

STANOVENÍ VITAMINU A (RETINOLU) A VITAMINU E (α-TOCOPHEROLU) METODOU HPLC V KRMIVECH A PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK.

1. Definice

Účinnou formou vitaminu A obecného vzorce $C_{16}H_{23} - R$ je retinol a neoretinol ($R = CH_3-C=CH-CH_2OH$), kdy retinol je all-trans isomer a neoretinol je cis,trans-isomer. Metodou se stanoví vitamin A v kompletních krmivech i premixech doplňkových látek od obsahu nad 800 m.j./kg.

Vitamin E je DL-α-tocopherol sumárního vzorce $C_{29}H_{50}O_2$. Obsah vitaminu E se vyjadřuje v mg/kg. Metodou se stanoví vitamin E v kompletních krmivech i premixech doplňkových látek od obsahu nad 2,5 mg/kg.

2. Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní alkalickým hydroxidem (hydroxid draselný) a vitamin A a vitamin E se extrahuje do organického rozpouštědla (hexanu). Extrakt se odpaří k suchu a odparek se rozpustí v methanolu, je-li nutné, naředí se na požadovanou koncentraci. Obsah vitaminu A se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 325 nm nebo fluorescenční detekcí při vlnových délkách Ex: 325 nm, Em: 480 nm. Separační podmínky (průtok mobilní fáze a síla elučního roztoku) se nastaví takové, aby nedocházelo dělení cis a trans isomerů vitaminu A. Obsah vitaminu E se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 292 nm nebo fluorescenční detekcí při vlnových délkách Ex: 295 nm, Em: 330 nm. V případě použití programovatelného UV detektoru se zjišťuje obsah vitaminu A i vitaminu E v jediném nástřiku.

3. Zkušební pomůcky a chemikálie

3.1 Hexan, p.a.

3.2 Methanol, HPLC grade

3.3 Ethanol, denaturovaný hexanem 1 %

3.3.1 Ethanol, vodný roztok 35 %, $\rho = 0,945 \text{ g.cm}^{-3}$

3.4 Hydroxid draselný, KOH $M_r =$

3.4.1 Hydroxid draselný, ethanolický roztok (35 % ethanol) 200 g/l

- 3.5** Kyselina askorbová, $C_6H_8O_6$, $M_r = 176,1$
- 3.6** Hydrochinon pevný, $C_6H_6O_2$, $M_r = 110,1$
- 3.7** Síran sodný, bezvodý
- 3.8** Indikátor fenolftalein, roztok 0,1 % : 1 g fenolftaleinu se roz pustí v 80 ml ethanolu a doplní vodou na 100 ml. Takto připravený roztok se zředí 10krát.
- 3.9** Mobilní fáze: methanol-voda (980 + 20), poměr se musí upravit tak, aby odpovídal použité koloně a aby nedocházelo k tailování píku vitaminu A při částečné separaci cis- a trans - isomerů vitaminu A.
- 3.10** Dusík, žárovkárenský, prostý kyselých látek a plynů
- 3.11** All-trans-vitamin-A-acetát, např. SIGMA, No. R 4639
- 3.12** All-trans-vitamin-A-palmitát, např. SIGMA, No. R 3625, approx. 500 000 IU/g
- 3.13** DL- α -tocopherol-acetát, např. Sigma No.T3001, approx. 1360 IU/g
- 3.14** Chlorid sodný, nasycený roztok v 35 % ethanolu (3.3.1)
- 3.15** Kyselina chlorovodíková, zředěná, 1 mol.l^{-1}

4. Pracovní postup

4.1 Příprava vzorku a práce se vzorky

Roztoky vitaminu A i vitaminu E se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem, jsou citlivé na oxidační a kyselé látky (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření). Při zpracování vzorku se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Pokud možno, vzorek se nemele, ale pouze se roztírá v porcelánové misce. Homogenizace a úprava vzorku se děje těsně před jeho zmýdelněním a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám retinolu a tocopherolu.

4.2 Zmýdelnění vzorku

Podle obsahu vitaminu A a vitaminu E se do kulaté baňky s plochým dnem na 250 nebo 500 ml se zábrusem naváží 5 g (premixy doplňkových látek) nebo 15 až 20 g (krmné směsi) zkušební vzorku s přesností na 0,01 g a zalije se 25 ethanolu (3.3). V případě, že vzorek není dostatečně smočený, přidá se ještě 5 ml ethanolu (3.3.1). Postupně se přidá 750 mg kyseliny askorbové (3.5), 500 mg pevného hydrochinonu (3.6) a 75 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4.1). Na baňku se nasadí zpětný chladič a po 5 minutové deareaci dusíkem (3.10) se baňka ponoří do vodní lázně a obsah baňky se zmýdelňuje po dobu 30 minut /premixy doplňkových látek/ nebo 60 minut /krmné směsi a čisté látky či tritiráty/

při teplotě 80 °C za stálého míchání. Po ukončení zmýdelnění se zpětný chladič opláchne 30 ml 35 % ethanolu (3.3.1), přidá se 34 ml vody a obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu.

