

# Az A- és E-vitaminok szabvány szerinti HPLC-meghatározási módszerének felülvizsgálata

*Garai Lőrinc<sup>1</sup>, Bálint Mária<sup>2</sup> és Örsi Ferenc<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

<sup>2</sup>Bálint Analitika Kft.

Érkezett: 2009. május 5.

Az egészséges, kiegyenlített táplálkozás szempontjából igen fontos a megfelelő vitamin- és ásványianyag-bevitel. A zsírban oldódó vitaminok között az A-vitaminnak a látásban van fontos szerepe, továbbá a fehérje glikozilálás, a glikoprotein képzés koenzimje (Salgó, 2001). Az E-vitamin a többszörösen telítetlen zsírsavakat és membránlipideket védi az oxidációtól, továbbá gyulladásgátló hatással bír. Ma azonban nem csupán természetes vitaminforrásokból fedezzük ezen szükségleteinket, hanem étrendkiegészítők szedésével, vitaminokkal dúsított élelmiszerek fogyasztásával. Megoszlanak a vélemények ez utóbbiak szükségességéről, illetve a célcsoportok megoszlásáról, ám éppen a zsíroldható vitaminok esetleges túladagolása miatt fontos, hogy pontosan tudjuk mérni, ellenőrizni a különböző élelmiszermatrixok vitamintartalmát.

A zsírban oldódó vitaminok vizsgálata összetett feladat. Ha zsírban gazdag mintával (étolaj, margarin) dolgozunk, a kromatográfiai módszertől függően több megoldás lehetséges. NP-HPLC (normál fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia) esetében apoláros oldószerben felvett mintánkat közvetlenül injektálhatjuk a készülékbe. Ennek a módszernek két hátránya van:

- A minta nem koncentrálható az extraktum magas lipidtartalma miatt, így kimutatási határ alatt maradhat a keresett vitamin.
- Olyan laborban, ahol egy készüléken több módszer fut, gyakran fordított fázisú oszlopot alkalmaznak. A fázisváltás időigényes, továbbá gondosan át kell mosni a csöveket.

Ehhez viszonyítva egyszerűbb, ha a váltást két RP-HPLC (fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia) eluens között végezzük.

A szakirodalomban több mintamatrix folyadékkromatográfiai vizsgálatára is rendelkezésre állnak elszappanosításos és elszappanosítás nélküli módszerek. A jelenlegi szabványok (MSZ EN 12823:1) és a

(MSZ EN 12822:2000) (továbbiakban: „szabvány”) mátrixtól függően alkalmaznak elszappanosítást és elszappanosítás mentes eljárásokat. Ez utóbbiak a nagy zsírtartalmú minták zsírban oldódó vitaminjainak extrakciójában nem kivitelezhetőek, hiszen az RP-HPLC oldószerek (pl. metanol, acetonitril) e minták felvételére nem alkalmasak. Számos közlemény az elszappanosítás hátrányairól tesz említést, és RP-HPLC-re is alkalmazható alternatív megoldásokat keres (Pl. Gimeno, E., 2000; Xu, Z., 2008).

A tapasztalatok szerint az elszappanosítás lehetővé teszi a mintamátrix fellazítását, segítve ezzel a vitaminok kinyerését. Továbbá a mintákban többféle észterként (pl. acetát, palmitát) fordulnak elő a zsírban oldódó vitaminok, amelyek különböző retenciós idővel rendelkeznek. Az elszappanosítás révén szabad formában nyerhetjük ki őket, aminek köszönhetően a meghatározás kevesebb standard mintát igényel. A kivitelezés meghatározó tényezőit (pl. hőmérséklet, elszappanosítási idő, antioxidáns természete) a szabvány azonban tág tartományban rögzíti ajánlás nélkül, ezért a kísérleti munka célja többek között az említett tényezők optimum-keresése volt.

