

EMQ és BHT antioxidánsok meghatározása intenzív folyadékkromatográfiával

ÖRSI FERENC és ÁBRAHÁMNÉ SZABÓ ÁGNES

Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett; 1983. december 2.

A többször telítetlen élelmiszer- és takarmány lipidek védelmében antioxidánsokat alkalmaznak. Az antioxidánsok között számos fiziológiailag nem közömbös vegyület fordul elő, ezért a mennyiségi előírások szigorú betartását ellenőrizni kell. (Az emberi fogyasztásra szolgáló termékekben max. 200 $\mu\text{g/g}$).

Az antioxidáns vizsgálat hagyományos eljárásai a réteggromatográfia, GLC eljárások összetettek, sok lépésből állnak, időigényesek és a több lépés során, a hosszú idő alatt az antioxidáns elbomolhat, vagy veszteségek léphetnek fel (1, 2, 3, 4, 5).

Ivie és Mc Kane (6) étolajok BHT és BHA antioxidáns tartalmának meghatározására acetonnitriles extrakción alapuló kinyerést és SEP-PACK C 18 oszlopon végzett tisztítást, majd ezt követően intenzív folyadékkromatográfiát alkalmazott. Ezen módszerből kiindulva módszert dolgoztunk ki premixek és takarmányok BHT és EMQ antioxidáns tartalmának meghatározására.

Anyagok és módszerek

A vizsgálatainkat BCR gyártmányú premix felhasználásával végeztük, amelyhez grammonként 25 mg antioxidánsot kevertünk metanolos oldat formájában, majd a premixet levegőn megszárítottuk. Ezen premix felhasználásával készítettünk takarmánymintákat, amelyekben 125 $\mu\text{g/g}$ volt az antioxidáns deklarált mennyisége.

Ezenkívül 200 $\mu\text{g/g}$ koncentrációban étolajhoz és sertészsírhoz is kevertük az antioxidáns mintákat.

Az antioxidáns kinyerése premixekből

500 mg premixet kémcsőbe mértünk, 15 cm^3 metanolt pipettáztunk hozzá és dugóval lezárva alaposan összeráztuk. Egy órán keresztül állni hagytuk, közben 2–3-szor felráztuk. Ezután szűrőpapíron megszürtük. Ezzel a minta vizsgálatra elkészült.

Az antioxidáns kinyerése takarmányból

Csiszoltos dugóval ellátott Erlenmeyer lombikba 10 g takarmányt mértünk, és 50 cm^3 metanolt adtunk hozzá. Alaposan összeráztuk, és 1 órán keresztül állni hagytuk, közben 2–3-szor ismételtlen összeráztuk. Ezután szűrőpapíron megszürtük.

Az antioxidánsok kinyerése étolajból

5 g étolajat kémcsőbe mértünk és $2 \times 5 \text{ cm}^3$ metanollal extraháltuk. A metanolt alaposan összeráztuk az étolajjal, majd a két fázis szétválasztása után a felül elhelyezkedő metanolos fázist 5 cm^3 -es injekciós fecskendővel leszivattuk és a másik kémcsőbe vittük át, majd szűrőpapíron megszürtük.

Antioxidáns kinyerése sertézsírból

5 g sertézsírt mértünk be kémcsőbe, 45 °C hőmérsékletű kémcsőtermosztátban megolvastottuk és ugyanezen hőmérsékletre melegített $2 \times 5 \text{ cm}^3$ metanollal extraháltuk. A metanolt a két fázis szétválása után 5 cm^3 térfogatú injekciós fecskendővel szívtuk le, majd az egyesített metanos fázisokat szűrőpapíron megsűrűztük.