4.3 Extrakce

Do dělicí nálevky na 500 ml se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.14) a zmýdelněný roztok se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Pevný podíl v baňce se vypláchne 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.14) a kapalina se převede do dělicí nálevky. K pevnému podílu ve zmýdelňovací baňce se přidá 60 ml hexanu (3.1) a krouživým pohybem se promíchá. Po usazení sedimentu se hexanový podíl převede do dělicí nálevky k vodno-ethanolicke fázi, dělicí nálevky se uzavře a třepe po dobu 30 s. Obě fáze se nechají asi 2 - 5 minut rozdělit. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml 35 % ethanolu (3.3.1) k rozrušení vzniklé emulze. Extrakce vodné fáze s hexanem se provádí ještě dvakrát a to tak, že se vodná fáze extrahuje nejprve s 50 ml hexanu (3.1) a poté opět s 50 ml hexanu, přičemž po rozdělení fází (viz výše) se hexanové extrakty spojují v dělicí nálevce na 250 ml (500 ml). K oplachování zátky dělicí nálevky se používá 35 % ethanol (3.3.1). V případě obsahu tuku nad 30 g.kg⁻¹ se extrakce opakuje 4krát, pro obsahy tuku nad 70 g.kg⁻¹ se extrakce opakuje 5krát a hexanové extrakty se spojují v dělicí nálevce na 500 ml. Spojené extrakty se propláchnou 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propláchne 2krát 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží, tak dlouho, až je promývací voda neutrální (po přidání roztoku fenolftaleinu (3.8) zůstává roztok bezbarvý).

4.4 Úprava hexanového extraktu

4.4.1 Methanolvý extrakt

Extrakt se filtruje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml nebo 500 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (3.7). Nálevka i filtr se propláchnou 50 ml hexanu (3.1). Obsah baňky se odpaří na rotačním vakuovém odpařováku za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10). Odparek se rozpustí v definovaném množství methanolu tak, aby se koncentrace vitamínu A pohybovala okolo 5 000 - 10 000 m.j./l.

4.4.2 Premixy doplňkových látek - hexanový extrakt

Extrakt se filtruje do odměrné baňky na 200 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (3.7). Nálevka i filtr se propláchnou 20 ml hexanu (3.1) a odměrná baňka se doplní hexanem po značku a promíchá. Obsah odměrné baňky naředí na koncentraci asi 5 000 - 10 000 m.j./l tak, že hexanový extrakt se pipetuje do objemu 10,0 ml do odměrné baňky na 25 ml a extrakt se odfouká pod proudem dusíku a odparek se rozpustí v methanolu, doplní methanolem po značku a promíchá. Při pipetovaném objemu > 10 ml se pipetuje extrakt do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml a obsah baňky se odpaří na rotačním vakuovém odpařováku za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10) a odparek se rozpustí v methanolu. Roztok se převede do odměrné baňky takového objemu, aby koncentrace vitamínu A byla asi 5 000 - 10 000 m.j./l.

4.4.3 Krmné směsi a premixy doplňkových látek v přítomnosti robenidinu

V případě obsahu robenidinu v premixech doplňkových látek se robenidin extrahuje kyselinou chlorovodíkovou (3.15). Podle tabulky 3 se do dělicí nálevky na 250 ml pipetuje definované množství hexanového extraktu, v případě nutnosti se objem hexanové fáze upraví na cca 10 ml hexanem (pro obsahy vitamínu A nad 8 000 000 m.j./kg) a přidá se 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15). Obsah se protřepe, po rozdělení fází se vodná fáze odpustí a extrakce se provede ještě 2krát s 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15). Po odpuštění posledního podílu vodné fáze se obsah dělicí nálevky promyje 3krát 100 ml vody do odstranění kyselé reakce, hexanová fáze se přefiltruje přes vrstvu síranu sodného (bezvodého) (3.7) do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml, přičemž filtr s vrstvou síranu sodného i dělicí nálevky se propláchnou 20 ml hexanu, obsah baňky se odpaří na rotačním vakuovém odpařováku za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10) a odparek se rozpustí v methanolu. Roztok se převede do odměrné baňky takového objemu, aby koncentrace vitamínu A byla asi 5 000 - 10 000 m.j./l.

