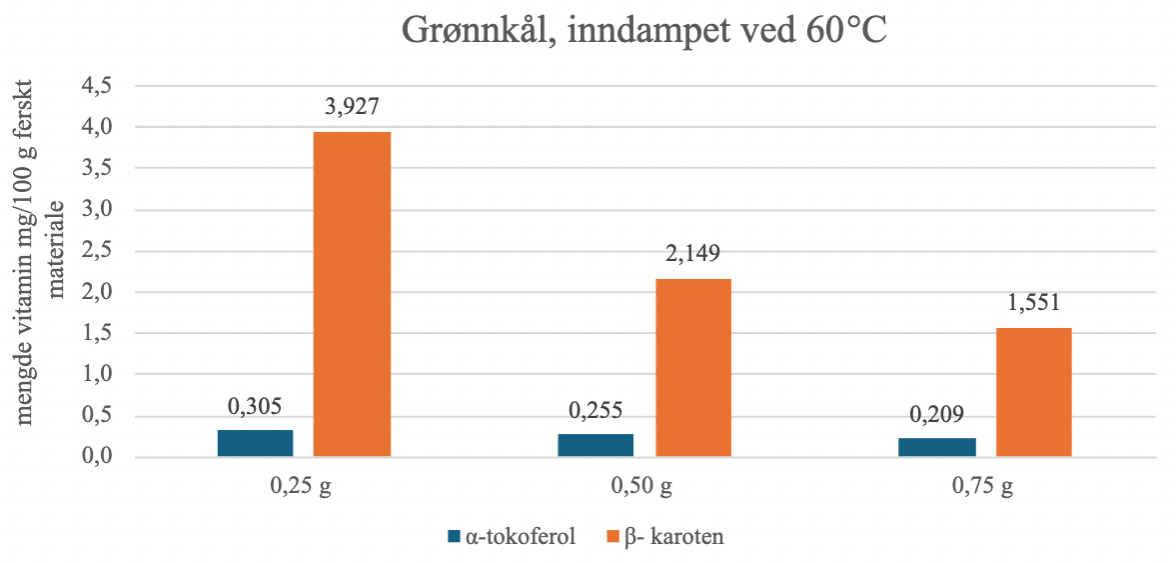


Figur 11: Viser mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i crispisalatprøvene. Enheten er mg/ 100 g fersk crispisalat.

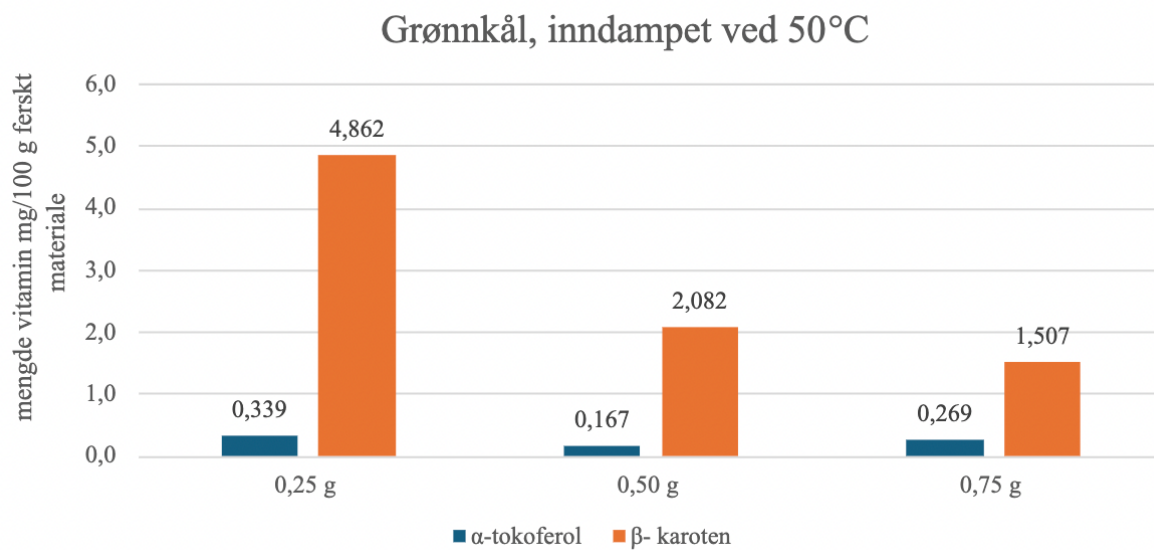
## 4.2 Resultater fra metode 2 (Ekstraksjon med aceton:diklormetan)

### 4.2.1 Mengde $\beta$ - karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i grønnkål

Innholdet av  $\beta$ - karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g fersk grønnkål for de tre prøvemengdene 0,25 g, 0,50 g og 0,75 g kan ses i figur 12 og figur 13. Rådata som figurene baserer seg på kan ses i vedlegg 7. Figur 12 viser prøvene som ble inndampet ved 60°C og figur 13 viser prøvene som ble inndampet ved 50°C. Minst prøvemengde ga høyest utbytte av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g fersk grønnkål, både for prøvene som ble inndampet ved 50°C og ved 60°C. Det vises også at det var noe høyere utbytte av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol med prøvemengden 0,25 g og 50°C som inndampingstemperatur. Mengden kvantifisert  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol var lavere enn mengdene fra metode 1.



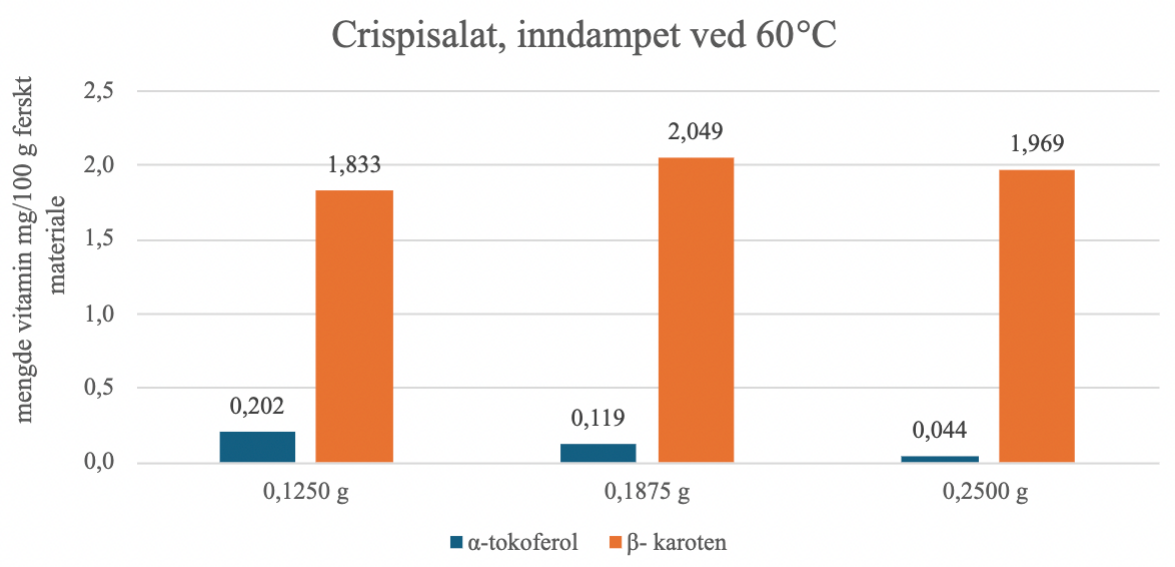
Figur 12: Viser mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i grønnkålprøvene som ble inndampet ved 60 °C. Enheten er mg/ 100 g fersk grønnkål.



Figur 13: Viser mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i grønnkålprøvene som ble inndampet ved 50 °C. Enheten er mg/ 100 g fersk grønnkål.