Elválasztási körülmények

Vizsgálatainkat Waters gyártmányú izokratikus folyadékkromatográffal végeztük. Az elválasztás paramétereit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Az EMQ és BHT meghatározás körülményei

Elválasztó oszlop: Partisil ODS 3
Wathman gyártmány mérete: $250 \times 4 \text{ mm}$
Eluens: 85 % (v/v) metanol vízben.
Áramlási sebesség: $1 \text{ cm}^3/\text{min}$.
Nyomás: 35 bar
Detektor: UV 280 nm
Regisztrálás: 0,5 cm/min. papírsebesség
0,2 és 0,02 A/250 mm érzékenység fokozat

A vizsgált mintáktól függően a vizsgálatot kétféle koncentrációtartományban kellett végezni. Premixekből $5 \mu\text{l}$ extrakt bemérésével az 1 – 5 μg tartományban, míg a takarmány és olaj-zsír mintáknál 20, ill. 10 μl bevitelével 0,1 – 1 μg tartományban kellett a mérést elvégezni.

Standard oldatok.

BHT standard törzsoldat

100 mg butilhidroxi-toluolt (Sigma-gyártmány) oldunk 100 cm^3 metanolban. Az oldat hűtőszekrényben 1 hónapig eltartható.

EMQ standard törzsoldat

100 mg EMQ-t oldunk 100 cm^3 metanolban. Az oldat hűtőszekrényben 1 hónapig eltartható.

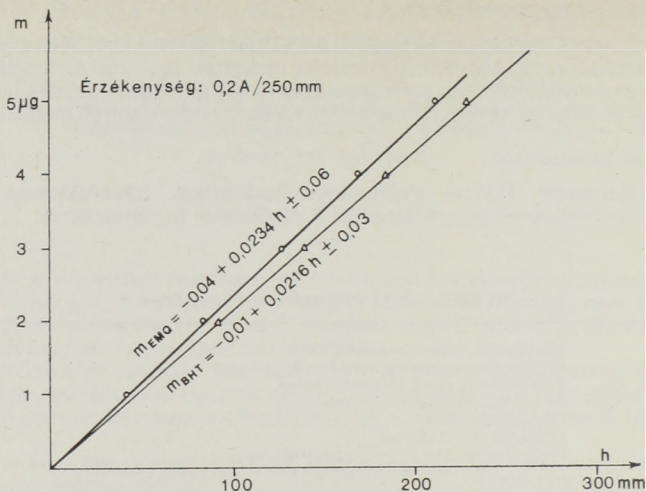
Munkastandard premixek vizsgálatához

5 cm^3 BHT és 5 cm^3 EMQ standard törzsoldatot keverünk össze és ebből 1 – 10 μl -t viszünk be kalibrációs görbe felvételéhez.

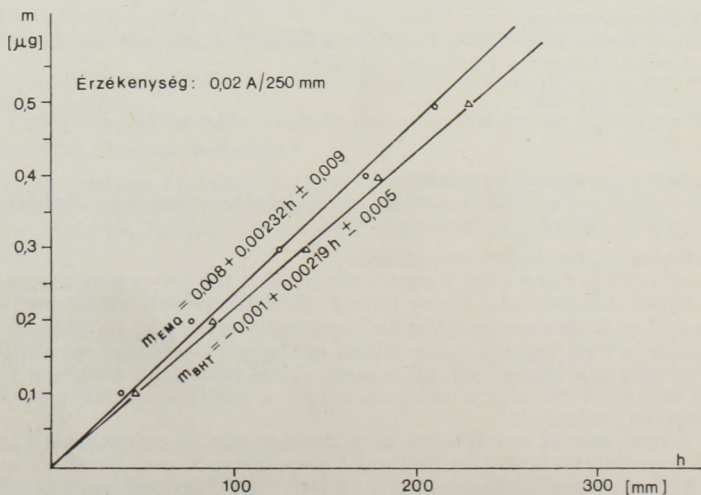
Munkastandard takarmányok vizsgálatához

5 cm^3 BHT és 5 cm^3 EMQ standard törzsoldatot 100 cm^3 -re hígítunk metanollal. A hígított standard oldat 1 hétig tartható el hűtőszekrényben és 48 óráig szobahőmérsékleten. Elsősorban az EMQ tartalomban következnek be változások. Az EMQ csúcs csökkenésével egyidőben közvetlenül előtte és a BHT csúcs mögött jelenik meg bomlástermék képződésére utaló csúcs. A két kalibrációs görbét az 1. és 2. ábrákon mutatjuk be, ahol a csúcsmagasságot a bevitt antioxidáns mennyiség függvényében ábrázoltuk.

