CH 12.26. Stanovenie vitamínu E a K v biologických matriciach

1. Pôvod metódy
ŠVPÚ Košice

2. Princíp metódy
Metóda je založená na uvoľnení vitamínu E po zmydelnení tukov a jeho extrakcii do hexánu.

3. Použité prístroje
Váhy,
Trepačka,
Centrifúga,
Rotačná vákuová odparka,
Centrifugačné skúmavky,
Manifold SPE,
SPE kolónky,
Pipety,

4. Zoznam chemikálií
hexán p.a.,
chlorid sodný,
acetonitril g.g.,
metanol g.g,
dichlórmetán p.a.,
kyselina askorbová,
etanolický roztok hydroxidu draselného

5. Príprava štandardov
Zásobný roztok sa pripraví s koncentráciou 1 mg/mL.

6. Príprava vzoriek
Svalovina, vajcia, tuk, vnútornosti:
K zhomogenizovanej vzorke sa pridá etanolický roztok KOH. Zmes sa vytrepáva na trepačke. Vitamín E sa zo zmesi extrahuje. Spojené hexánové extrakty sa odparia na vákuovej rotačnej odparke.

Sérum:
SPE kolónka sa aktivuje. Na kolónku sa nadávkuje sérum. Vitamín E sa z kolónky eluuje zmesou acetonitril/dichlórmetán. Eluát sa odparí dosucha na vákuovej rotačnej odparke.

7. Podmienky stanovenia
Kolóna: C - 18
Mobilná fáza: **:**acetonitril / metanol / dichlórmetán
Prietok mobilnej fázy: 1 ml / min
Detekcia: DAD
Teplota: 40 °C
Injekovaný objem: 20 ul.

CH 12.26.

STANOVENIE VITAMÍNU A, E METÓDOU HPLC

1. ROZSAH POUŽITEĽNOSTI METÓDY

Skúšobná metóda je použiteľná pre stanovenie v tuku rozpustných vitamínov:
• vitamín E (α – tokoferol)
• vitamín A (retinol)
vo vzorkách bravčového a hovädzieho mäsa, v premixoch a v krmivách.

2. PRINCÍP METÓDY

Zriedené a upravené vzorky sa analyzujú reverznofázovou HPLC s UV detekciou s vlnovou dĺžkou 290 nm pre vitamín E a λ=325 nm pre vitamín A.

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

• Ultrazvukový vodný kúpeľ
• Rotačná vákuová odparka
• Milli-Q-Plus, systém na prečistenie destilovanej vody, Millipore
• HPLC prístroj HP 1100 s UV detektorom Agilent 1100
• Analytická kolóna: LiChroCART 125-4, Purospher 100 RP 18e (5μm) s predkolónou RP 18 (5μm), Merck
• Predvážky a analytické váhy
• Injekčná striekačka Hamilton 100 μl
• Kalibrované odmerné sklo

4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Pokiaľ nie je uvedené inak, používajú sa chemikálie čistoty p.a.:
• Metanol - LiChrosolv, gradient grade
• Etanol - Uvasol
• N – hexán
• kyselina askorbová
• Hydroxid draselný
• tris(hydroxymetyl)-aminometan hydrochlorid
• Butylhydroxytoluen
• Pyrogalol
• Chlorid draselný
• Kyselina chlorovodíková
• Hydrochinón
• Síran sodný, bezvodý
• HPLC – grade H_2O
• Referenčné materiály: tokoferol acetát, α-tokoferol, retinol acetát, retinol

5. PRACOVNÝ POSTUP PRÍPRAVY VZORIEK

5.1. Hovädzie a bravčové mäso

Zo zmrazenej vzorky odvážime 1,00 g do sklenej guľatej banky s rovným dnom, pridáme tlmivý roztok, banku uzavrieme a homogenizujeme v ultrazvukovej vani. Potom pridáme BHT v etanole a kyselinu askorbovú. Banku pretrepeme, vloží sa do vodného kúpeľa. Pridá sa KOH, znovu sa pretrepe, vložíme späť do vodného kúpeľa. Roztok v skúmavke prudko ochladíme v ľadovom kúpeli. Do zmesi pridáme 1 % pyrogalol a extrahujeme n-hexánom v deliacom lieviku. Po prefiltovaní hexánovej fázy cez bezvodý vyžíhaný síran sodný spojené n-hexánové podiely odparíme na rotačnej vákuovej odparke takmer do sucha a zvyšok odfúkame v prúde dusíka. Odparok rozpustíme v metanole a dávkujeme na chromatografickú kolónu.

