

Penentuan kandungan antinutrien (oksalat) menggunakan kaedah kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC)

[Determination of antinutrient content (oxalate) using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)]

Mohd Zulkhairi Azid, Razali Mirad dan Siti Aisyah Mohd Noor

Pengenalan

Sebatian antinutrien merupakan sebatian kimia yang berupaya mengganggu penyerapan mineral berkhasiat di dalam badan manusia. Salah satu sebatian antinutrien yang terdapat dalam sumber makanan seharian ialah oksalat. Oksalat mudah didapati dalam sayuran berdaun, kekacang serta ubian yang merupakan sebatian garam terbitan daripada asid oksalik. Oksalat terbahagi kepada dua jenis iaitu oksalat terlarut dan oksalat tidak terlarut. Oksalat tidak terlarut akan terus dibuang melalui tinja manusia. Manakala, oksalat terlarut wujud dalam bentuk potasium oksalat dan magnesium oksalat. Ia larut di dalam air dan dapat diserap di dalam usus manusia. Oksalat terlarut akan dibuang melalui sistem perkumuhan manusia (urin). Kepekatan oksalat yang tinggi di dalam urin (*hyperoxaluria*) akan menyebabkan berlakunya proses penghabluran sebagai garam oksalat yang tidak larut (kalsium oksalat). Kalsium oksalat akan termendak di dalam tisu badan manusia terutamanya pada bahagian buah pinggang lalu membentuk batu karang. Diet yang tinggi dengan kandungan oksalat akan menjurus kepada pembentukan batu karang di dalam buah pinggang kerana pemendakan kalsium oksalat. Selain itu, oksalat juga akan terikat dengan mineral berkhasiat seperti kalsium serta magnesium dan menyebabkan mineral berkhasiat ini sukar diserap di dalam usus manusia.

Jadual 1 menunjukkan beberapa sumber makanan yang dilaporkan mengandungi oksalat. Aras selamat bagi oksalat di dalam badan manusia ialah 660 mg/kg (berat badan) (*Oxalic Acid Anhydrous*; MSDS No 144-62-7).

Terdapat pelbagai kaedah analisis untuk menentukan kandungan oksalat di dalam sumber makanan seperti kaedah amperometri, fluorometrik,

Jadual 1. Kandungan oksalat dalam sebahagian sumber makanan

*Sumber makanan	Oksalat (mg/100 g)
Sayuran	
Bayam	364 – 1145
Rubarb	511 – 983
Rebung	91.9 – 222
Lobak merah	5.7 – 19.23
Brokoli	16.1
Kecacang	
Badam	296.1 – 491
Kacang tanah	64.6 – 348.6
Kacang soya	57 – 204.0
Kacang hijau	8 – 24
Tuber	
Keladi	73.2 – 171.4
Kentang	11.8 – 17.1

*Sumber: Ruan et al., 2013, Attala et al., 2004, Savage 2000

spektrofotometer dan polarografi. Namun, kaedah yang lebih tepat dan tinggi keberkesanan adalah menggunakan kaedah kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Secara teori, HPLC merupakan konsep pemisahan komponen-komponen sebatian kimia di dalam satu campuran sampel dengan menggunakan pelarut dan bahan turus pepejal pada tekanan yang tertentu. Pemisahan komponen-komponen sebatian kimia berdasarkan aliran pelarut (fasa cecair) dan turus pepejal (fasa pepejal) pada masa yang berbeza serta pada tekanan tertentu. Masa tahanan (*rt*) sesuatu sebatian kimia tersebut ditentukan melalui beberapa pengesanan (*detector*) seperti ultra lembayung (UV) atau spektrometri jisim (MS). Kaedah ini juga berkesan secara kuantitatif untuk menentukan jumlah kandungan sebatian kimia dengan menggunakan standard sebatian kimia tersebut sebagai rujukan.

Prosedur pengestrakan dan parameter HPLC telah dibangunkan untuk menentukan kandungan oksalat dalam beberapa sumber makanan dari makmal fitokimia bawah Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran, MARDI. Kandungan oksalat dalam sumber makanan ditentukan secara kuantitatif dengan menggunakan asid oksalik sebagai standard. Kaedah ini sekali gus dapat membantu para penyelidik untuk menentukan tahap keselamatan sesuatu sumber makanan dengan cepat dan efisien.