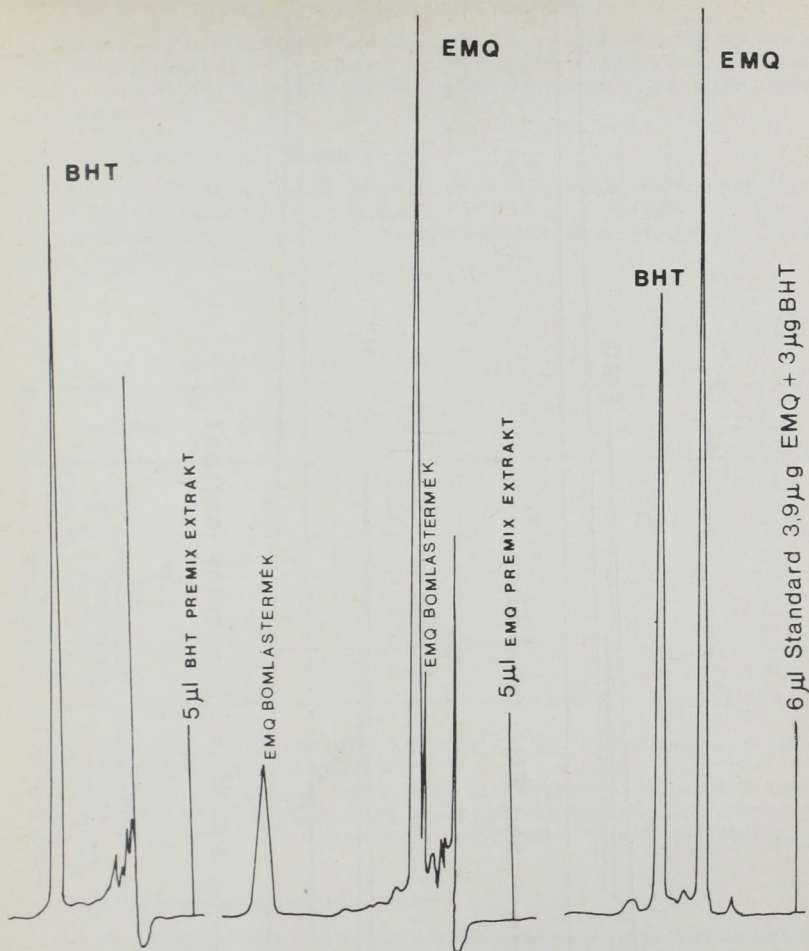
A premix minták extraktjából és a zsír-olaj minták extraktjából 5 μl -t, a takarmányextraktból 20 μl -t injektáltunk 5 μl -es, illetve 50 μl -es Hamilton fecskendővel. A mennyiségi értékeléshez az alapvontól mért csúcsmagasságot olvastuk le a kalibrációs görbéről, melyet ugyanazzal az eluenssel vettünk fel, mint amellyel a mintát is kromatografáltuk. A premixekből felvett kromatogramot a 3., takarmányokból a 4. ábrán mutatunk be.



