Zsíroldható vitaminok meghatározása intenzív folyadékkromatográfiával

I. Az A- és E-vitamin meghatározása

ÖRSI FERENC és ÁBRAHÁMNÉ SZABÓ ÁGNES
Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1983. december 2.

A zsíroldható vitaminok (A-, D-, E- és K-vitamin) analízise az analitikai kémia nehéz feladatai közé tartozik. Az alkalmazott módszerek három csoportba sorolhatók: biológiai, fizikai és kémiai eljárásokra.

A biológiai módszerek (1) a legérzékenyebbek és kis vitamintartalmú minták elemzésére alkalmazhatók, amelyeknek a vitamintartalma közvetlenül korrelál az állatok növekedésével. Sajnos a biológiai módszerek gyenge reprodukálhatóságot mutatnak, időigényesek és nem alkalmasak nagyszámú minta elemzésére.

A fizikai és kémiai módszerek gyorsabbak és reprodukálhatóságuk jobb, mint a biológiai módszereké. Rendszerint kolorimetriás, spektrofotometriás, vagy spektrofluorometriás módszereket *(2)* alkalmaznak a vitaminok meghatározására. A vitaminokat a zavaró komponensektől – elsősorban a zsíroktól – elszappanosítással szabadítják meg, de ez sokszor azért is szükséges, mert a vitamin különböző savakkal észterezett formában fordul elő. *(3, 5)*.

Gyakran alkalmaznak oszlopkromatográfiás eljárást a zavaró komponensek és a szappanosítást kísérő bomlástermékek elválasztására. Az elszappanosítás alatt és az azt követő eljárások során a vitaminok könnyen oxidálódhatnak, ezért fokozott védelemre van szükség.

Az elszappanosítást követő oszlopkromatográfiás tisztítás és ezután végzett fotometriás meghatározás időigényes eljárás, ezért egyéb módszerek alkalmazása is előtérbe került. A K-vitaminok és E-vitaminok elválasztására és meghatározására gázkromatográfiás módszereket is alkalmaztak, de az A-, és D-vitamin hőérzékenysége miatt ezekre ez az út nem volt közvetlenül és megbízhatóan járható.

A zsíroldható vitaminok analitikájában az intenzív folyadékkromatográfiás módszerek bevezetése jelentős előrelépést jelentett. Ezek a módszerek nem igényelnek nagyobb hőmérsékletet, és a mintaelőkészítés igényük is minimális *(4, 5, 6, 7)*.

Vizsgálataink során azért alkalmaztuk az elszappanosításon alapuló eljárást, mivel ez ad lehetőséget kapszulázással védett vitaminok kinyerésére, és a különböző formában (vitaminalkohol, különféle észterek pl.: acetát, zsírsavészter) jelenlevő vitamin származékok együttes meghatározására.

A vitaminok és vitamin származékok elválasztásában elsősorban a reverz fázisokat alkalmazzák, addig a vitamin izomerek elválasztásában a szilikagél állófázisok alkalmazása hozott sikereket. *(3, 4, 7, 8)*.

Detektálásra a zsíroldható vitaminok esetében az UV detektorok alkalmasak, mint ez az *1. táblázatból* jól látható, ahol a fontosabb zsíroldható vitaminok UV abszorpciós sávjait foglaltuk össze.

1. táblázat

Zsíroldható vitaminok UV elnyelési sávjai

Vitamin	Abszorbancia max. nm	Fajlagos abszorbancia Absz./cm
A	325	1750
E	292	72
K	244	1150
D	264,5	458,9

A meghatározás érzékenysége a leggyengébben abszorbeáló E-vitamin esetében fluoreszcens detektálással lényegesen javítható. Ebben az esetben 292 nm-es gerjesztést és 330 nm-es detektálást javasolnak *(3)*.

Kutatásaink során A- és E-vitaminnal dúsított premixek és takarmányok vizsgálatára dolgoztunk ki intenzív kromatográfiás módszereket. Ezeket a vitaminokat gyakran alkalmazzák takarmányok dúsítására, mivel az állati szervezetnek a takarmányok természetes vitamintartalma nem elegendő, vagy mennyisége bizonytalan. A kiegészítés történhet vitaminokkal, vagy vitaminészter formában. Gyakran alkalmaznak zselatinkapszulába zárt stabilizált vitaminkészítményeket. Újabban ciklodextrinekből készített molekulárisan „kapszulázott" vitaminkészítmények alkalmazásáról is beszámoltak.

Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkhoz BCR gyártmányú komplett premixeket és darás takarmányokat alkalmaztunk frissen gyártás után, illetve hosszabb tárolás után.