Penyediaan sampel

Sampel seperti ubi keladi yang diperoleh dibersihkan daripada sebarang kotoran. Sampel kemudiannya dipotong menjadi saiz kecil (*Gambar 1*). Sampel yang telah dibersihkan dan dipotong dikeringkan menggunakan mesin sejuk dingin beku (*freeze dry*) atau ketuhar pada suhu 40 °C (*Gambar 2*). Sampel mestilah



Gambar 1. Contoh satu sampel (ubian) dibersihkan dan dipotong kecil sebelum dikeringkan



Gambar 2. Contoh sampel yang dikeringkan secara kaedah sejuk dingin beku. Sampel akan dikeringkan selama tiga hari atau sehingga sampel kering sepenuhnya

kering sepenuhnya. Sampel dikisar menjadi serbuk halus dengan menggunakan pengisar mikrohalus. Sampel kemudian disimpan untuk tujuan pengekstrakan oksalat.

Pengekstrakan oksalat

Pengekstrakan oksalat dijalankan dengan menggunakan dua kaedah bagi menentukan kandungan oksalat seperti yang berikut:

- a) Oksalat keseluruhan (*total oxalate*)
- b) Oksalat terlarut (*soluble oxalate*)

Oksalat tidak terlarut pula diperolehi daripada nilai penolakan (a – b) hasil analisis kuantitatif HPLC.

Pengekstrakan oksalat keseluruhan

Pengekstrakan oksalat keseluruhan (*total oxalate*) dijalankan dengan menggunakan 2M asid hidroklorik (HCl) pada suhu 80 °C. Sebanyak 500 mg sampel yang telah dikeringkan ditimbang ke dalam tiub pengempar. Sebanyak 20 mL 2M HCl dimasukkan ke dalam tiub pengempar sebelum dipanaskan di dalam rendaman air bersuhu 80 °C selama 15 minit. Ekstrak yang telah dipanaskan kemudiannya disejukkan pada suhu bilik dan tiub pengempar dipenuhi dengan 2M HCl bagi menjadikan isi padu keseluruhan ekstrak sebanyak 50 mL. Ekstrak di dalam tiub pengempar diasingkan dengan menggunakan mesin pengempar pada suhu 4 °C dan diemparkan dengan 2,889 putaran/minit selama 15 minit. Dua lapisan akan terhasil (*Gambar 3*). Lapisan atas diasingkan dan ditapis dengan menggunakan penapis nitrat selulosa 0.45 nm sebelum dianalisis menggunakan HPLC.



Gambar 3. Dua lapisan terbentuk selepas proses pengemparan. Lapisan atas akan ditapis menggunakan penapis nitrat selulosa 0.45 nm sebelum dianalisis menggunakan HPLC

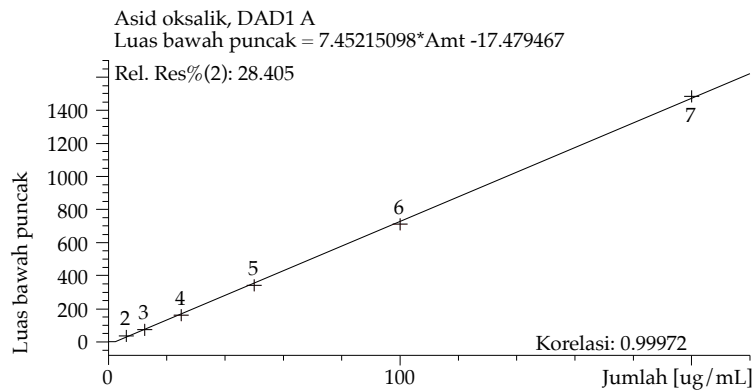
Pengekstrakan oksalat terlarut

Pengekstrakan oksalat terlarut dijalankan menggunakan air suling sebagai bahan pelarut. Proses pengekstrakan adalah seperti proses pengekstrakan oksalat keseluruhan.