Az A- és az E-vitamin elszappanosítós mintaelőkészítésének visszanyerését az elszappanosítási időtartam és hőmérséklet változtatásával optimáltuk kétszintes, kétfaktoros kísérleti terv szerint. Figyeltük továbbá az antioxidáns hatását is. Az előkészített mintaoldatot fordított fázisú folyadékkromatográfiával vizsgáltuk: az A-vitamint (csupa-transz retinol) margarin, az E-vitamint ( $\alpha$ -retinol) étolaj mátrixban határoztuk meg.

## **Anyagok**

A mintaelőkészítéshez analitikai illetve HPLC tisztaságú reagenseket választottunk. A kalibrációhoz a Sigma-Aldrich gyártotta A- és E-vitamin standardok kerültek alkalmazásra, melyek tisztaságát rendszeresen ellenőriztük a vonatkozó szabványok előírása alapján.

## **Mintaelőkészítés**

Mérési pontonként két párhuzamos mintát készítettünk elő a következőképpen:

- Vénusz étolajból 5-9 g-ot mértünk be egy 250 ml-es gömblombikba;
- 300 mg aszkorbinsavat adtunk a mintához (főzőpohárba bemérve);

- hozzáadtunk 15 ml 50 %-os KOH-t, amivel bemosztuk az aszkorbinsavat;
- az adott hőmérsékleti ponton megfelelő elszappanosítási idő mellett visszafolyó hűtő alatt szappanosítottuk;
- 50 ml EtOH-lal utánaöblítettük a mintát egy 250 ml-es rázóölcserbe;
- hozzáadtunk 120 ml vizet az emulzió megszüntetéséhez, majd 3×50 ml hexánnal extraháltuk;
- háromszor vízzel mostuk az egyesített hexános fázist;
- rotációs bepárlón 50 °C-on és 260 mbar-on bepároltuk;
- a bepárolt mintát 10 ml metanolban vettük fel;
- a vizes fázist a maradék aszkorbinsav meghatározásához megőriztük;
- a legnagyobb A-, E-vitamin tartalmat mutató előkészítési paraméterek mellett (82 °C, 15 perc) készítettük egy addicionált mintát a várható E-vitaminnal összemérhető mennyiségű A, D, E-vitamin standard keverékkel (1 ml mennyiségű 0,5 mg/ml keverék).

Margarin előkészítésénél a bemért mintamennyiség 3-4 g volt.

Az elszappanosítás sikerességét az olaj-, illetve zsírcseppek eltűnése alapján állapítottuk meg. A szemrevételezést elszappanosítás után rögtön lehűtött néhány minta hexános extraktumának VRK-vizsgálatával hitelesítettük.

## Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Valamennyi meghatározáshoz fordított fázisú kromatográfia került alkalmazásra a következő anyagokkal és készülékekkel:

- Agilent 1100 Series, degasser pumpával, Chemstation szoftver
- oszlop: Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonna, 150×4,6 mm, 5 μm szemcseméret
- eluens: izokratikusan 95:5 metanol:víz
- eluens áramlási sebesség: 1 ml/min
- detektor: sorba kötött diódasoros detektor (DAD) és fluoreszcenciás detektor (FLD)

A vitaminok detektálásához az irodalmi hullámhosszakot vettük figyelembe a 1. táblázat szerint. A meghatározáshoz a DAD jelét vettük figyelembe.

## 1. táblázat: Egyes vitaminok retenciós ideje és detektálási hullámhossza

Vitamin	DAD regisztrált hullámhossz [nm]	FLD regisztrált hullámhossz* [nm]	Ret. idő [min]
A-vitamin	325	ex=325, em=450	4
E-vitamin (Leenheet, 2000)	293	ex=295, em=390	20

\*Mivel az FLD-detektor monokromatikus, ezért hullámhossz-váltást alkalmaztunk. Az A-vitamin hullámhosszán mértünk vele 5. percig, utána váltottunk át az E-vitaminéra. A 25. percben – 5 perccel a minta mérésének vége előtt – visszaállítottuk a detektálást az A-vitaminéra. A detektorjel stabilizációja a váltás után kb. 5 percet vett igénybe a készüléken.