Az A- és E-vitamint elszappanosítást követően hexános extrakcióval nyertük ki. *(3, 5, 6, 7, 8)*

Elszappanosítás és extrakció.

1 g premixmintát, vagy 10 g takarmánymintát mértünk visszafolyó hűtővel felszerelt gömblombikba, majd 0,3 g aszkorbinsavat, 20 cm^3 desztillált vizet, 15 cm^3 50% (m/m)-os kálium-hidroxid oldatot és 50 cm^3 etanolt adtunk, majd 60 percig vízfürdőben forraltuk. A lehűtött elegyet redős szűrőpapíron keresztül választótölcsérbe szűrtük, a lombikot és a szűrőket 50 cm^3 etanollal átöblítettük és a szűrletet 3×50 cm^3 hexánnal, vagy petroléterrel extraháltuk. A hexános fázist Rotadeszt (KUTESZ) gyártmány rotációs vákuumbepárló berendezésben szárazra pároltuk és 10 cm^3 etanolban oldottuk.

A-vitamin meghatározás körülményei.
Az alkalmazott berendezés.

A vizsgálatokhoz Waters gyártmányú, izokratikus felépítésű folyadékkromatográfot használtunk, amely a következő egységekből állt:

M 6000 A – típusú nagynyomású szivattyú és eluenskezelő rendszer, 400 bar nyomásig 0,1 – 10 cm^3/min. sebességgel (0,1 cm^3/min. lépésekben) szállíthat.

M 6 K – Mintabevívő szelep. Mikrofecskendővel 1 mm^3-től – 2 cm^3-ig használható.

M 440 – UV detektor 10 mm^3 térfogatú mérőcellával, a mérési hullámhossz 254 – 560 nm tartományban interferenciaszűrőkkel állítható be.

816 – 4 – KUTESZ gyártmányú kompenzográf.

Az elválasztó oszlopok kereskedelmi, illetve saját töltésű oszlopok voltak.

2. táblázat

Premixek A- és E-vitamin tartalmának elválasztásánál alkalmazott paraméterek

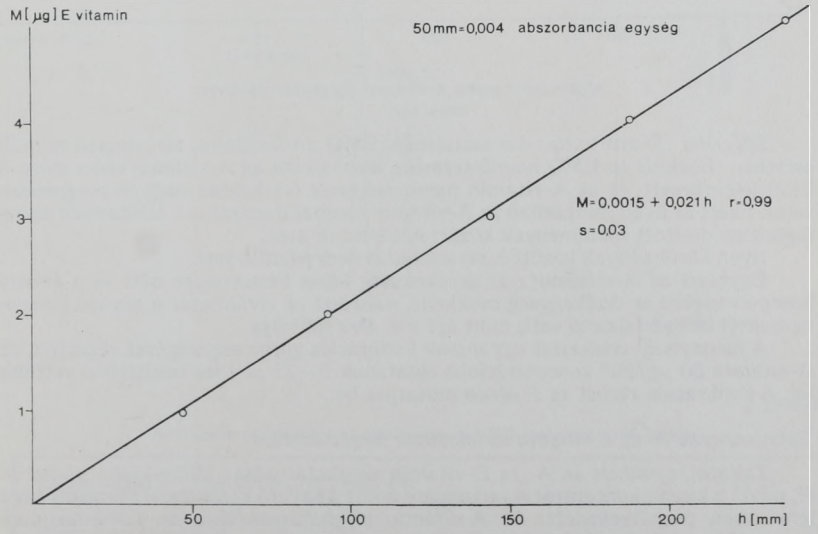
Elválasztó oszlop: μ Bondapack 10 C 18 300×4 Eluens: 95% (v/v) metanol vízben Áramlási sebesség: 2 cm^3/min. Nyomás: 200 bar Mintamennyiség: 5 μl Detektor: UV 280 nm Érzékenység: Az A-vitamin esetén 0,2 N/10 mV Az E-vitamin esetén 0,05 A/10 mV

A-vitamin meghatározás körülményei premixek esetén.