Parameter HPLC

Sebanyak 5 μ L sampel (hasil daripada pengekstrakan 2M HCl dan air) yang telah ditapis dianalisis menggunakan sistem HPLC (*Agilent chromatography system 1200 Infinity series*) dengan pengesanan UV, yang ditetapkan pada panjang gelombang 210 nm. Proses pemisahan dan penentuan oksalat menggunakan kolum Phenomenex 300 mm \times 7.8 mm Rezex ROA (Phenomenex, Torrance, CA, Amerika Syarikat) yang disambungkan dengan kation H⁺ kolum pengawal. Suhu kolum ditetapkan pada 50 °C dengan isi padu elusi 60% 0.005 N asid sulfurik (H₂SO₄) dan 40% asetonitril (ACN) dengan kadar aliran 0.5 mL/minit selama 20 minit.

Standard, keluk tentukuran dan masa tahanan (rt) asid oksalik
 Dua jenis keluk tentukuran bagi menentukan kandungan oksalat keseluruhan dan oksalat terlarut diplot dengan melarutkan standard asid oksalik (Aldrich Chemistry, CAS – 144-62-7, St. Louis, Amerika Syarikat) di dalam 2M HCl dan air suling dengan kepekatan 6.125, 12.5, 25, 50, 100 dan 200 ug/mL sebelum dianalisis menggunakan HPLC. Keluk tentukuran bagi menentukan kandungan oksalat keseluruhan diplot dengan pekali korelasi $r^2 = 0.999$ (Rajah 1). Masa tahanan (rt) bagi asid oksalik adalah pada 9.997 – 10.058 min (Rajah 2), manakala



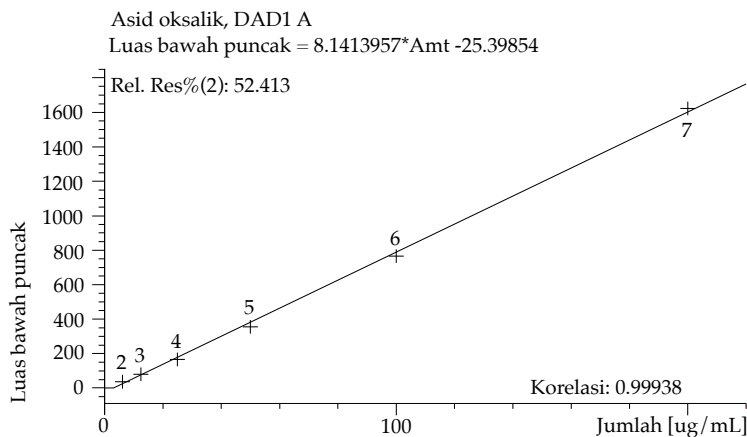
Rajah 1. Keluk tentukuran standard asid oksalik dalam larutan 2M HCl



Rajah 2. Masa tahanan (rt) untuk standard asid oksalik dalam larutan HCl pada kepekatan berbeza, a) 6.125 ug/mL; b) 12.5 ug/mL; c) 25 ug/mL; d) 50 ug/mL; e) 100 ug/mL dan f) 200 ug/mL. Masa tahanan (rt) bagi standard asid oksalik dalam larutan HCl adalah pada 9.997 – 10.058 min

keluk tentukan bagi menentukan kandungan oksalat terlarut diplot dengan pekali korelasi $r^2 = 0.999$ (Rajah 3) dengan masa tahanan (rt) pada 9.686 – 9.702 min (Rajah 4). Kedua-dua keluk tentukan ini digunakan bagi menentukan kandungan oksalat dalam sesuatu sampel. Kandungan oksalat tidak terlarut (kalsium oksalat) diperoleh apabila nilai kandungan oksalat keseluruhan ditolak dengan kandungan oksalat terlarut.

$$\text{Oksalat tidak terlarut} = \text{Oksalat keseluruhan} - \text{Oksalat terlarut}$$