### A kísérlet menete

#### Az elszappanosítás paramétereinek optimalizálása étolaj mátrixra Vénusz étolaj minta felhasználásával

Az elszappanosítás kitermelését a következő tényezők függvényében vizsgáltuk:

- **Hőmérséklet:** A nagyobb hőmérséklet növeli az átészterezés reakciósebességét, amely szobahőmérsékleten 16 óra (MSZ EN 12823-1), míg 70-100 °C-on 20-60 perc alatt végbemegy. Figyelembe vettük, hogy a magasabb hőmérsékleten nagyobb az esélye a keresett vitaminok oxidációjának, illetve hőbomlásának.
- **Elszappanosítás ideje:** Ez a tényező a hőmérséklettel áll összefüggésben, magasabb hőmérséklet esetén rövidebb elszappanosítási idő elegendő a reakció végbemeneteléhez. A kísérlet tervezése során azonban független faktornak tekintettük.
- **Antioxidáns típusa:** Ezt az előbbi két faktortól függetlennek tekintettük; így időmegtakarítás végett azok optimumának közelében vizsgáltuk.

A minták elszappanosítási idejének kezdetét a mintatartó gömblombiknak a beállított hőmérsékletű vízfürdőre helyezése, végét pedig a lombik gyors levétele és hűtésének megkezdése jelentette. A hőmérsékleti faktor esetében a szabvány előírásának megfelelő szélsőértékeket választottuk felső, illetve alsó szintnek. Az időtényező

esetében a szabványban előírt időintervallum szélső értékeihez 5 percet adva határoztuk meg a kísérleti tervek alsó és felső szintjeit, mivel a melegítés lényegesen lassabb volt, mint a lehűtés.

### ***Első szakasz***

a) Elsőfokú kísérleti terv szerinti vizsgálatot végeztük, mely adekvát volt a statisztikai ellenőrzés szerint. A faktorok szintjeit a 2. táblázat szemlélteti. Míg a szabvány szerint látszólag szabadon kombinálható a két faktor szélsőértéke, étolaj esetében 60 °C-on 20 perc helyett csak 35 perces vízfürdő mellett ment végbe teljes biztonsággal az elszappanosítás.

**2. táblázat: Étolaj elszappanosítás – elsőfokú kísérleti terv**

Faktor	Idő [min]	Hőmérséklet [°C]
Alsó faktorszint	35	60
Felső faktorszint	65	82
Középső faktorszint	50	71

b) A 3. táblázat szerinti mérési pontok az optimum felé haladás mellett az E-vitamin tartalomnak az idő függvényében történő izotermás ábrázolását szolgálják.

**3. táblázat: Kiegészítő mérések**

Idő [min]	Hőmérséklet [°C]
50	60
25	80
35	80
50	80
65	80
25	82
35	82
50	82

Az optimumot kezdetben 25 percnél, forráspont mellett állapítottuk meg, melynek meghatározó tényezője az elszappanosítás biztonsága volt. A későbbiekben, a mintabemérést 6-7 g-ra csökkentve találtuk meg a végleges optimumot.

### ***Második szakasz:***

Mivel étolaj mátrix vizsgálatainkat a margarin mátrix közbevetett elemzése hosszabb időre megszakította, a tárolási E-vitamin veszteség

követésére a korábbiakban optimálisnak talált ponton referenciamérést végeztünk. Az étolaj továbbiakban mért E-vitamin koncentrációit e referencia értékhez viszonyítottuk. Az így felállított hőmérséklet és idő optimum körülményei között addíciós módszerrel meghatároztuk a valódi koncentrációhoz viszonyított százalékos visszanyerést.

**4. táblázat: A második szakasz mérési pontjai**

Idő [min]	Hőmérséklet [°C]
25 min (referenciamérés)	82
20 min	82
15 min	82

Aszkorbinsav helyett butil-hidroxitoluol (BHT) antioxidáns alkalmazásával végeztük el az előkészítést egy ismert mérési ponton.