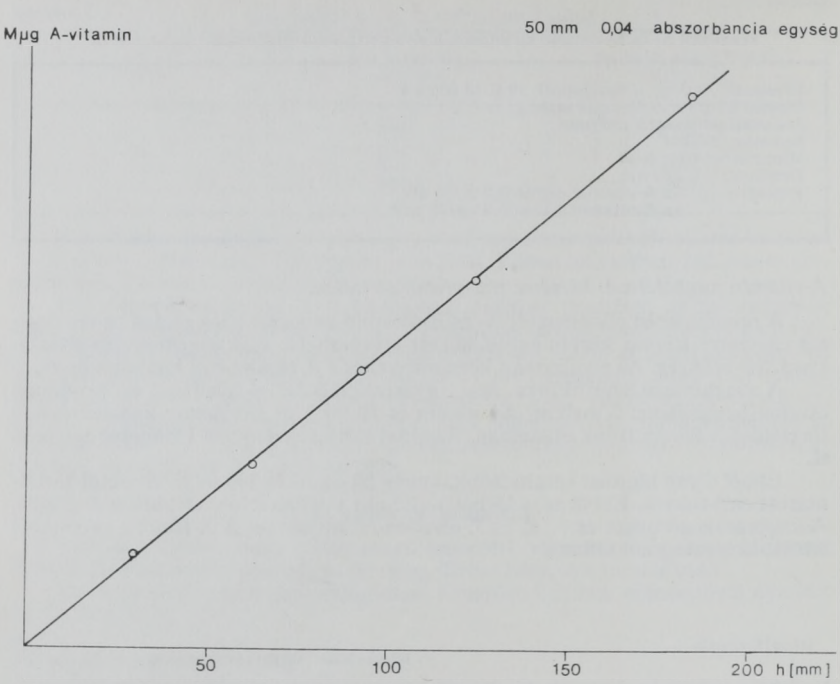
A premixekben alkalmazott A- és E-vitamin koncentrációk esetén az elválasztás egyszerre azonos körülmények között elvégezhető, csak érzékenységváltoztatásra van szükség. Az elválasztási körülményeket a 2. *táblázatban* foglaltuk össze.

A meghatározáshoz Fluka AG. gyártmányú DL-α-tokoferol és A-vitamin alkohol bemérésével 5 mg/cm^3 A-vitamin és 10 mg/cm^3 E-vitamin koncentrációjú törzsoldatot készítettünk etanolban. Az oldat hűtőszekrényben 1 hónapig tartható el.

Ebből olyan higítást készítettünk, amely 50 μg A- és 200 μg E-vitamint tartalmazott cm^3-enként. Ebből az oldatból 5–25 μl-t vittünk a folyadékkromatográfba. A kalibrációs görbéket az *1.*, 2. és *3. ábrákon* mutatjuk be. A *3. ábrán* a premixből felvett kromatogram látható.



1. ábra
Kalibrációs görbe E-vitamin meghatározásához



2. ábra
Kalibrációs görbe A-vitamin meghatározásához

Speciális zavaró hatást tapasztaltunk EMQ antioxidánst tartalmazó minták esetében. Ezeknél az EMQ bomlásterméke közvetlenül az A-vitamin csúcs előtt és után jelentkezett, és az A-vitamin mennyiségének értékelését nagyon megnehezítette. Ezért az ilyen mintákban az A-vitamin meghatározását a *3. táblázatban* összefoglalt módosított körülmények között határoztuk meg.

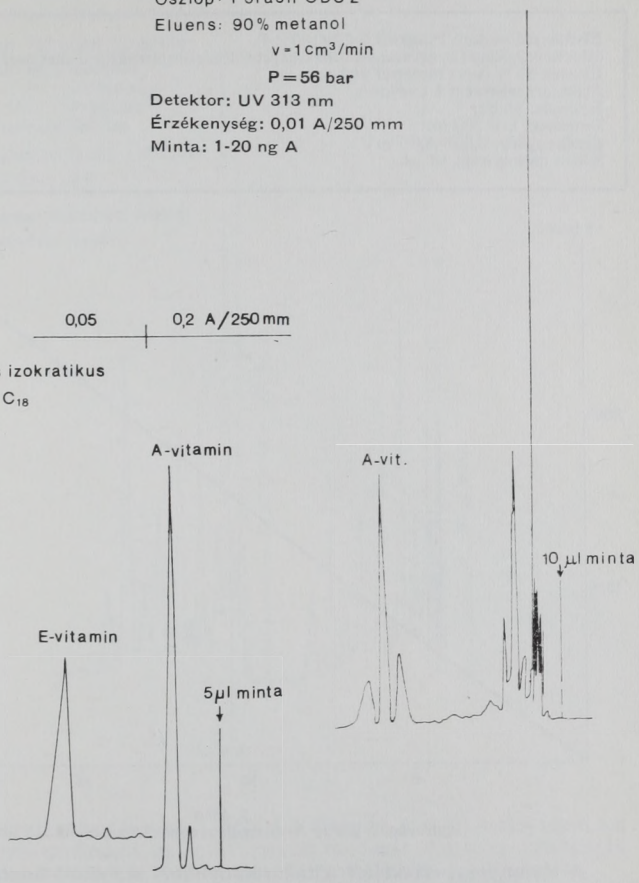
Ilyen körülmények között a zavaró hatás nem jelentkezett.