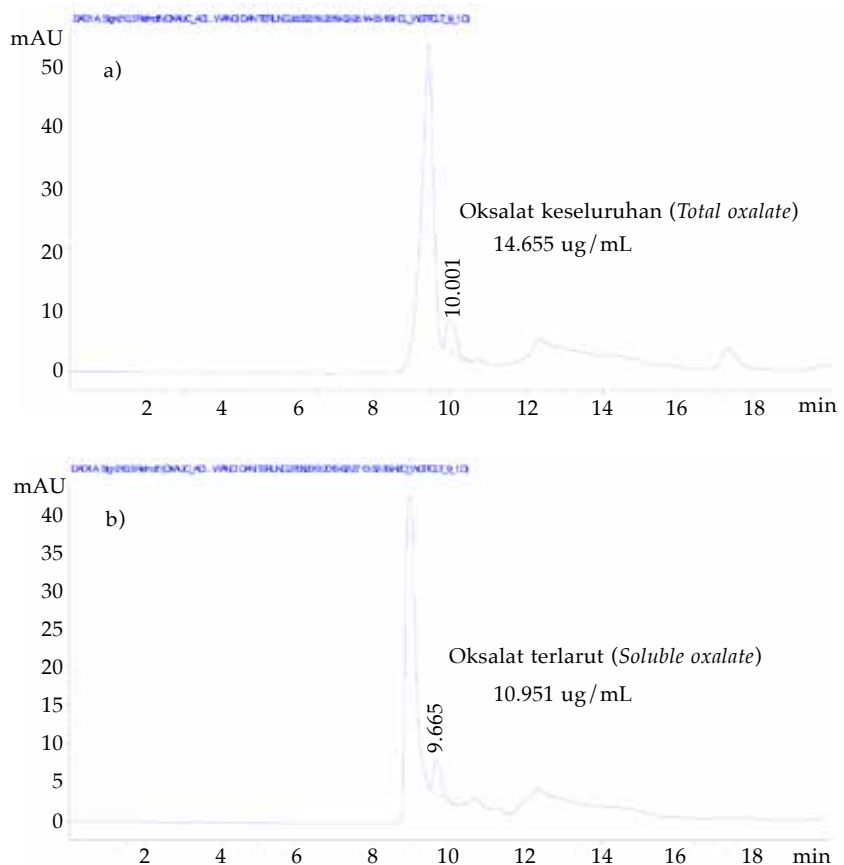
Rajah 3. Keluk tentukan standard asid oksalik dalam larutan air



Rajah 4. Masa tahanan (rt) untuk standard asid oksalik dalam larutan air pada kepekatan berbeza, a) 6.125 ug/mL; b) 12.5 ug/mL; c) 25 ug/mL; d) 50 ug/mL; e) 100 ug/mL dan f) 200 ug/mL. Masa tahanan (rt) bagi standard asid oksalik dalam larutan air adalah pada 9.686 – 9.702 min

Penentuan kandungan oksalat

Berdasarkan masa tahanan (*rt*) dan keluk tentukan yang diperoleh daripada standard asid oksalik, kandungan oksalat keseluruhan dan oksalat terlarut dalam sesuatu sampel dapat dikenal pasti dan ditentukan. *Rajah 5(a)* menunjukkan kromatogram oksalat keseluruhan daripada sampel ubi keladi yang diesktrak dalam larutan 2M HCl. Hasil analisis HPLC secara kuantitatif menggunakan keluk tentukan pada *Rajah 1*, kandungan oksalat keseluruhan dapat diketahui iaitu sebanyak 14.655 ug/mL, manakala *Rajah 5(b)* menunjukkan kandungan oksalat terlarut apabila sampel ubi keladi yang sama diekstrak di dalam air. Hasil analisis HPLC secara kuantitatif menggunakan keluk tentukan pada *Rajah 3*, kandungan oksalat terlarut ialah 10.951 ug/mL. Manakala, kandungan oksalat tidak terlarut (kalsium oksalat) dapat ditentukan dengan hasil penolakan antara oksalat keseluruhan (14.655 ug/mL dan oksalat terlarut (10.951 ug/mL). Kandungan oksalat tidak terlarut ialah $14.655 - 10.951 \text{ ug/mL} = 3.704 \text{ ug/mL}$.



Rajah 5. Kromatogram HPLC bagi satu sampel (ubian) (a) Kandungan oksalat keseluruhan (14.655 ug/mL) (b) Kandungan oksalat terlarut (10.951 ug/mL)

Jadual 2 menunjukkan beberapa contoh sumber makanan (keladi dan dua varieti terung tradisional) yang dijalankan di makmal fitokimia, Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran, MARDI. Kandungan oksalat diberikan dalam nilai mg/100 g berat kering sampel.