1. ábra
Kalibrációs egyenesek EMQ és BHT meghatározáshoz premixből

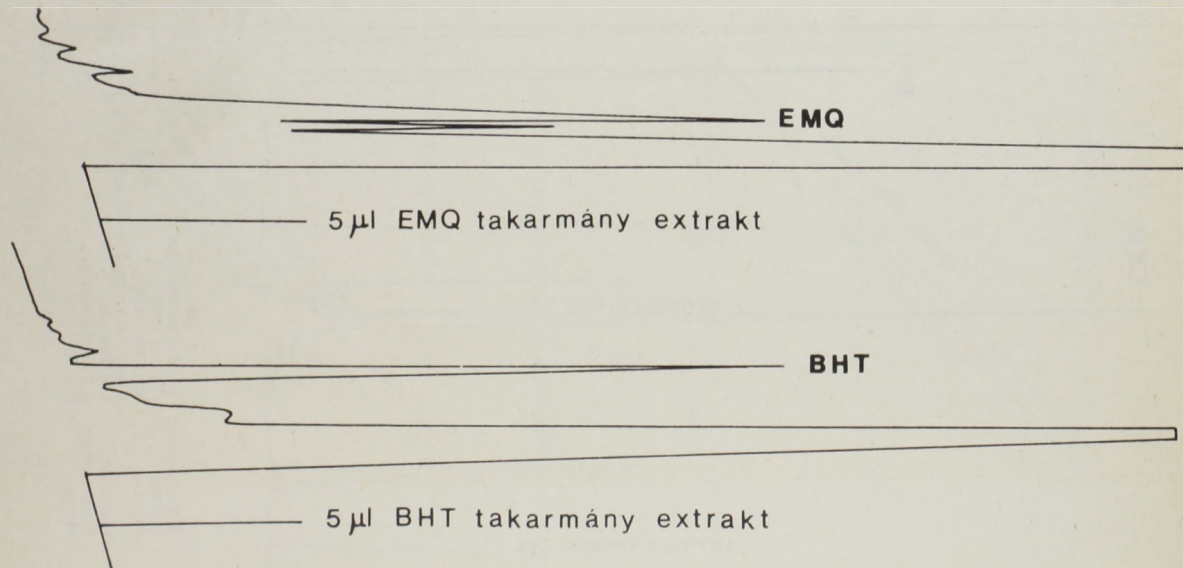


2. ábra
Kalibrációs egyenesek EMQ és BHT meghatározáshoz takarmányból



3. ábra

Kromatográf: Waters izokratikus
 Oszlop: Partisil ODS 3
 Eluens: 85% metanol
 $v = 1 \text{ cm}^3/\text{min}$, $P = 43 \text{ bar}$
 Detektor: UV 280 nm
 Érzékenység: 0,2 A/250 mm
 Minta: 0,1–5 µg



4. ábra

Kromatográf: Waters izokratikus
Oszlop: Partisil ODS 3
Eluens: 85% metanol
 $v = 1 \text{ cm}^3/\text{min}$, $P = 43 \text{ bar}$
Detektor: UV 280 nm
Érzékenység: 0,02 A/250 mm

Az antioxidáns vizsgálatok eredményei

Az antioxidánsok extrakciójának körülményeit, a mintákhoz adott antioxidáns visszanyerhetőségét és a párhuzamosan végzett meghatározások szórását vizsgáltuk. A módszert alkalmaztuk az antioxidáns mennyiségének tárolás alatti változásának követésére.

A premixek extrakciójának vizsgálata

A premixek extrakciójának vizsgálata során az extrakciós idő hatását vizsgáltuk. A leírt extrakciós eljárással, de 0, 0,5, 1 és 1,5 óra tárolási idővel készítettünk 3–3 extraktot és ezekben a meghatározást elvégeztük. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat

Az extrakciós idő hatása BHT és EMQ kinyerésre

Antioxidáns	Minta	Extrakciós idő óra			
		0	0,5	1,0	1,5
BHT mg/g	I.	18,9	24,6	24,7	25,0
	II.	19,5	23,2	25,9	24,2
	III.	20,1	24,1	24,7	25,8
	Átlag	19,5	24,0	25,1	25,0
EMQ mg/g	I.	20,4	24,8	25,6	24,9
	II.	20,9	24,5	25,2	24,4
	III.	21,7	23,3	26,3	26,3
	Átlag	21,0	24,2	25,7	25,2

A BHT meghatározás szórása: 0,70 mg/g 2,79%. Az EMQ meghatározás szórása: 0,75 mg/g 2,97%. Szabadsági fok: 8.

Az eredmények alapján választottuk az extrakció időtartamát 1 órának. A premixekből a BHT 2,8%; az EMQ 3%-os variációs koefficienssel volt meghatározható. Ez az érték elsősorban a premix heterogenitásból származó hibát foglalja magába.

A takarmányok extrakciójának vizsgálata

A vizsgálatba bevont takarmányok 0,5% premix felhasználással készültek, és így deklarált értékük 125 μ g/g BHT, illetve EMQ volt, azonban a takarmányok heterogenitása miatt ettől eltérő értéket mértünk, bár a vizsgálatokhoz felhasznált kb. 1 kg-nyi takarmányt minden mintavétel előtt alaposan összekevertük.