Egyrészt az A-vitaminra az érzékenység közel kétszeresére nőtt és a zavaró komponensekre az érzékenység csökkent, másrészt az elválasztás a zavaró komponensektől kifogástalanná vált, mint azt a *4. ábra* mutatja.

A mennyiségi értékelést ugyancsak kalibrációs görbe segítségével végeztük, az A-vitamin 50 $\mu g/cm^3$ koncentrációjú oldatának 5–25 μl-ének bevitelével vettünk fel. A kalibrációs görbét az *5. ábrán* mutatjuk be.

Takarmányok A- és E-vitamin tartalmának meghatározása

Takarmányokban az A- és E-vitamin meghatározását külön-külön végeztük el, mivel a kisebb koncentráció tartomány miatt a zavaró komponensek mennyisége lényegesen megnövekedett. Az A-vitamin meghatározásához az EMQ-tartalmú premixekben kifejlesztett módszert alkalmaztuk azzal az eltéréssel, hogy az érzékenységet megnöveltük az A-vitamin koncentráció szintnek megfelelően. (0,05 A/10mV).



3. ábra *4. ábra*

3. táblázat

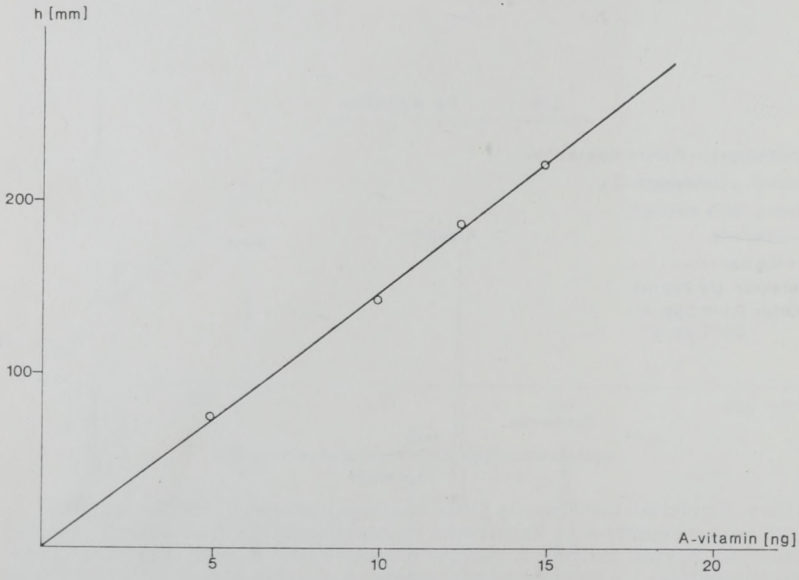
A-vitamin meghatározás körülményei EMQ tartalmú premixekben

Elválasztó oszlop: Partisil 10 ODS 2 (250×4) Eluens: 90 % metanol Áramlási sebesség: 1 cm³/min. Minta mennyiség: 5 μl Detektor: UV 313 nm Érzékenység: 0,5 A/10 mV

4. táblázat

A takarmányok E-vitamin tartalmának meghatározásánál alkalmazott körülmények

Elválasztó oszlop: Poligosil 5 C8 (150×4)
(Macherey-Nagel gyártmányú töltet, saját töltés széntetraklorid-metanol eleggyel)
Eluens: 85% (v/v) metanol vízben
Áramlási sebesség: 1 cm^3/min.
Nyomás: 85 bar
Detektor: UV 280 nm
Érzékenység: 0,005 A/10 mV
Minta mennyiség: 10 μl