Jadual 2. Kandungan oksalat (mg/100 g berat kering) ubian dan terung tradisional

Sumber makanan	Oksalat (mg/100 g berat kering)		
	Oksalat keseluruhan ^a	Oksalat terlarut ^b	Oksalat tidak terlarut ^{a-b} (kalsium oksalat)
Keladi	118.95 ± 42.8	66.6 ± 3.0	52.4 ± 39.9
Terung telunjuk	289.2 ± 20.3	78.3 ± 1.40	210.9 ± 20.9
Terung rapuh	255.3 ± 29.1	204.4 ± 7.4	50.9 ± 34.6

Kesimpulan

Teknik kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC) merupakan teknik tepat dan berkesan dalam mengenal pasti dan menentukan kandungan oksalat dalam sesuatu sampel. Selain itu, teknik HPLC juga dapat menjimatkan masa analisis di samping penggunaan sampel yang sedikit. Meskipun kaedah HPLC ini telah lama dibangunkan oleh para saintis di seluruh dunia, beberapa pengubahsuaian telah dilakukan dari segi parameter HPLC dan kaedah pengeskrakan berdasarkan kemudahan yang terkini. Oleh itu, parameter yang telah dibangunkan ini diharapkan dapat membantu para penyelidik dan pelajar untuk menentukan kandungan sebatian antinutrien tersebut.

Bibliografi

- Attalla, K., De, S. dan Monga, M. (2014). Oxalate content of food: a tangled web. *Urology* 84: 555 – 60
- Savage, G. (2000). Effect of cooking on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods. *J. Food Compos. Anal.* 13: 201 – 206
- Schroder, T., Vanhanen, L. dan Savage, G.P. (2011). Oxalate content in commercially produced cocoa and dark chocolate. *J. Food Compos. Anal.* 24: 916 – 922
- Ruan, Q.-Y., Zheng, X.-Q., Chen, B.-L., Xiao, Y., Peng, X.-X., Leung, D.W.M. dan Liu, E.-E. (2013). Determination of total oxalate contents of a great variety of foods commonly available in Southern China using an oxalate oxidase prepared from wheat bran. *J. Food Compos. Anal.* 32: 6 – 11

Ringkasan

Oksalat merupakan salah satu sebatian antinutrien yang terikat dengan mineral berkhasiat di dalam badan seperti magnesium, potasium dan kalsium. Oksalat terbahagi kepada dua jenis iaitu oksalat terlarut dan oksalat tidak terlarut. Kepekatan oksalat terlarut yang tinggi di dalam urin akan menghablur dan menjadi oksalat tidak terlarut (kalsium oksalat). Oksalat tidak terlarut ini akan termendak di dalam buah pinggang manusia dan bertukar menjadi batu karang. Diet yang tidak terkawal dan tinggi kandungan oksalat akan memudaratkan kesihatan

manusia. Kandungan oksalat dalam sumber makanan dapat ditentukan dengan menggunakan kaedah kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Kaedah ini sangat disarankan bagi mengukur kandungan oksalat dalam makanan kerana lebih tepat dan dapat menjimatkan masa di samping penyediaan sampel yang sedikit. Prosedur pengekstrakan dan parameter HPLC yang telah dibangunkan dan diubah suai oleh makmal fitokimia bawah Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran diharapkan dapat membantu penyelidik dan pelajar yang ingin memulakan kajian kandungan sebatian antinutrien ini.

Summary

Oxalate is an antinutrient compound that can be bound with minerals in the body such as magnesium, potassium and calcium. Oxalate can be found in the form of soluble oxalate and insoluble oxalate. Highly concentrated oxalate in the urine may crystallise as insoluble salt (calcium oxalate). This insoluble oxalate will be deposited in human kidney to form kidney stones. The oxalate content in various food sources can be determined using high performance liquid chromatography (HPLC) method. This method is suggested not only required small amount of sample, but also reduce analysis time. The improvement of the extraction procedures and modifications of HPLC parameters developed by the Phytochemistry Laboratory under the Agrobiodiversity and Environmental Research Centre could help researchers and students who eager to begin studying the contents of this antinutrient compound.

Pengarang

Mohd Zulkhairi Azid
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,
43400 Serdang, Selangor
E-mel: zulkhairi@mardi.gov.my

Razali Mirad dan Siti Aisyah Mohd Noor
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,
43400 Serdang, Selangor