#### 4.2.2 Mengde $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i crispisalat

Vitamininnholdet av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g fersk crispisalat for de tre prøvemengdene: 0,1250 g, 0,1875 g og 0,2500 g kan ses i figur 14. Rådata som figuren baserer seg på er vist i vedlegg 7. Den minste prøvemengden ga høyest utbytte av  $\alpha$ -tokoferol, men prøvemengden 0,1875 g ga høyest utbytte av  $\beta$ -karoten. Mengden kvantifisert  $\beta$ -karoten var lavere enn mengden  $\beta$ -karoten kvantifisert med metode 1. For  $\alpha$ -tokoferol var utbytte høyere enn mengdene fra metode 1.



Figur 14: Viser mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol kvantifisert i crispisalatprøvene som ble inndampet ved 60 °C. Enheten er mg/ 100 g fersk crispisalat.

## 5. Vurdering

### 5.1 Kvantifisert mengde $\beta$ -karoten

Som tidligere omtalt i delkapittel 2.5.1 er det ifølge Matvaretabellen 5,350 mg  $\beta$ -karoten i 100 g fersk grønnkål og 0,150 mg  $\beta$ -karoten i 100 g fersk isbergsalat. Sammenlignet med disse verdiene, ble det kvantifisert et høyere antall mg  $\beta$ -karoten per 100 g ferskt materiale basert på alle resultatene fra metode 1 og 2. Verdiene kan ses i figur 10-14. Det ble dermed ekstrahert en større mengde  $\beta$ -karoten per 100 g ferskt materiale fra både grønnkålen og crispisalaten enn det teoretiske utbyttet skulle tilsi var mulig. De høye verdiene av  $\beta$ -karoten kan skyldes en rekke mulige årsaker og feilkilder knyttet til både prøvematerialet, sammenligning med andre verdier og standardkurvene.

### **5.1.1 Variasjoner i prøvematerialet**

Vitamininnholdet til vegetabilsk kilder påvirkes av variasjoner i vekstbetingelsene og fordelingen i selve plantevevet slik som nevnt i delkapittel 2.5.1. Blant annet spiller eksponeringen for lys en avgjørende rolle i biosyntesen av  $\beta$ -karoten, da karotenoider er bundet til proteinkomplekser i de indre membranene av kloroplastene til grønt fotosyntetiserende plantevev. Det er dermed ikke urimelig å anta at grønnkålen og crispisalat som ble benyttet i forsøket kan ha hatt et naturlig høyere innhold av  $\beta$ -karoten grunnet god lystilførsel eller andre forhold. Crispisalat ble kjøpt som hele salathoder. Når utvalget av prøvematerialet er basert på et lite antall individuelle planter, kan også naturlige variasjoner mellom individer resultere i større utslag i resultatene. Det gjør at verdiene nødvendigvis ikke er representative og dermed avviker fra kjent teori. Grønnkålen ble derimot kjøpt oppkuttet i pose. Det er dermed ikke mulig å vite hvorvidt innholdet er fra en plante eller fler.

### **5.1.2 Sammenligning med andre verdier**

Det er viktig å ta i betraktning at næringsstoffverdiene i Matvaretabellen ikke tar utgangspunkt i eksakte verdier, men utgjør representative nivåer for innholdet av næringsstoffene (Matvaretabellen, u.å). Det vil si at dataene bygger på ulike kilder, og at  $\beta$ -karoteninnholdet i plantematerialet kan variere mer enn det de utregnede verdiene fra Matvaretabellen kan gi uttrykk for. Det kan dermed argumenteres for at det høye  $\beta$ -karoteninnholdet kvantifisert i grønnkålen i begge metodene nødvendigvis ikke er feil, selv om det avviker fra verdien hentet fra matvaretabellen.

Mengden  $\beta$ -karoten som ble kvantifisert i crispisalat i begge metodene var likevel noe høy sammenlignet med verdiene hentet fra Matvaretabellen, og kan ses i figur 11 og 14. Det kan skyldes matvaren crispisalat blir sammenlignet med. Crispisalat er ikke oppgitt spesifikt i matvaretabellen, så det ble tatt utgangspunkt i verdiene for fersk rå isbergsalat da det er en av artene som inngår i kryssningen av crispisalat. Selv om disse plantene botanisk sett er relativt like, er det ikke utenkelig at det kan være betydelige variasjoner i næringsinnholdet mellom dem. Som tidligere nevnt i delkapittel 2.3 blir det meste av den norske crispisalat dyrket hydroponisk i drivhus, mens isbergsalat oftest dyrkes ute. De gode dyrkingsforholdene som oppnås ved hydroponikk kan ha hatt en innvirkning på biosyntesen av  $\beta$ -karoten, og dermed resultert i en naturlig større mengde mg  $\beta$ -karoten per 100 g ferskt materiale sammenlignet

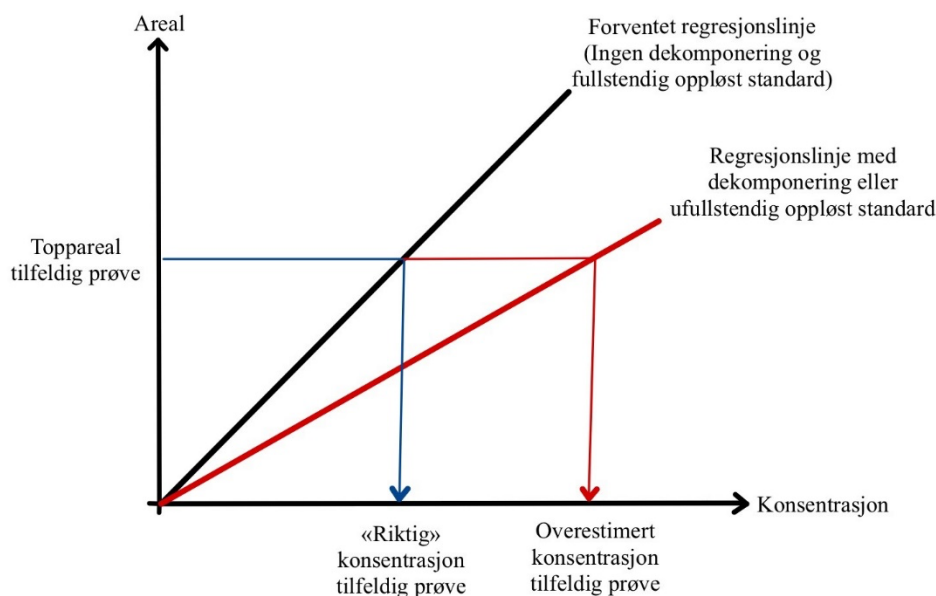


med isbergsalat dyrket ute. Det kan være en mulig forklaring på det høye  $\beta$ -karoteninnholdet detektert i crispisalat.