V případě obsahu robenidinu v krmných směsích se postupuje podle čl. 4.3, hexanové extrakty se shromažďují v dělicí nálevce na 500 ml. Přidá se 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15) a obsah se třepe asi 30 sekund. Po rozdělení fází se vodná fáze odpustí a extrak-

ce se opakuje ještě 2krát s 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15). Po odpuštění posledního podílu vodné fáze se obsah dělicí nálevky promyje 3krát 100 ml vody do odstranění kyselé reakce, hexanová fáze se přefiltruje přes vrstvu síranu sodného bezvodého (3.7) do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml, přičemž filtr s vrstvou síranu sodného i dělicí nálevky se propláchnou 20 ml hexanu, obsah baňky se odpaří na rotačním vakuovém odpařováku za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10) a odparek se rozpustí v methanolu. Roztok se převede do odměrné baňky takového objemu, aby koncentrace vitamínu A byla asi 5 000 - 10 000 m.j./l.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (0,45 µm) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 8000 ot/min.

4.5 Stanovení metodou HPLC

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona:	a) C ₁₈ - Nova-Pak 4 µm, 150x3,9 mm (Waters) nebo b) C ₁₈ - Nova-Pak 4 µm, 250x4,6 mm (Waters)
Eluční roztok:	Methanol-voda, 980 + 20, (V + V) viz. 3.9
Průtok:	1 ml/min
Objem nástřiku:	FL-detektor - 5 µl; UV-detektor - 25 µl
Detektor:	viz tabulka č. 4 a tabulka č. 5 FL-detektor, retinol Ex/Em - 325/480, tocopherol Ex/Em - 295/330
AUFS:	1,000

UV-detektor, časově programovatelný s programovatelnou vlnovou délkou

Časové změny vlnových délek UV-detektoru

Chromatografická kolona 250 mm

Čas (min)	Vlnová délka (nm)
0,0	325
6,0	292

Chromatografická kolona 150 mm

Čas (min)	Vlnová délka (nm)
0,0	325
4,5	292

FL-detektor, časově programovatelný s programovatelnou vlnovou délkou

Časové změny vlnových délek FL-detektoru

Chromatografická kolona 250 mm

Čas (min)	Vlnová délka (nm) Ex/Em
0,0	325/480
6,0	295/330

Chromatografická kolona 150 mm

Čas (min)	Vlnová délka (nm) Ex/Em
0,0	325/480
4,5	295/330

Teplota: okolí (resp. 30 °C)
Run Time: pro kolonu a) 12,5 min kolonu b) 27,5 min
RetTime: a) Retinol 2,1 min Tocopherol 5,6 min
 b) Retinol 4,3 min Tocopherol 13,6 min

4.6 Kalibrace

4.6.1 Příprava pracovního roztoku

Do kulaté baňky s plochým dnem na 250 ml se zábrusem naváží asi 60 až 85 mg vitaminu A (3.11 nebo 3.12) a 40 až 60 mg vitaminu E (3.13), přičemž se dbá na ustanovení čl. 4.1, standard se převrství 10 ml ethanolu (3.3) a dále se postupuje podle čl. 4.2 a 4.3. Konečný objem methanolového extraktu je 250 ml.

1 ml tohoto roztoku obsahuje vitamin A (retinol)- 150 IU, vitamin E (tocopherol) - 0,2 mg.

4.6.2 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibrační křivky

Do sady odměrných baněk na 25 ml se odpipetuje postupně 0,5 - 1,0 - 2,0 - 5,0 a 10 ml methanolového extraktu vitaminu A a vitaminu E, získaného podle čl. 4.6.1, doplní se methanolem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní se nanáší postupně na chromatografickou kolonu o objemu nástřiku 25 µl .

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

4.6.3 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibrační křivky pro krmné směsi a suroviny s nízkým obsahem vitaminů

Do sady odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje postupně 0,25 - 0,5 - 1,0 a 2,0 ml methanolového extraktu vitaminu A a vitaminu E, získaného podle čl. 4.6.1, doplní se methanolem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní roztoky odpovídají přibližné koncentraci 250 - 500 - 1500 a 3000 IU/l vitaminu A (retinol) a 0,5 - 1,0 - 2,0 a 4,0 mg/l vitaminu E (tocopherol). Takto připravený roztok se nastříkuje postupně na kolonu HPLC o objemu nástřiku 5 µl .

5. Výpočet

Obsah vitamínu A vyjádřený v IU/kg a obsah vitamínu E v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot R}{m_a}$$

kde **c** je koncentrace vitamínu odečtená z kalibrační křivky v IU/l (retinol) nebo mg/l (tocopherol)

m_a hmotnost zkušební vzorku v g

V objem extraktu v ml

R ředění /zakoncentrování/

Poznámka: Fluorescenční detekce je vhodné používat u vzorků, obsahují úsušky pícnin a přírodní barviva (b-karoten, carophyll), kdy dochází k nízkému rozlišení píků b-karoten - tocopherol, retinol - robenidin. V tomto případě je nutné konečné koncentrace methanolových extraktů upravit na kalibrační křivku pro FF-detektor.