### **Elszappanosítási paraméterek optimalizálása margarin mátrixra Delma Joghurt margarinon**

A Delma Joghurt margarin vizsgálata során – az étolajnál pontosabb statisztikai értékeléshez – kétfaktoros, kétszintes kísérleti tervet alkalmaztunk.

Az A-vitamin palmitát észter formájában van jelen a Delma margarinokban, amit az elszappanosítás révén alkoholos formájában kaptuk vissza, ezáltal retinol standard mintát alkalmaztunk a HPLC-vizsgálathoz.

**5. táblázat: Delma margarin elszappanosítás másodfokú kísérleti terve**

	hőmérséklet [°C]	idő [min]
Alsó szint	60	25
Felső szint	82	50
Középpont	71	35

Az étolaj mintájára az optimális tartomány felé haladva a további kísérleteket fix hőmérsékleten (elegy forráspontja) végeztük a 6. táblázat szerint:

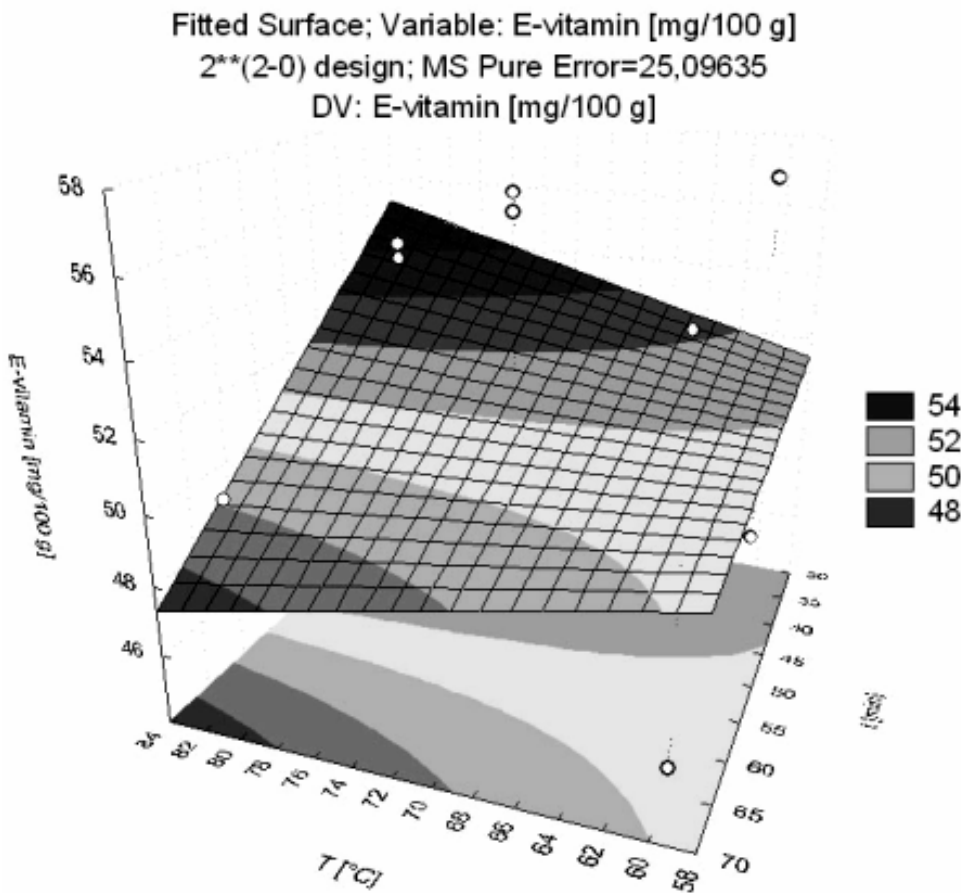
**6. táblázat: Margarin előkészítés további mérési pontjai**