A premixekhez hasonlóan megvizsgáltuk az extrakciós idő hatását az antioxidáns kinyerhetőségére, valamint a már bemért takarmánymintához ismert mennyiségű antioxidánsztadtunk a standard törzsoldat hozzáadásával és ennek visszanyerhetőségét vizsgáltuk. A kísérlet eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

A BHT esetében a deklarálnál nagyobb, az EMQ esetében a deklarált körüli értéket figyeltük meg, ami a bekeverés heterogenitására utal, hiszen a szórások ennél lényegesen kisebbek. Az extrakciós időre itt is az 1 órát találtuk megfelelőnek. A visszanyerhetőség ismert mennyiség hozzáadása esetén 100%.

Az extrakciós idő hatása BHT és EMQ visszanyerhetőségére

Antioxidáns	Minta	Extrakciós idő óra				Bemért minta + 1250 μg antioxidáns
		0	0,5	1,0	1,5	
BHT $\mu\text{g/g}$	I.	162	207	201	233	335
	II.	145	193	219	209	348
	III.	152	215	207	218	352
	Átlag	153	205	209	220	345
Visszanyerés						104%
EMQ $\mu\text{g/g}$	I.	89	103	133	114	242
	II.	95	114	129	130	251
	III.	101	113	119	119	257
	Átlag	95	110	127	121	250
Visszanyerés						101%

Az EMQ meghatározás szórása: $\pm 8,9 \mu\text{g/g}$ 5,5%

A BHT meghatározás szórása: $\pm 10,2 \mu\text{g/g}$ 4,76%

4. táblázat

Sertézsír és étolaj extrakciós körülményeinek vizsgálata

Antioxidáns	Extrakciók száma	Antioxidáns koncentráció $\mu\text{g/cm}^3$	Extrahált antioxidáns $\mu\text{g/g}$
BHT étolajban	1	132	182
	2	101	202
	3	67	201
	4	50	199
	5	40	200
EMQ sertézsírban	1	190	190
	2	100	200
	3	67	201
	4	51	204
	5	42	193

Zsír és olajminta extrakciós körülményeinek vizsgálata

Vizsgálataink során azt kívántuk tisztázni, hogy hányszori extrakcióra van szükség a teljes antioxidánstartalom kinyerésére. A vizsgálatokhoz az étolajhoz kevertük a BHT-t és zsírhoz az EMQ-t.

A leírt eljárás szerint a mintákat 1–5-ször extraháltuk és az egyesített extraktot vizsgáltuk. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Az eredmények alapján a kétszeri extrakcióval mindkét antioxidáns esetén a deklarált értéknek megfelelő bemért értékeket kaptuk vissza, vagyis kétszeri extrakció elegendő az antioxidáns kinyerésére.

A pontosság meghatározására 5–5 párhuzamos bemérésből végzett vizsgálat eredményét foglaltuk össze az 5. táblázatban.

Az étolaj BHT tartalma tehát 1,5%-os, a sertézsír EMQ tartalma 1,9%-os variációs koefficienssel volt meghatározható.

Antioxidáns	Minta	Mért értékek µg/g	Átlag és szórás µg/g
BHT étolajban	I.	197	202 ± 3,0 (1,49 %)
	II.	202	
	III.	205	
	IV.	203	
	V.	203	
EMQ sertézsírban	I.	198	197 ± 3,7 (1,9 %)
	II.	195	
	III.	202	
	IV.	192	
	V.	198	

Tárolási kísérlet BHT és EMQ tárolás alatti viselkedésének tanulmányozásához

Az előzőekben már vizsgált mintákat 24 héten keresztül négy hetenként szobahőmérsékleten, normál nedvességtartalom mellett tároltuk és antioxidáns tartalmukat meghatároztuk. Az eredményeket a 6. táblázatban foglaltuk össze. Az eredmények azt mutatják, hogy a tárolás alatt a minták antioxidáns tartalma kisebb-nagyobb sebességgel csökken, amely elsőrendű reakció törvényszerűségével írható le. A táblázat utolsó sorában az elsőrendű sebességi állandó értékét foglaltuk össze. Ez legnagyobb volt a takarmányhoz kevert BHT esetén, ezt követte a takarmányhoz kevert EMQ, illetve a premix BHT tartalma. Lényegesen lassabb volt az étolaj és leglassabb a sertézsír antioxidáns tartalmának változása a tárolás során.