### 5.1.3 Mulige feil med standardkurvene

Grunnet komplikasjoner med tillaging av  $\beta$ -karotenstandard, er det knyttet en viss usikkerhet til de utregnede konsentrasjonene av  $\beta$ -karoteninnholdet i grønnkål og crispisalat fra metode 2. Verdiene kan ses i figur 12-14. Disse verdiene tar utgangspunkt i standarskurven benyttet ved metode 1 som kan ses i vedlegg 4, da regresjonen til standardkurvene fra metode 2 var betraktelig dårligere. Standardkurvene fra metode 2 kan ses i vedlegg 5. Det ble antatt at dette kunne ses i sammenheng med at  $\beta$ -karotenstandarden nødvendigvis ikke ble ordentlig oppløst ved tillaging. Dersom  $\beta$ -karotenstandarden ikke ble fullstendig oppløst ved tillaging kan det ha resultert i at stockløsningen ikke ble homogen. Den faktiske mengden  $\beta$ -karoten i fortynningsrekken samsvarte derfor nødvendigvis ikke med de utregnende konsentrasjonene, og kan være en mulig årsak til at regresjonslinjen til standardkurven ble unøyaktig. En lavere konsentrasjon av  $\beta$ -karoten i fortynningsrekken resulterer i lavere arealer ved analyse på HPLC-instrumentet. Dersom det var konsekvensen av en ufullstendig oppløst standard, er stigningen på regresjonslinjen til standardkurvene i metode 2 mindre bratt enn det de i realiteten burde ha vært. Det å basere konsentrasjonsberegningene fra metode 2 på disse standardkurvene ble sett på som lite hensiktsmessig. Sammenhengen mellom de detekterte arealene og funksjonen til regresjonslinjen kan ses i figur 15. Det var imidlertid ikke en tilstrekkelig mengde igjen av den ferdigløste standarden benyttet i metode 1 til å forberede en ny standardkurve for metode 2. Standardkurven fra metode 1 ble derfor brukt i konsentrasjonsberegningene for begge metodene. Det er likevel ikke gitt at analysebetingelsene var identiske under kjøringen av prøvene fra metode 2 og  $\beta$ -karotenstandarden fra metode 1. Ved å benytte en standardkurve fra en tidligere utførelse, ble dermed ikke eventuelle maskinelle forskjeller mellom gjennomføringene tatt i betraktning, og det er derfor noe usikkerhet knyttet til arealene brukt i utregningen av  $\beta$ -karoteninnholdet i metode 2. Videre var den ferdig oppløste  $\beta$ -karotenstandarden, som ble benyttet i tillagingen av standardkurven i metode 1, av ukjent opphav. Det var dermed uvisst hvor gammel den var og hva den var løst i. Som en følge av dette var en aktuell problemstilling hvorvidt standardforbindelsene kan ha dekomponert under lagring eller tillaging. En redusert mengde  $\beta$ -karoten i standarden grunnet dekomponering kan ha påvirket arealet til toppene til de ulike konsentrasjonene ved analyse på HPLC-instrumentet. En lavere konsentrasjon av  $\beta$ -

karoten resulterer i lavere arealer. Dersom dette var tilfellet, er stigningen på regresjonslinjen til standardkurven i metode 1 også mindre bratt enn det den i realiteten burde ha vært. Dette kan ha hatt en direkte påvirkning på utregningen av konsentrasjonene til prøvene fra både metode 1 og 2, da de baserer seg på sammenhengen mellom de detekterte arealene og funksjonen til regresjonslinjen. En slakere regresjonslinje kan ha resultert i en overestimering av  $\beta$ -karoteninnholdet i de ulike prøvene, og kan være en mulig forklaring til at verdiene avviker fra matvaretabellen. Denne sammenhengen kan ses i figur 15.



Figur 15: Grafen viser hvordan konsentrasjonen til en tilfeldig prøve påvirkes av sammenhengen mellom regresjonslinjen og arealet som er detektert. En slak regresjonslinje resulterer i en overestimering av konsentrasjonen. Modifisert fra David Weissbrodt (D, Weissbrodt, personlig kommunikasjon, 19. april 2024).

## 5.2 Kvantifisert mengde $\alpha$ -tokoferol

Som nevnt i delkapittel 2.6.2 er  $\alpha$ -tokoferol-innholdet i 100 g fersk grønnkål 5,4 mg ifølge Matvaretabellen. For metode 1 var kvantifisert mengde  $\alpha$ -tokoferol i grønnkål 0,667 mg per 100 g ferskt materiale, mens det for metode 2 ble kvantifisert 3 ulike mengder i området 0,2-0,3 mg. Verdiene kan ses i figur 10, 12 og 13. Verdiene for  $\alpha$ -tokoferol-innholdet i grønnkål var dermed lavere enn verdiene fra Matvaretabellen for begge metodene. For metode 1 var kvantifisert mengde  $\alpha$ -tokoferol i crispisalatprøvene 0,068 mg per 100 g ferskt materiale, se figur 11. Denne mengden er lavere enn 0,2 mg som er verdien fra Matvaretabellen. For crispisalatprøvene fra metode 2 var kvantifisert mengde  $\alpha$ -tokoferol 0,202 mg per 100 g ferskt materiale for den minste prøvemengden. Denne verdien er veldig lik verdien fra Matvaretabellen og kan ses i figur 14. Det er flere mulige årsaker til at mengden  $\alpha$ -tokoferol i

prøvene var så lave, blant annet dekomponering av  $\alpha$ -tokoferol og feilkilder rundt standardkurven som ble brukt til å beregne mengden  $\alpha$ -tokoferol i prøvene.

### **5.2.1 Dekomponering av $\alpha$ -tokoferol**

Som beskrevet i delkapittel 2.6.3 er tokoferoler svært ustabile, og oksideres raskt ved tilgang til oksygen. De er også spesielt følsomme for lys, varme, og frysing. Under selve ekstraksjonen og på laboratoriet ble det tatt hensyn til dette, så godt det lot seg gjøre, men det er nok fortsatt noe som har oksidert under prosessen. Det frysetørkede pulveret lå flere uker i fryseren før alle ekstraksjonsmetodene var ferdig gjennomført, i tillegg til at ekstraktene lå et par uker i fryseren før de ble analysert med HPLC. Vitamin E skiller seg fra andre vitaminer ved at de er svært følsomme for frysing. Det er uvisst hvor mye som kan ha oksidert under prosessen, men det antas at det lave  $\alpha$ -tokoferol-innholdet i prøvene skyldes lang oppbevaringstid i fryseren. Ved forsøk 2 av metode 2 ble ekstraktene lagt i kjøleskap frem til de skulle bli analysert med HPLC, og ikke fryser. Dette ble gjort for å se om oppbevaringstemperaturen hadde innvirkning på dekomponeringen av  $\alpha$ -tokoferol. Det ble imidlertid ikke funnet en sammenheng her siden ekstraktene ikke ble analysert med HPLC.

Det kan vurderes hvorvidt noe av mengden  $\alpha$ -tokoferol kan ha dekomponert når prøvene sto på HPLC-instrumentet, og ventet på å bli analysert. Hver prøve tok 1 time å analysere så den siste prøven sto på instrumentet i nærmere 24 timer før den ble analysert. Dette anses likevel ikke som en mulig årsak for det lave innholdet av  $\alpha$ -tokoferol, fordi arealene som ble detektert for de siste prøvene ikke var lavere enn de første.

### **5.2.2 Standardkurver basert på for høye konsentrasjoner**

Det bør også nevnes at standardkurvene for  $\alpha$ -tokoferol, baserte seg på høyere konsentrasjoner enn det som ble identifisert i prøvene. Hadde standardkurven basert seg på lavere konsentrasjoner kunne regresjonslinjen sett noe annerledes ut. Hvor ulik standardkurven hadde sett ut, og hvor stor påvirkning det hadde hatt på kvantifisert mengde  $\alpha$ -tokoferol er uvisst. Som beskrevet under materialer og metode i delkapittel 3.6.2 ble det laget klart en ny standardkurve med lavere konsentrasjoner, men denne ble ikke analysert da det var en teknisk feil på HPLC-instrumentet og en ny gjennomgang ikke ville latt seg gjennomføre innenfor tidsrammen for oppgaven.

### 5.3 Vurdering av ekstraksjonsmetodene

Som tidligere beskrevet i delkapittel 3.5 ble det etter den praktiske gjennomføringen foretatt en vurdering og sammenlign av begge ekstraksjonsmetodene opp mot hverandre. Basert utelukkende på resultatene i figur 10-14 fra de to metodene var utbyttet ganske likt. Under vurderingen av de to ekstraksjonsmetodene var det derfor andre aspekter som utbytte, utstyr, antall steg i utførelsen og kjemikalier som ble vurdert.

Metode 2 var en kortere metode med færre steg, noe som gjorde gjennomføringen enklere. Metode 1 skilte seg fra metode 2 ved at det ble brukt thermomixer, prøvene ble sentrifugert i 2 omganger, i tillegg til at det ble tilsatt natriumklorid-løsning. Thermomixeren som ble brukt hadde plass til 2-mL eppendorfrør, som var for små til å romme prøvemengden på 0,150 g crispisalat i tillegg til ekstraksjonsvæsken. Derfor måtte prøvemengden fordeles i 2 eppendorfrør under themomixingen, for så og blandes i et reagensrør etter dette trinnet. Dette ble ansett som tungvint og upraktisk. Det ble også brukt kloroform i ekstraksjonsløsningen i metode 1, som vurderes som mer helseskadelig enn aceton som ble brukt i metode 2.