T [°C]	t [min]
82	20
82	18
82	15

## Eredmények

### A 2 faktoros kétszintes kísérleti terv eredményeinek értékelése és ábrázolása a Statistica 7.0 programmal

Lineáris modellilestést végeztünk a mintaszám csökkentése érdekében. Az értékelés szerint a lineáris modell adekvátnak bizonyult. Az eredményeket grafikusán ábráztuk:



1. ábra: Az étolaj E-vitamin tartalmának térbeli ábrája (lineáris modell)

A statisztikai értékelés szerint az étolajnál mért E-vitamin visszanyerés optimuma a forráspont mentén az elszappanosítási idő csökkentésével érhető el.

# Az elsőfokú kísérleti terv bővítése az E-vitamin koncentráció-idő-hőmérséklet diagramon történő ábrázolásához

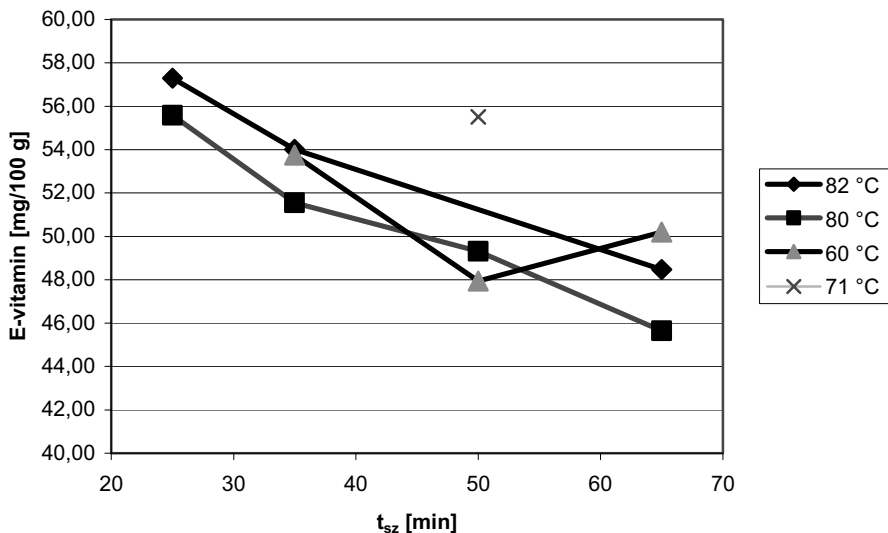
## Eredménytáblázat:

7. táblázat: Az étolaj E-vitamin tartalma a vizsgált mérési pontokon

T [°C]	t <sub>sz</sub> [min]	Vénusz étolaj E-vitamin tartalma [mg/100g]	Relatív szórás %
60	35	53,75	2,6
60	50	47,94	19,4
60	65	50,20	15,3
71	50	55,51	0,6
80	25	55,58	1,3
80	35	51,54	13,5
80	50	49,31	0,9
80	65	45,64	5,7
82	25	57,30	1,1
82	35	54,02	0,6
82	65	48,47	4

(2 párhuzamos mérés, így a szórások tájékoztató értékek)

Az étolajminták E-vitamintartalmát grafikusán ábrázoltuk a 7. táblázat alapján a 2. ábrán.