Különböző minták BHT és EMQ tartalmának változása tárolás során 6. táblázat

Tárolási idő hét	Premix		Takarmány		Étolaj BHT µg/g	Sertézsír EMQ µg/g
	BHT	EMQ	BHT	EMQ		
	mg/g	mg/g	µg/g			
0	25,1	25,7	209	127	202	197
4	15,9	18,4	124	38	196	198
8	9,2	13,8	52	59	185	194
12	5,5	9,4	44	30	182	195
16	4,1	6,5	19	15	173	192
20	2,6	5,0	15	14	169	193
24	1,0	3,3	10	7	165	191
Bomlás sebességi állandó 1/hét	0,12	0,08	0,15	0,12	0,009	0,001

Az eredmények alapján tehát a kidolgozott módszerek nemcsak az antioxidánsok mennyiségének meghatározására, de az antioxidáns hatás vizsgálatához szükséges kinetikus vizsgálatokra is alkalmasak.

IRODALOM

- (1) Doeden, W. G. et al.; J. Amer. Oil. Chem. Soc. 56, 12 1979.
- (2) Hurtubise, K. J.; Anal. Chem. 48. 2092, 1976.
- (3) Mc. Kone, H. T.; J. Chem. Educ. 53. 800, 1976.
- (4) Scheidt, S. A., Conroy, H. W.; J. AOAC 49, 807, 1966.
- (5) Senten, J. R. et al.; J. AOAC 60. 505, 1977.
- (6) Ivis, K., Mc Kone, H. T.; Determination of BHA and BHT in vegetable Oils by Sep-Pack cartridge isolation and LC analysis. Waters information 1982.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ ЕМО И ВНТ С ПОМОЩЬЮ ИНТЕНСИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ф. Ёрши и А. Абрахам – Сабо

Авторы разработали метод определения содержания антиоксидантов в премиксах, жирах и в фураже.

Традиционные методы определения антиоксидантов являются сложными, многоступенчатыми, продолжительными и могут привести к потерям.

В противоположность, метод жидкостной хроматографии является быстрым, чувствительным и подготовка проб состоит лишь только из простой их экстракции.

DETERMINATION OF EMQ AND BHT ANTIOXIDANTS BY HPLC

F. Örsi and Á. Ábrahám – Szabó

The authors elaborated an HPLC method for the determination of antioxidants in premixes, feeds and fats.

The conventional procedures of examination of antioxidants are complicated, contain several steps, take long time and losses may occur in them. On the other hand the HPLC is quick, has higher sensitivity and the preparation of sample is only a simple extraction.

BESTIMMUNG DER ANTIOXYDATIONSMITTEL EMQ UND BHT MITTELS INTENSIVER FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE

F. Örsi und Á. Ábrahám – Szabó

Eine intensive flüssigkeitschromatographische Methode wurde von den Verfassern zur Bestimmung des Antioxydationsmittelgehaltes von Premixen, Futtermitteln sowie von Fetten entwickelt.

Die traditionellen Verfahren zur Untersuchung der Antioxydationsmittel sind sehr komplex, enthalten viele Schritte und sind gar nicht frei von Verlusten. Die auf Flüssigkeitschromatographie begründete Methode ist im Gegenteil rasch, ihrer Empfindlichkeit ist höher, und die Vorbereitung der Muster besteht bloss aus einer einfachen Extraktion.

LE DOSAGE DES ANTIOXYDANTS EMQ ET BHT PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

F. Örsi et Á. Ábrahám – Szabó

Une méthode chromatographique en phase liquide a été élaborée pour le dosage de la teneur en antioxydants des fourrages et des graisses.

Les analyses classiques sont complexes, se composent de beaucoup de pas, elles demandent longtemps et des pertes se peuvent former.

La méthode chromatographique en phase liquide, en revanche, est vite, plus sensible et la préparation des échantillons se compose d'une simple extraction.