For metode 2 var det også et større vurderingsgrunnlag fordi det ble testet både 2 forskjellige inndampingstemperaturer og 3 forskjellige prøvemengder. For metode 1 ble det kun testet for 1 prøvemengde og ved 1 inndampingstemperatur. For metode 2 ble det testet en inndampingstemperatur på både 50°C og 60°C. Resultatene viser at utbyttet var ganske likt for de to temperaturene, men med tanke på utførelse vurderes 60°C som den mest effektive temperaturen da inndampingen tok betraktelig kortere tid. Det ble også testet 3 ulike prøvemengder, der resultatene viser at minst prøvemengde ga størst utbytte for både grønnkål og crispisalat. Det kan ses figur 12-14. På grunnlag av alle disse aspektene ble det konkludert med at metode 2 var bedre enn metode 1, og det ble bestemt å gjenta metode 2 med kun 0,25 g frysetørket grønnkål og 0,125 g frysetørket crispisalat, der prøvene ble inndampet ved 60°C.

## 6. Videre arbeid

Arbeidet i forbindelse med denne bacheloroppgaven er utført innenfor en gitt tidsramme, og det har satt begrensninger for den praktiske gjennomføringen av forsøkene. Det er derfor et betydelig forbedringspotensial knyttet til videreutviklingen av metodikken ved en eventuell videreføring av arbeidet. Blant annet står faktorer som antall paralleller og gjennomganger av forsøkene sentralt. For framtidig arbeid vil det være hensiktsmessig å gjennomføre de ulike ekstraksjonsmetodene flere ganger og med flere paralleller. Dette sikrer et bredere datasett å basere resultatene på, og avdekker hvorvidt de er reproduserbare. Det bidrar også til å begrense innvirkningen av tilfeldige variasjoner på resultatene. Med et større datasett vil det også kunne være mulig å observere eventuelle trender eller mønstre i større grad, enn det ble gjort i denne oppgaven. Det ble heller ikke utført noen form for lagringsforsøk for å undersøke stabiliteten til de ulike vitaminene under oppbevaring. En mulig løsning er å utføre hele forsøket, både ekstraksjonen og deteksjonen, på samme dag for å se om det har betydelig innvirkning på resultatene. Ved å teste og dokumentere for ekstraksjon og deteksjon på ulike dager kunne det vært mulig å kartlegge stabiliteten til vitaminene. Dette kan være informasjon det er hensiktsmessig å ta med i beregningene av konsentrasjonen til de ulike vitaminene senere.

I denne oppgaven ble blant annet crispisalat benyttet som prøvemateriale. Foreløpig foreligger det lite forskning på nøyaktig dette plantematerialet i litteraturen, noe som gjør det utfordrende å anvende eksisterende referanseverdier. Det kan derfor være hensiktsmessig å benytte et annet plantematerialet med mer etablerte verdier av  $\alpha$ -tokoferol- og  $\beta$ -karoteninnhold, slik at fremtidige funn har et sterkere sammenligningsgrunnlag med andre verdier. For enkelhets skyld var innstillingene på HPLC-instrumentet de samme for begge ekstraksjonsmetodene. Det er i utgangspunktet analysebetingelser som først og fremst er tilpasset deteksjon og identifisering av karotenoider, og ikke vitamin E. Det kan derfor være av interesse å tilpasse HPLC-innstillingene mer til deteksjon av vitamin E for å se om det har betydelig innvirkning på arealene til toppene som blir detektert i kromatogrammene.

## 7. Konklusjon

Oppgavens hovedmål var å etablere en god “in-house” metode for ekstraksjon av vitamin A (i form av  $\beta$ -karoten) og vitamin E (i form av  $\alpha$ -tokoferol) i plantemateriale som grønnkål og crispisalat. Det ble sammenlignet to ekstraksjonsmetoder: metode 1 (ekstraksjon med kloroform:diklormetan). metode 2 (ekstraksjon med aceton:diklormetan). Kun basert på mengde vitamin kvantifisert i prøvene, ga metode 1 høyest utbytte av  $\alpha$ -tokoferol og  $\beta$ -karoten i grønnkålen med henholdsvis 0,667 mg og 5,271 mg per 100 g ferskt materiale. For crispisalaten var utbyttet av  $\alpha$ -tokoferol høyest i 0,1250 g prøvemateriale med 0,202 mg per 100 g ferskt materiale i metode 2, mens metode 1 ga høyest utbytte av  $\beta$ -karoten med 3,631 mg per 100 g ferskt materiale. Variasjonene mellom resultatene fra hver metode var derimot ikke veldig store, så det var vanskelig å konkludere med at den ene metoden var betydelig bedre enn den andre basert utelukkende på utbyttet. Likevel ble det konkludert med å gjenta metode 2. Konklusjonen ble basert på andre evalueringskriterier av metodene som bruk av utstyr, antall steg i prosessen og helserisikoen knyttet til kjemikaliene. På grunn av manglende  $\beta$ -karoten-standard og teknisk feil på HPLC-instrumentet, ble det ikke tid til å analysere de nye ekstraktene innenfor oppgavens tidsramme. Det er derfor vanskelig å konkludere med hvorvidt metode 2 var en god metode for ekstraksjon av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol i grønnkål og crispisalat. For å ha et bedre vurderingsgrunnlag trengs det videre utprøving og testing av metodene.

## 8. Referanser

- Ball, G., F.M. (2006). *Vitamins in Foods - Analysis, Bioavailability, and Stability*. Taylor & Francis Group.
- Bama. (u.å.a). Grønnkål. <https://www.bama.no/ravarer/gronnsaker/kal/gronnkal/>
- Bama. (u.å.b). Crispisalat. <https://www.bama.no/gartner/produkter/salater/crispisalat/>
- Baslam, M., Garmendia, I. & Goicoechea, N. (2011). Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) Improved Growth and Nutritional Quality of Greenhouse-Grown Lettuce. <https://doi.org/10.1021/jf200501c>
- Bhardwaj, S. K., Dwivedi, K. & Agarwal, D. D. (2015). A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. [https://www.researchgate.net/profile/Dr-Santosh-Bhardwaj/publication/284717827\\_A\\_Review\\_HPLC\\_Method\\_Development\\_and\\_Validation/links/569cfff508ae03384dd03f82/A-Review-HPLC-Method-Development-and-Validation.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Dr-Santosh-Bhardwaj/publication/284717827_A_Review_HPLC_Method_Development_and_Validation/links/569cfff508ae03384dd03f82/A-Review-HPLC-Method-Development-and-Validation.pdf)
- Blomhoff, R., Andersen, R., Arnesen, E. K., Christensen, J. J., Eneroth, H., Erkkola, M., Gudaviciene, I., Halldórsson, Þ. I., Høyer-Lund, A., Lemming, E. W., Meltzer, H. M., Pitsi, T., Schwab, U., Siksna, I., Þórsdóttir, I. & Trolle, E. (2023). *Nordic Nutrition Recommendations 2023: Integrating Environmental Aspects*. Nordisk ministerråd.
- Booth, S. L., Johns, T. & Kuhnlein, H. V. (1992). Natural food sources of vitamin A and provitamin A. <https://doi.org/https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/156482659201400115>
- Burri, B. J. (2013). Cleavage to Vitamin A. I *ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/beta-ionone>
- Cole, L. & Kramer, P. R. (2016). Vitamins and Minerals. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803699-0.00037-2>
- Combs, G., F., Jr. . (2008). *The Vitamins - Fundamental Aspects in Nutrition and Health* (3. utg.). Elsevier Inc.
- Ecolink. (2021). *The Process of Liquid -Solid Extraction*. <https://ecolink.com/info/the-process-of-liquid-solid-extraction/>
- Egeland, E. S. (2023). HPLC (høypresisjonsvæskeskromatografi). I *Store Norske Leksikon*. [https://snl.no/HPLC\\_-\\_h%C3%B8ypresisjonsv%C3%A6skeskromatografi](https://snl.no/HPLC_-_h%C3%B8ypresisjonsv%C3%A6skeskromatografi)
- Eitenmiller, R. R., Ye, L. & W. O. Landen, J. (2007). *Vitamin analyses for the Health and food sciences* (2. utg.). CRC-press.
- Gamna, F. & Spriano, S. (2021). Vitamin E: A Review of Its Application and Methods of Detection When Combined with Implant Biomaterials. <https://doi.org/10.3390/ma14133691>
- Grøtta, M. (2020). *Grønnkål-lettdyrket sikringskost*. <https://www.nlr.no/fagartikler/gronnsaker/midt/gronnkal-lettdyrket-sikringskost>
- Gupta, P., Sreelakshmi, Y. & Sharma, R. (2015). A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0051-0>
- Hoidal, N. (2022). *Small-scale hydroponics*. <https://extension.umn.edu/how/small-scale-hydroponics#plant-selection-2645210>
- Kannan, M., Elavarasan, G., Balamurugan, A., Dhanusiya, B. & Freedom, D. (2022). Hydroponic farming- A state of art for the future agriculture. 68, 2163-2166. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.08.416>
- Khan, S., Purohit, A. & Vadsaria, N. (2021). Hydroponics: current and future state of the art in farming. 1515–1538. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1860217>