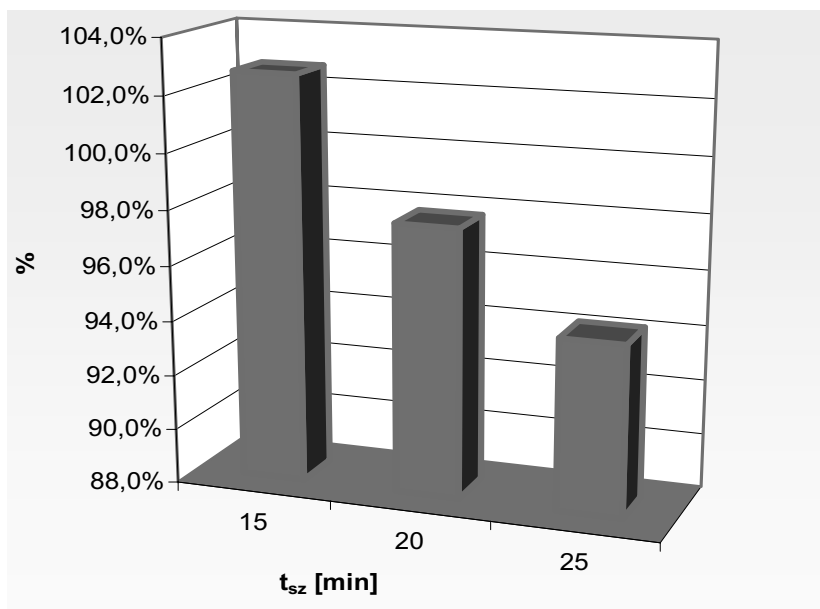
2. ábra: A Vénusz étolaj mért E-vitamin tartalmának időfüggése izotermánként (1. szakasz)



A 60 °C-os izoterma minimumponttal rendelkező görbéje a mérési pontok jelentős ingadozásából fakad, melynek oka a termosztálás bizonytalansága volt. Mivel a mért E-vitamin értékek szignifikánsan alacsonyabbak az optimális izotermáénál, továbbá az elszappanosításhoz is hosszú idő szükséges, ezért a 60 °C-os elszappanosítást nem célszerű alkalmazni. Legstabilabbnak a forrásponton (82 °C-on) felvett mérési pontok bizonyultak, feltehetően a forrásponti termosztálás stabilitásának köszönhetően.

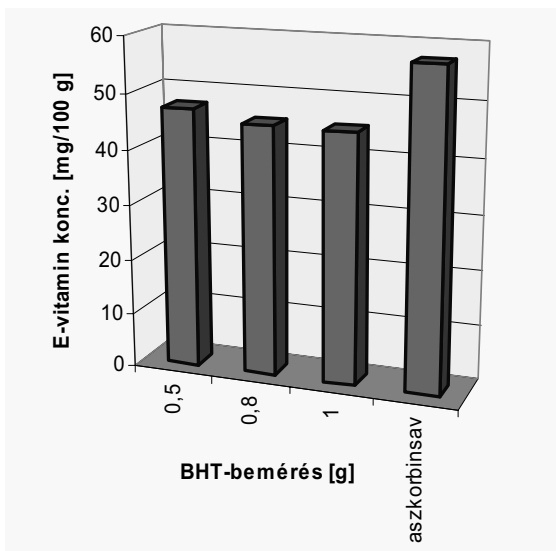
**8. táblázat: Százalékos E-vitamin visszanyerés étolajra az optimum közelében**

T [°C]	t [min]	n	A Vénusz étolaj E-vitamin tartalma [mg/100g]	Szórás	Visszanyerés
82	15	5	50,3	2,7%	102,7%
82	20	2	47,9	5,2%	97,8%
82	25	2	46,1	11,0%	94,2%



**3. ábra: E-vitamin visszanyerés, T=82 °C (fp.)**

A Vénusz étolaj előkészítésekor az optimális E-vitamin visszanyerés az eredeti kétszintes kétfaktoros kísérleti terv eredményeinek megfelelően az elszappanosítási elegy forráspontjánál és a zsírtartalom teljes elszappanosításához szükséges időtartam mellett érhető el. Az antioxidáns hatását a 4. ábra mutatja.



**4. ábra: 82°C/25 min**

A három BHT-beméréshez tartozó E-vitamin tartalom átlaga: 45,8 mg/100 g  $\pm$  2,61%, amely az azonos körülmények között kapott aszkorbinsavas átlag 80%-a. A pirogallollal nem készült összehasonlító vizsgálat.