5.2. Premixy a kŕmne zmesi

Vitamín E

Do zmydelňovacej banky avážime 2 g vzorky premixu, alebo 20 až 50 g vzorky kŕmnej zmesi. Do naváženej vzorky pridáme BHT, hydrochinón, zalejeme etanolom, aby sa vzorka prevlhčila, roztokom kyseliny askorbovej a podľa druhu vzorky pridáme potrebné množstvo 10% roztoku hydroxidu draselného v etylalkohole. Na banku nasadíme spätný chladič a 5 min vzorku prebublávame prúdom dusíka. Potom banku ponoríme do vodného kúpeľa a zmydelňujeme za občasného premiešania krúživým pohybom. Po zmydelnení cez chladič opatrne pridáme vodu. Potom banku zo zmydelňovacej aparatúry vyberieme a prudko ochladíme pod studenou tečúcou vodou.

Obsah banky necháme usadiť, tekutú časť prenesieme do deliaceho lievika tak, aby pevný podiel zostal v banke. Zmes v deliacom lieviku dôkladne vytrepeme n-hexánom tak, že najprv prepláchneme pevný podiel v banke. Zmes dôkladne trepeme a po oddelení spodnú vodnú fázu vypustíme. Hexánové extrakty spojíme v zbernom deliacom lieviku, premyjeme vodou, pričom vodnú fázu vždy vypustíme a ďalej nepoužijeme. Hexánovú vrstvu filtrujeme cez riedky papierový filter, obsahujúci vyžíhaný síran sodný do odmernej banky a doplníme po značku.

Do odparovacej banky odoberieme extrakt vzorky a čiastočne odparíme na rotačnej vákuovej odparke pri teplote 50ºC. Zostávajúci roztok odparíme do sucha pod prúdom dusíka. Odparok vzorky rozpustíme v metanole. Po dôkladnom rozpustení dávkujeme na chromatografickú kolónu.

Vitamín A

Do zmydelňovacej banky o objeme navážime 2 g vzorky premixu, alebo 20 až 50 g vzorky kŕmnej zmesi, pridáme etanol, aby sa vzorka prevlhčila a podľa druhu vzorky pridáme potrebné množstvo 10% roztoku hydroxidu draselného v etylalkohole. Na banku nasadíme spätný chladič a vzorku prebublávame prúdom dusíka. Potom banku ponoríme do vodného kúpeľa a zmydelňujeme za občasného premiešania krúživým pohybom pod stálym prúdom dusíka. Po zmydelnení cez chladič opatrne pridáme vodu. Potom banku zo zmydelňovacej aparatúry vyberieme a prudko ochladíme pod studenou tečúcou vodou.

Po ochladení obsah banky prenesieme do deliaceho lievika a dôkladne vytrepeme n-hexánom. Hexánové extrakty spojíme v zbernom deliacom lieviku, pridáme 0,01 M HCL a dôkladne pretrepeme. Po oddelení a odstránení spodnej vodnej fázy hexánový extrakt opakovane preplachujeme vodou až do neutrálnej reakcie vodnej fázy na pH papierik. Hexánový extrakt

kvantitatívne prefiltrujeme cez stredne hustý papierový filter, obsahujúci malé množstvo vyžíhaného síranu sodného do odmernej banky a doplníme hexánom po značku.
Do odparovacej banky odoberieme extrakt vzorky a čiastočne odparíme na rotačnej vákuovej odparke. Zostávajúci roztok odparíme do sucha pod prúdom dusíka. Odparok vzorky rozpustíme v metanole. Po vhodnom nariedení dávkujeme na chromatografickú kolónu.

6. HPLC STANOVENIE

• Analytická kolóna: LiChroCART 125-4, Purospher 100 RP 18e (5μm) s predkolónou RP18 (5μm) – 4x4

• Mobilná fáza: **A** = voda
B = metanol

• Zloženie mobilnej fázy: vitamín E: izokratická elúcia 2 % **A** + 98 % **B**
vitamín A: izokratická elúcia 3 % **A** + 97 % **B**

• Prietok mobilnej fázy: vitamín E: 1,8 ml/min
vitamín A: 1,0 ml/min

• Objem nástreku: 50 μl

• Teplota kolóny: 20°C

• Detekcia: vitamín E: UV pri 290 nm
vitamín A: UV pri 325 nm

Vzorky pripravené postupom uvedeným v kapitole 5. kvantifikujeme kvapalinovým chromatografom, ktorý je špecifikovaný v kapitole 3.

7. SPRACOVANIE NAMERANÝCH ÚDAJOV A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Po ukončení série analýz vzoriek je potrebné spracovať jednotlivé analytické behy, ktorých dáta sú uložené v adresári DATA.
Prítomnosť a množstvo vitamínu A a E kvantifikujeme pomocou multikalibračného programu, ktorý je súčasťou programového vybavenia.
Po prebehnutí kalkulácie a vytlačení výsledkov analýzy urobíme prepočet koncentrácie analytu vo vzorke na riedenie, návažku a výťažnosť. Hodnota výsledku je vyjadrená v mg/kg vzorky.

10. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. HPLC in food analysis, R.Marcae, 1988, Reading, UK
2. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR, r.1998:
   Časť M1 - Stanovenie vitamínu A str. 535-537
   Časť M2 - Stanovenie vitamínu E str. 539-540