- Knoop, M. C. (2019). *Tipburn in lettuce (Lactuca Sativa L. "Frillice") – Identifying climate factors that induce tipburn and cultivation methods that mitigate tipburn in controlled environment*. [NMBU]. <https://veksthus.nlr.no/media/userphotos/Master-thesis-Tipburn-M.-Knoop.pdf>
- Machmudah, S. & Goto, M. (2013). Methods for Extraction and Analysis of Carotenoids. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_145](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_145)
- Maitra, S., Gaikwad, D. J. & Shankar, T. (2020). Hydroponics Cultivation of Crops. In: Protected Cultivation and Smart Agriculture. 279- 287. [https://www.researchgate.net/publication/370210875\\_Artificial\\_Media\\_for\\_Soilless\\_Cultivation](https://www.researchgate.net/publication/370210875_Artificial_Media_for_Soilless_Cultivation)
- Mattilsynet. (2023a). Grønncål, rå. I *Matvaretabellen*. <https://www.matvaretabellen.no/gronncal-ra/#vitaminer>
- Mattilsynet. (2023b). Isbergsalat, issalat, rå. I *Matvaretabellen*. <https://www.matvaretabellen.no/isbergsalat-issalat-ra/#vitaminer>
- Mattilsynet. (u.å). Om dataene i Matvaretabellen. I *Mattilsynet.no*. <https://www.mattilsynet.no/mat-og-drikke/matvaretabellen/om-dataene>
- NTNU. (2018). HPLC. I *MedTekipedia*. <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/HPLC>
- Pedersen, J., I., Müller, H., Hjartåker, A. & Anderssen, S., A. (2013). *Grunnleggende Ernæringslære* (2. utg.). Gyldendal.
- Rocio, Q.-U., Claudia, Stange. (2021). Carotenoid Biosynthesis and Plastid Development in Plants: The Role of Light. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/IJMS22031184>
- Shukla, S. (2011). Freeze drying process: a review. 2(12). <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=d282c74d09f5e6f0c007eb8cb6239e4f960358d3>
- SNL. (2023a). Grønncål. I *Store Norske Leksikon*. <https://snl.no/gronncal>
- SNL. (2023b). Salat. I *Store Norske Leksikon*. <https://snl.no/salat>
- Språkrådet. (u.å). Supernatant. I <https://termwiki.sprakradet.no/wiki/Supernatant>
- UIO. (2024). Karotenoider. I *Univeritetet i Oslo*. <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/k/karotenoid.html>
- Wahlgren, M. B. (2024). *Fettløslige vitaminer* [Lysarkpresentasjon]. ntnu.blackboard.com.
- Zhang, Y., Zhou, W.-e., Yan, J.-q., Liu, M., Zhou, Y., Shen, X., Ma, Y.-l., Feng, X.-s., Yang, J. & Li, G.-h. (2018). A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamin to the Human Body: An Update from 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules23061484>
- Zaaboul, F. & Liu, Y. (2022). Vitamin E in foodstuff: Nutritional, analytical, and food technology aspects. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12924>



## OPPGAVE 2: KVANTITATIV ANALYSE AV FETTLØSELIGE VITAMINER I VITAMINTABLETT

### Kort om oppgaven

Fettløselige vitaminer, vitamin A (retinol) og vitamin E (tocopherol), i vitamintabletter skal bestemmes kvantitativt. For prøveopparbeidelse benyttes fast stoff-væske ekstraksjon med aceton-diklormetan. Vitaminene separeres ved HPLC og identifiseres ved hjelp av retensjonstider. Intern standard benyttes for kvantifisering.

### Litt om vitamin A og E

Hos mennesker er Vitamin A nødvendig for cellevekst og celledifferensiering og for frisk hud. Vitamin A forebygger også nattblindhet. Viktige A-vitaminkilder er grønne og gule grønnsaker, frukt, egg, smør og ost. Store mengder A-vitamin er giftig for mennesker og de fleste pattedyr, unntatt isbjørn. Vitamin E er en viktig antioksidant som hindrer oksidasjon av umettede fettsyrer og beskyttende vitaminer som vitamin A. Vitamin E er nødvendig for blodets koagulasjonsevne. Vitamin E finner en blant annet i kjøtt, egg og hele korn.

### Apparatur:

HPLC med programvare

Omvendt-fase C-18 kolonne, 25 cm · 4,6 mm, 5 µ partikkeldiameter

20 µL loop-injektor

### Reagenser og utstyr:

Stamløsninger:

- Vitamin A (retinol) 500 µg/mL etanol
- Vitamin A acetat (retinol acetat) 500 µg/mL etanol
- Vitamin E (α-tocopherol) 1000 µg/mL etanol
- Vitamin E acetat (α-tocopherol acetat) 1000 µg/mL etanol

Internstandardblanding (IS):

- Retinol, ca. 220 mg/L etanol, og α-tocopherol, ca. 2200 mg/L etanol. Se påskrift på flaske for nøyaktige verdier.

## Vedlegg 1: Laboratorieøvelse som metode 1 er basert på (side 2 av 4)

Prøve:

- Multivitamintabletter (inneholder vitamin A acetat og vitamin E acetat)

96% etanol **uten** MIK/MEK

Metanol

Aceton

Diklormetan

N<sub>2</sub>(g)

10 mL reagensrør av glass

10 mL målesylinder

Korker til reagensrør

Målekolber

Automatpipetter, 0 – 1 mL og 1 – 5 ml

Fullpipetter

Brune flasker, 50 mL

Engangssprøyter, 1 mL

Sprøytefilter, regenerert cellulose, 13 mm, 0,45 µm porestørrelse

Aluminiumsfolie

Vortexmikser

Sentrifuge

### Utførelse

Lag tre standarder med kjente konsentrasjoner av vitamin A (intern standard), vitamin E (intern standard), vitamin A acetat og vitamin E acetat. Hver standard skal inneholde alle disse fire komponentene løst i etanol. Vitamin A og vitamin E benyttes som internstandard i analysen.

Konsentrasjonsområdene for disse standardene blir litt usikkert da konsentrasjonene av vitamintablettene variere ganske mye. Imidlertid anbefales standarder i følgende konsentrasjonsområder:

Vitamin A og vitamin A acetat: 5-100 µg/mL etanol

Vitamin E og vitamin E acetat: 50-500 µg/mL etanol

Lag standardene på 50 mL målekolber. Disse lages fra stamløsninger med vitamin A og vitamin A acetat: 500 µg/mL etanol og vitamin E og vitamin E acetat: 1000 µg/mL.