## **A-vitamin Delma Joghurt margarinban**

Az A- és E-vitamin meghatározásához kezdetben egy 2 faktoros kétszintes kísérleti tervvel végeztük, majd annak megfelelően haladtunk a további irányokban.

Az elsőfokú terv modellje adekvátnak bizonyult, azonban egy pontosabb modell létrehozásához a meglévő elsőfokú eredményeinket kiegészítettük másodfokú tervvé, amelyet a 9. táblázat mutat.

A statisztikai értékelés alapján kapott diagram szerint a forráspont melletti rövidülő idő mentén érhető el az A-vitamin visszanyerési optimuma.

A 82°C/15 min pont eredményei tájékoztató jellegűek, ugyanis ezen időtartamhoz tartozó elszappanosítás során egyes párhuzamosokban zsírcseppek maradtak.

Ennek értelmében a forrásponton történő 18 perces elszappanosítási idő adja a Delma Joghurt margarin esetében az optimális visszanyerést.

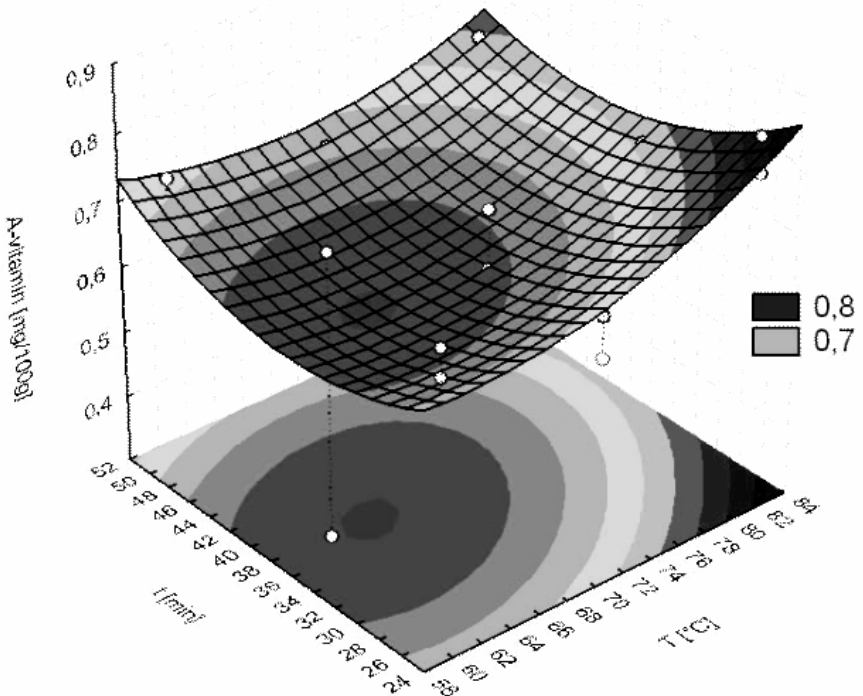
**9. táblázat: Margarin másodfokú terv szerinti elszappanosításának mérési eredményei**

Sorszám	T [°C]	t [min]	A-vitamin	Sorszám	T [°C]	t [min]	A-vitamin
1/1	60	25	0,71	2/5	71	35	0,74
2/1	60	25	0,75	1/6	71	50	0,67
½	60	35	0,78	2/6	71	50	0,69
2/2	60	35	0,35	1/7	82	25	0,80
1/3	60	50	0,69	2/7	82	25	0,85
2/3	60	50	0,74	1/8	82	35	0,73
¼	71	25	0,69	2/8	82	35	0,74
2/4	71	25	0,63	1/9	82	50	0,68
1/5	71	35	0,65	2/9	82	50	0,76

Fitted Surface; Variable: A-vitamin [mg/100g]

2 3-level factors, 1 Blocks, 18 Runs; MS Pure Error=,0114625

DV: A-vitamin [mg/100g]



**5. ábra: Delma Joghurt margarin A-vitamin tartalmának térbeli ábrája**

## 10. táblázat: Margarin A és E-vitamin elszappanosítási meghatározására kapott gradiens menti eredmények

T [°C]	t [min]	n	A-vitamin tartalom [mg/100 g]	A-vitamin rel. szórás	A-vitamin visszanyerés
82	15	2	0,94	6,7%	85,5%
82	18	5	0,97	3,4%	88,7%
82	25	3	0,86	9,0%	78,9%

### Következtetések

A szabvány kiegészíthető ajánlott elszappanosítási értékekkel. Az elszappanosítási mintaelőkészítés sebessége és visszanyerése egyaránt forrásponthőmérséklet és a homogén emulzió reprodukálható létrejöttéhez szükséges időtartam esetében érhető el. A forrásponthőmérsékleten történő melegítésnél egyszerűbb a hőmérsékletszabályozás más izotermákhoz képest, ugyanis mindössze a reakcióelegy felmelegítésének és lehűtésének reprodukálhatóságára kell ügyelni. A stabil hőmérséklet miatt a legnagyobb pontosság a forrásponthőmérséklet mellett érhető el.

Természetesen alkalmazható más hőmérséklet és idő is, ebben az esetben az előkészítés pontos reprodukciójára ( $\pm 1$  °C és  $\pm 1$  min) kell ügyelni, továbbá célszerű standard addíciós méréssel visszanyerési vizsgálatot végezni a pontosság növelése végett.

### Irodalom

- Salgó A. (2001): Élelmiszerkémia és táplálkozástan I., Műegyetemi Kiadó, Budapest
- MSZ EN 12823-1: Az A-vitamin meghatározása nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával
- MSZ EN 12822:2000: Az E-vitamin meghatározása nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával. Az  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - és  $\delta$ -tokoferol mérése
- Xu, Zhimin (2008): Comparison of extraction methods for quantifying vitamin E from animal tissues. *Bioresource Technology*
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., de la Torre, M.C., López-Sabater, M.C. (2000): Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **881**. 251-254
- Leenhet, A.P. De, Lambert, W. E., Bocxlaer, J.F. Van (Eds) (2000): *Modern Chromatographic analysis of vitamins*, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, Basel, , ISBN No 0-8247-0316-2, 21. o., 155. o.

# **Az A- és E-vitaminok szabvány szerinti HPLC-meghatározási módszerének felülvizsgálata**

## **Összefoglalás**

A zsírban oldódó vitaminoknak zsíros élelmiszermintában történő meghatározásánál a fordított fázisú HPLC meghatározáshoz szükség van az elszappanosítós módszerekre, amennyiben zsírban oldódó mintát kívánunk extrahálni. Ezeknél a módszereknél azonban nincs egyértelmű megállapodás a technológiai paraméterekről még a szabványokban sem. Ezért munkánk során a módszer visszanyerését és gyorsaságát optimaltunk kétszintes kétfaktoros kísérleti terv szerint, ahol az elszappanosítási hőmérsékletnek és időnek a módszer visszanyerésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a legmagasabb hőmérsékletű, lehető legrövidebb idejű elszappanosítás a leghatékonyabb. Végül összehasonlítottuk a butilhidroxitoluol és aszkorbinsav antioxidáns által elérhető visszanyerést, aminek eredményeképpen az utóbbi antioxidánst érdemes alkalmazni.

## **Review of the HPLC Determination Method for the Vitamin A and E according to the Standard**

### **Abstract**

For determination of fat soluble vitamins in fatty foods by reversed phase HPLC, the sample can only be extracted by saponification. By these methods, there is not any compromise concerning the preparation's parameters, e.g. temperature, time and antioxydant type. Thus in this experimentation we have optimized the yield by experimentation plan of two levels and two factors: temperature and time. We observed that the shortest time and highest temperature are the most efficient. Finally, we compared the yield by two different antioxydants, like butylated hydroxytoluene and ascorbic acid. These last gave significantly better yield, thus it is recommended to be used.