## Vedlegg 1: Laboratorieøvelse som metode 1 er basert på (side 3 av 4)

### **HUSK: Vitaminene tåler verken lys, varme eller luft (oksygen)!**

Dekk derfor målekolbene med aluminiumsfolie og unngå oppvarming. Overfør standardene til brune flasker og fjern luft fra løsningene ved å boble gjennom med nitrogengass. Etanolen kan gjerne bobles gjennom med nitrogen før standardene fortynnes.

Alle løsninger skal oppbevares mørkt under et «teppe» av nitrogengass.

### **Analysebetingelser:**

Mobilfase: 99% metanol i 1% ionebyttet vann

Stasjonærfase: C-18 kolonne, 25 cm · 4,6 mm, 5 µ partikkeldiameter

Temperatur: 25°C (evt. 40°C)

Flow: 2 mL/min

Deteksjon: UV, 290 nm

### **Prøveopparbeidelse (benytt avtrekkskap):**

Finknus to multivitamin-tabletter. Vei av ca. 0,600 gram i et 10 mL ekstraksjonsglass (reagensrør av glass), tilsett 1,00 mL internstandardblanding (retinol, ca. 220 mg/L etanol, og  $\alpha$ -tocopherol, ca. 2200 mg/L etanol) og 4,00 mL ekstraksjons-middel, aceton-diklormetan (volumblanding 30:70). Dekk så løsningen med nitrogengass for å beskytte mot oksidasjon. Sett på kork kledd med aluminiumsfolie og rist 1 minutt på vortexmikser, vent 5 minutter og rist i 1 minutt. Sentrifuger så blandingen ved 4000 rpm i 5 minutter. 1,00 mL av det øverste laget overføres til et nytt 10 mL reagensglass (hvis det er mulig, overfør også 1,00 ml til et annet 10 mL reagensglass).

Ekstraksjonsmidlet dampes bort med nitrogengass. Benytt vannbad om nødvendig, **obs!** ikke for varmt. Den inndampede prøven løses i 1,00 mL etanol **uten** MIK/MEK (her kan det være lurt å bruke vortexmikser). Filtrer prøven gjennom et sprøytefilter (0,45 µm) samtidig som den injiseres på HPLC-kolonna. Injeksjonsloopen tar 20 µL og det bør injiseres minst 80 µL prøve for å få skylt gjennom loopen. Prøven bør analyseres to ganger om det er tid.

## Vedlegg 1: Laboratorieøvelse som metode 1 er basert på (side 4 av 4)

### **Bruk av HPLC:**

Her forutsetter vi at dere husker litt fra labkurset i vår og har derfor ikke laget egen oppstartprosedyre. Ta utgangspunkt i oppstartprosedyren for koffeinoppgaven og gjør nødvendige tilpasninger. Metoder dere benytter og hvor dere gjør endringer, må lagres under nye navn, ev. velg å ikke lagre endringer, når dere får spørsmål om lagring.

Først må aktuelle slanger (vann og metanol) flushes for å fjerne ev. luftbobler.

Deretter lages metoden dere skal bruke. Ettersom kolonnen er fylt med 100 % metanol mens mobilfasesammensetningen som benyttes i analysen er 99% metanol og 1 % ionebyttet vann, er det ikke nødvendig å kjøre egen oppstart-/avslutningsprosedyre.

### **Kalibrering:**

Alle standardblandingene analyseres, om tiden tillater det, to ganger i mest mulig tilfeldig rekkefølge.

### **Prøven:**

Prøvens innhold av vitamin A - og E-acetat bestemmes på grunnlag av standardkurvene. Anta at alt acetat hydrolyseres fullstendig til vitamin og bestem innhold av vitamin A og vitamin E i prøven.

Sammenlign med det som står på innholdsfortegnelsen. Bestem ca. masse av en tablett ved å ta gjennomsnittsmassen av for eksempel 10 tabletter.

### **Rapporten**

Det er unødvendig å ha med generell teori om HPLC, men kvantitativ analyse med internstandard og prøveopparbeidelse hører med her. Rapporten skal i tillegg til standardkurver med internstandard både for høyde og areal med hensyn på konsentrasjon (se forelesningsnotater), ha med beregning av vitamininnholdet i prøven og vurdering av prøveresultatet.

## Vedlegg 2: Beregning av tørrstoff % i crispisalat og grønnkål (side 1 av 1)

Våtvekten til salaten og grønnkålen er vekten før frysetørrking og tørrvekten er vekten etter frysetørrking. For å beregne vanntapet ble det brukt formel 1.

$$\text{Vanntap (g)} = \text{våtvekt} - \text{tørrvekt} \quad (1)$$

For å beregne vanntap i % ble det brukt formel 2.

$$\text{Vanntap \%} = \frac{\text{Vanntap (g)}}{\text{våtvekt}} * 100 \quad (2)$$

For å beregne tørrstoff i % ble det brukt formel 3.

$$\text{Tørrstoff \%} = 100\% - \text{Vanntap} \quad (3)$$

Prøvematerialet ble frysetørket i 4 batcher. Tabell 1 viser våtvekt, tørrvekt, vanntap, vanntap % og tørrstoff % for de 4 batchene samt gjennomsnittet av batchene av grønnkål. Tabell 2 viser det samme bare for crispisalat.

**Tabell 1:** Våtvekt, tørrvekt, vanntap, vanntap %, tørrstoff % og gjennomsnitt for de 4 batchene av frysetørrking av grønnkål.

Grønnkål	Våtvekt (g)	Tørrvekt (g)	Vanntap (g)	Vanninnhold i våtvekt (%)	Tørrstoff (%)
1. runde	150,535	23,759	126,776	84,22	15,78
2. runde	146,375	19,556	126,819	86,64	13,36
3. runde	148,157	18,477	129,680	87,53	12,47
4. runde	150,069	24,441	125,628	83,71	16,29
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>148,784</b>	<b>21,55825</b>	<b>127,22575</b>	<b>85,525</b>	<b>14,48</b>

**Tabell 2:** Våtvekt, tørrvekt, vanntap, vanntap %, tørrstoff % og gjennomsnitt for de 4 batchene av frysetørrking av crispisalat.

Crispisalat	Våtvekt (g)	Tørrvekt (g)	Vanntap (g)	Vanninnhold i våtvekt (%)	Tørrstoff (%)
1. runde	195,291	9,130	186,161	95,32	4,68
2. runde	162,474	7,762	154,712	95,22	4,78
3. runde	173,636	9,194	164,442	94,71	5,29
4. runde	173,855	8,689	165,166	95,00	5,00
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>176,314</b>	<b>8,69375</b>	<b>167,62025</b>	<b>95,0625</b>	<b>4,94</b>

### Vedlegg 3: Utleddning av formel 1: bestemmelse av mengde vitamin per 100g (side 1 av 1)

For å bestemme mengde vitamin pr 100 g ferskt materiale ble det først beregnet mengde vitamin i volum ekstraksjonsvæske som tilsvarer den beregnede konsentrasjonen av vitaminet (mg/mL). Dette ble gjort ved bruk av formel 1. For begge ekstraksjonsmetodene var volum ekstraksjonsvæske lik 1 mL.

$$\text{mengde vitamin} = \text{vitaminkonsentrasjon} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * \text{volum ekstraksjonsvæske (mL)} \quad (1)$$

Deretter ble det beregnet mengde vitamin per gram frysetørket pulver. Dette ble gjort ved bruk av formel 2. Prøvemengdene for ekstraksjonsmetode 1 var 0,25, 0,50 og 0,75 g for grønnkål og 0,1250, 0,1875 og 0,2500 g for crispisalat. For ekstraksjonsmetode 2 var prøvemengden for både grønnkål og crispisalat 0,150 g.

$$\frac{\text{mengde vitamin (mg)}}{\text{prøvemengde (g)}} \quad (2)$$

Det antas at alt vitamin er i tørrstoffet, så for å beregne mengde vitamin per 100 g ferskt materiale ganges det med % tørrstoff. Formelen blir dermed lik formel 3.

$$\frac{\text{vitaminkonsentrasjon} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * \text{volum ekstraksjonsvæske (mL)}}{\text{prøvemengde (g)}} * \text{tørrstoff \%} \quad (3)$$

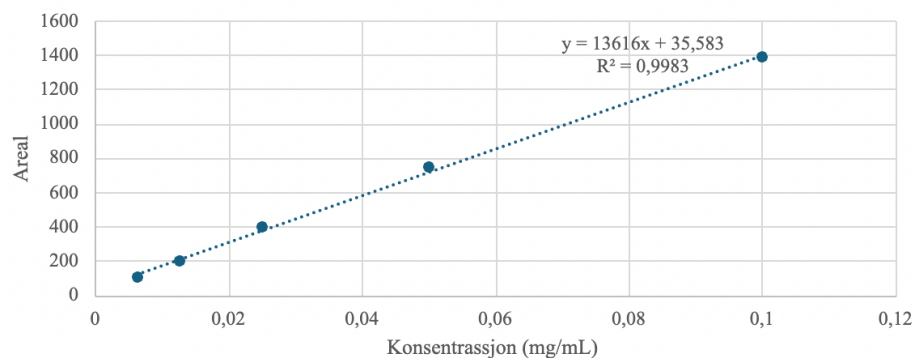
#### Vedlegg 4: Standardkurve for $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol for metode 1 (side 1 av 1)

I figur 1 er det vist konsentrasjoner, tilhørende detekterte arealer og standardkurvene for  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol som ble analysert med HPLC sammen med ekstraktene fra metode 1.

##### $\beta$ -karoten

Konsentrasjon (mg/mL)	Areal
0,1	1381
0,05	746
0,025	392
0,0125	193
0,00625	104

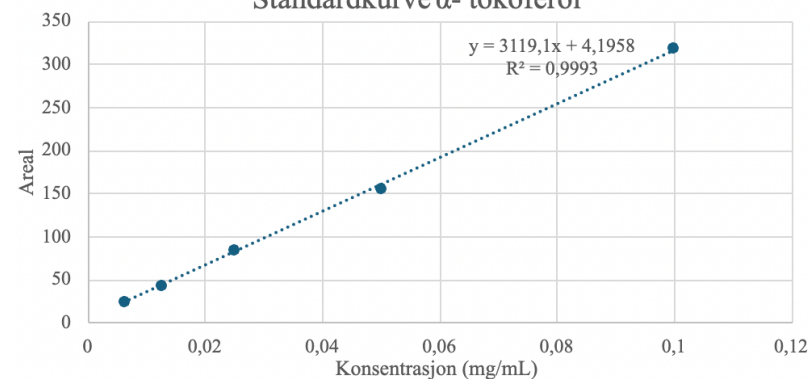
Standardkurve  $\beta$ - karoten



##### $\alpha$ -tokoferol

Konsentrasjon (mg/mL)	Areal
0,1	318
0,05	155
0,025	85
0,0125	42,3
0,00625	25

Standardkurve  $\alpha$ - tokoferol



Figur 1: Viser standardkurvene for  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol som ble analysert sammen med ekstraktene fra metode 1. Standardkurvene er basert på fem ulike konsentrasjoner av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol, samt arealet som ble detektert ved vitaminenes retensjonstid.

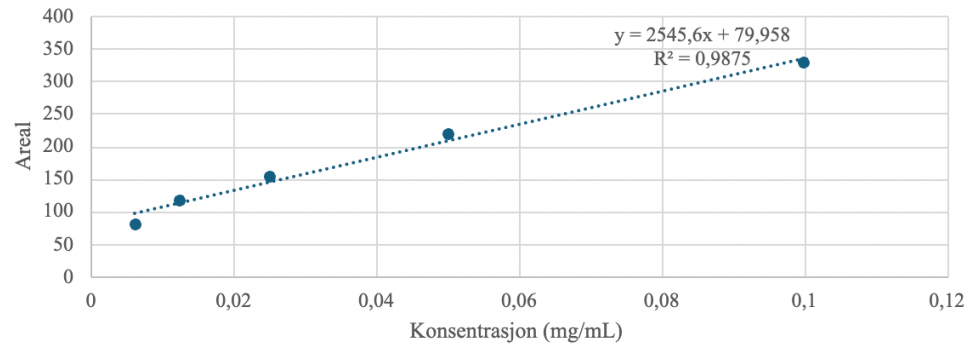
## Vedlegg 5: Standardkurver for $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol for metode 2 (side 1 av 2)

I figur 1 er det vist konsentrasjoner, tilhørende detekterte arealer og standardkurvene for  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol som ble analysert med HPLC sammen med ekstraktene fra første gjennomgang av metode 2.

### $\beta$ -karoten

Konsentrasjon (mg/mL)	Areal
0,1	328
0,05	217
0,025	152
0,0125	116
0,00625	80

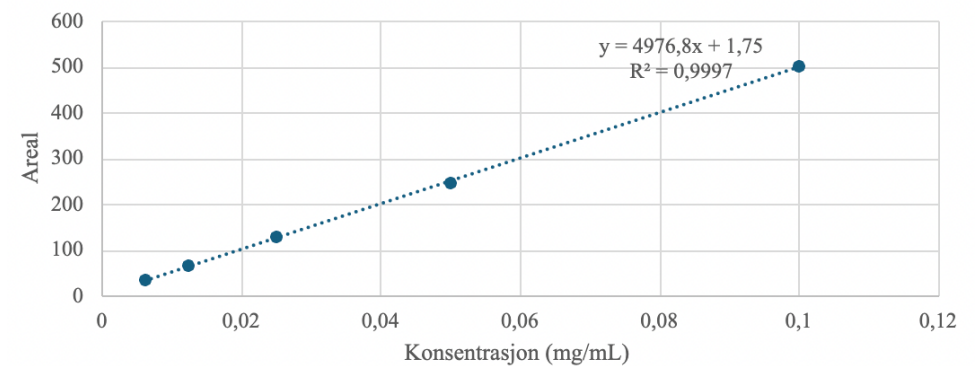
Standardkurve  $\beta$ - karoten



### $\alpha$ -tokoferol

Konsentrasjon (mg/mL)	Areal
0,1	502
0,05	245
0,025	126
0,0125	65
0,00625	35

Standardkurve  $\alpha$ -tokoferol



Figur 1: Standardkurver for  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol basert på fem ulike konsentrasjoner av  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol, samt arealet detektert ved de to vitaminenes retensjonstid. De to standardkurvene ble analysert samtidig som ekstraktene fra første gjennomgang av metode 2.

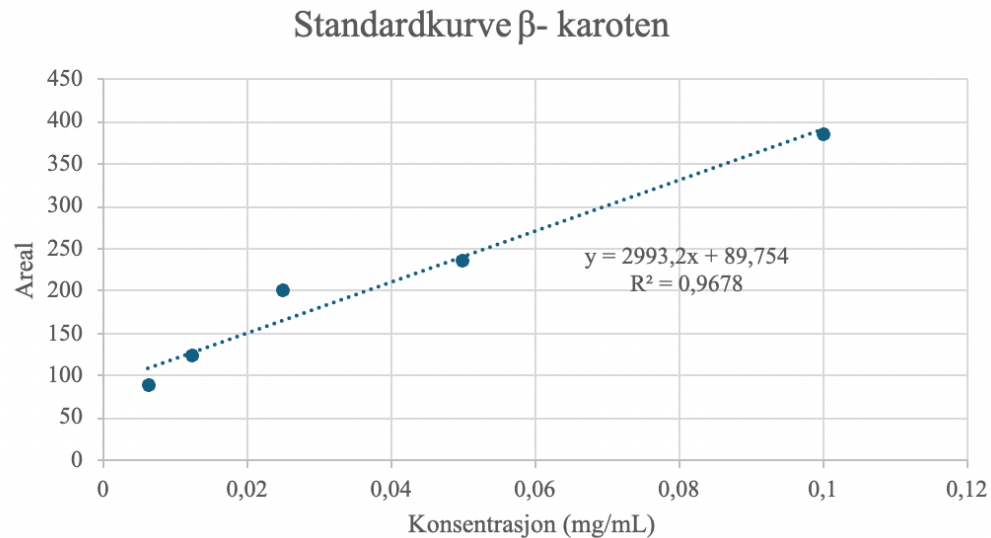


## Vedlegg 5: Standardkurver for $\beta$ -karoten og $\alpha$ -tokoferol for metode 2 (side 2 av 2)

I figur 2 er det vist konsentrasjoner, tilhørende detekterte arealer og ny standardkurve for  $\beta$ -karoten fra den andre kjøringen av  $\beta$ -karoten-standarden. Verken denne eller den første standardkurven for  $\beta$ -karoten ble brukt ved beregning av  $\beta$ -karoten-innhold i ekstraktene grunnet de lave arealene fra standarden.

### $\beta$ -karoten forsøk 2

Konsentrasjon (mg/mL)	Areal
0,2	347,5
0,1	384,9
0,05	234
0,025	199,7
0,0125	122,3
0,00625	87,8



Figur 2: Viser standardkurven til  $\beta$ - karoten fra andre kjøring. Standardkurven er basert på fem ulike konsentrasjoner med tilsvarende arealer detektert ved vitaminets retensjonstid. Den sterkeste konsentrasjonen 0,2 mg/mL ble utelukket i standardkurven.

### Vedlegg 6: Rådata fra metode 1: Arealer, konsentrasjoner, mengde per 100 g ferskt materiale (side 1 av 1)

I tabell 1 er det vist arealer, konsentrasjoner, mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g ferskt materiale og gjennomsnitt for alle parallellene av grønnkål og crispisalat fra metode 1.

**Tabell 1:** Viser arealer, konsentrasjoner, mengde vitamin per 100 g, samt gjennomsnitt av parallellene av grønnkål og crispisalat fra metode 1.

<b><math>\alpha</math>-tokoferol</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Grønnkål parallell 1	27,5	0,0075	0,721	0,667
Grønnkål parallell 2	24	0,0063	0,613	
Crispissalat parallell 1	12	0,0025	0,082	0,068
Crispissalat parallell 2	9,3	0,0016	0,054	
<b><math>\beta</math>-karoten</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Grønnkål parallell 1	714	0,0498	4,807	5,271
Grønnkål parallell 2	844	0,0594	5,734	
Crispissalat parallell 1	1490	0,1068	3,517	3,631
Crispissalat parallell 2	1584	0,1137	3,745	

### Vedlegg 7: Rådata fra metode 2: Arealer, konsentrasjoner, mengde per 100 g ferskt materiale (side 1 av 3)

I tabell 1 er det vist arealer, konsentrasjoner, mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g ferskt materiale og gjennomsnitt for alle parallellene av grønnkål inndampet ved 60°C med metode 2.

**Tabell 1:** Viser arealer, konsentrasjoner, mengde vitamin per 100 g, samt gjennomsnitt av parallellene av grønnkål inndampet ved 60°C med metode 2.

<b><math>\alpha</math>-tokoferol</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Grønnkål 60°C 0,25 g parallell 1	26,7	0,0050	0,290	0,305
Grønnkål 60°C 0,25 g parallell 2	29,1	0,0055	0,319	
Grønnkål 60°C 0,50 g parallell 1	56,1	0,0109	0,316	0,255
Grønnkål 60°C 0,50 g parallell 2	35,1	0,0067	0,194	
Grønnkål 60°C 0,75 g parallell 1	57,9	0,0113	0,218	0,209
Grønnkål 60°C 0,75 g parallell 2	53,0	0,0103	0,199	
<b><math>\beta</math>- karoten</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Grønnkål 60°C 0,25 g parallell 1	785,7	0,0551	3,191	3,927
Grønnkål 60°C 0,25 g parallell 2	1131,9	0,0805	4,663	
Grønnkål 60°C 0,50 g parallell 1	1236,5	0,0882	2,554	2,149
Grønnkål 60°C 0,50 g parallell 2	855,2	0,0602	1,743	
Grønnkål 60°C 0,75 g parallell 1	760,5	0,0532	1,027	1,551
Grønnkål 60°C 0,75 g parallell 2	1497,8	0,1074	2,074	

**Vedlegg 7: Rådata fra metode 2: Arealer, konsentrasjoner, mengde per 100 g ferskt materiale (side 2 av 3)**

I tabell 2 er det vist arealer, konsentrasjoner, mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g ferskt materiale og gjennomsnitt for alle parallellene av grønnkål inndampet ved 50°C med metode 2.

**Tabell 2:** Viser arealer, konsentrasjoner, mengde vitamin per 100 g, samt gjennomsnitt av parallellene av grønnkål inndampet ved 50°C med metode 2.

<b><math>\alpha</math>-tokoferol</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Grønnkål 50°C 0,25 g parallell 1	35,2	0,0067	0,388	0,339
Grønnkål 50°C 0,25 g parallell 2	26,7	0,0050	0,290	
Grønnkål 50°C 0,50 g parallell 1	24,2	0,0045	0,130	0,167
Grønnkål 50°C 0,50 g parallell 2	36,5	0,0070	0,203	
Grønnkål 50°C 0,75 g parallell 1	66,0	0,0130	0,251	0,269
Grønnkål 50°C 0,75 g parallell 2	75,5	0,0148	0,286	
<b><math>\beta</math>- karoten</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Grønnkål 50°C 0,25 g parallell 1	1208	0,0861	4,987	4,862
Grønnkål 50°C 0,25 g parallell 2	1149,5	0,0818	4,738	
Grønnkål 50°C 0,50 g parallell 1	1154,5	0,0822	2,381	2,082
Grønnkål 50°C 0,50 g parallell 2	874,1	0,0616	1,784	
Grønnkål 50°C 0,75 g parallell 1	1091	0,0775	1,496	1,507
Grønnkål 50°C 0,75 g parallell 2	1106,3	0,0786	1,518	

**Vedlegg 7: Rådata fra metode 2: Arealer, konsentrasjoner, mengde per 100 g ferskt materiale (side 3 av 3)**

I tabell 3 er det vist arealer, konsentrasjoner, mengde  $\beta$ -karoten og  $\alpha$ -tokoferol per 100 g ferskt materiale og gjennomsnitt for alle parallellene av crispisalat inndampet ved 60°C med metode 2.

**Tabell 3:** Viser arealer, konsentrasjoner, mengde vitamin per 100 g, samt gjennomsnitt av parallellene av crispisalat inndampet ved 60°C med metode 2.

<b><math>\alpha</math>-tokoferol</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Crispissalat 60°C 0,1250 g parallell 1	32,5	0,0062	0,245	0,202
Crispissalat 60°C 0,1250 g parallell 2	21,5	0,0040	0,158	
Crispissalat 60°C 0,1875 g parallell 1	10,4	0,0017	0,045	0,119
Crispissalat 60°C 0,1875 g parallell 2	38,1	0,0073	0,192	
Crispissalat 60°C 0,2500 g parallell 1	16,1	0,0029	0,057	0,044
Crispissalat 60°C 0,2500 g parallell 2	9,1	0,0015	0,030	
<b><math>\beta</math>- karoten</b>				
<b>Prøve</b>	<b>Areal</b>	<b>Konsentrasjon (mg/mL)</b>	<b>Mengde per 100 g ferskt materiale (mg)</b>	<b>Gjennomsnitt (mg)</b>
Crispissalat 60°C 0,1250 g parallell 1	672,2	0,0468	1,848	1,833
Crispissalat 60°C 0,1250 g parallell 2	662,2	0,0460	1,819	
Crispissalat 60°C 0,1875 g parallell 1	1239	0,0884	2,329	2,049
Crispissalat 60°C 0,1875 g parallell 2	950,5	0,0672	1,770	
Crispissalat 60°C 0,2500 g parallell 1	1319,5	0,0943	1,863	1,969
Crispissalat 60°C 0,2500 g parallell 2	1465,6	0,1050	2,075	