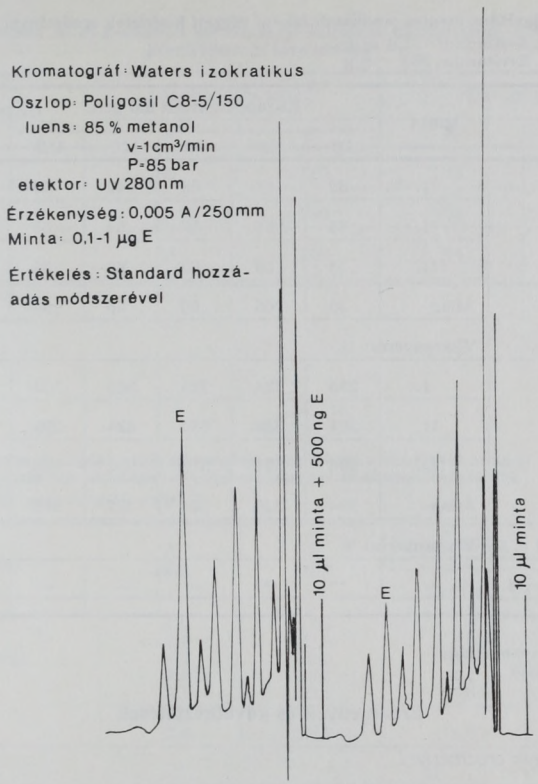


5. ábra
Kalibrációs görbe A-vitamin meghatározásához 313 nm-en

A mennyiségi értékelést a takarmányoknál standard hozzáadás módszerével végeztük. A minta kromatogram felvétele után a minta ismert térfogatú mennyiségével együtt 5 μl 4 μg/cm^3 koncentrációjú A-vitamin standard oldatot injektáltunk, és a kromatogram felvételét megismételtük. A standard hozzáadás egyértelműen azonosíthatóvá tette a kromatogramon az A-vitamin csúcsát, és a mennyiségi értékelést az alábbi összefüggés felhasználásával végeztük:

$$C = \frac{h_1 \, m}{v \, (h_2 - h_1)}$$

ahol c = az injektált oldat vitaminkoncentrációja (μg/cm^3),
h_1 = a vitamin csúcs magassága a minta kromatogramján (mm),
h_2 = a vitamin csúcs magassága a standard hozzáadása után (mm),
m = a mintához adott standard mennyisége (μg),
v = a minta térfogata (cm^3).



6. ábra

Az E-vitamin meghatározása sok problémát okozott, a C 18 oszlopokról túl hosszú retenciós idővel eluálódott, ez az elválasztás romlását okozta és igen hosszú elválasztási időt igényelt. Ezért az elválasztást Poligosil C8 oszlopon végeztük.

Az elválasztási paramétereket a *4. táblázatban* foglaltuk össze.

A mennyiségi értékelést standard hozzáadás módszerével végeztük 5 μl 100 μg/cm^3 koncentrációjú oldat hozzáadásával. Az értékelés az A-vitaminnal azonos módszerrel történt.

A *6. ábrán* takarmány mintából felvett kromatogramot mutatunk be E-vitamin meghatározására.

5. táblázat

Antioxidáns mentes premixmintákkal végzett kísérletek eredményei

deklarált értékek: A-vitamin: 71,8 μg/g
E-vitamin: 260 μg/g

Vitamin	Minta	Elszappanosítási idő perc					Minta* 50 μg A 350 μg E
		20	40	60	120	180	
A μg/g	I.	39	74	66	49	56	131
	II.	45	65	52	54	51	78
	III.	33	59	62	65	55	100
	Átlag	39	66	60	56	54	103
	Visszanyerési %						86%
E μg/g	I.	285	324	328	365	302	640
	II.	301	330	334	324	299	611
	III.	296	324	310	292	296	636
	Átlag	294	326	324	327	299	629
	Visszanyerési %						87%
Di- és monoglicerid		**	(*)	–	–	–	

** igen sok
(*) kimutatható, nyomokban
– nem detektálható

Eredmények és következtetések

Premixvizsgálatok eredményei

A premixek esetében három kérdést vizsgáltunk:

a) Az elszappanosítási idő hatásának vizsgálata. Túl rövid elszappanosítás zavaró lipidkomponenseket visz be a rendszerbe, míg túl hosszú elszappanosítás a vitamintartalomban veszteséget okozhat.
b) A meghatározás szórásának vizsgálata.
c) A vitamin visszanyerési hatásfokának vizsgálata.

Az első két kérdés vizsgálatához 3 – 3 premixmintát 20 – 300 perc elszappanosítási idő után a leírt módszerrel vizsgáltunk meg.

A visszanyerhetőség vizsgálatára az elszappanosítandó mintához ismert mennyiségű A- és E-vitamint adtunk standard oldatok felhasználásával. Az eredményeket az *5. táblázatban* foglaltuk össze.

A mono- és diglicerideket a hexános extrakt rétegkromatográfiás vizsgálata alapján jelöltük be a táblázatba. Az extraktból 100 μl-t Kieselgél G rétegen hexán : éter = 7 : 3 eleggyel kifejlesztettük, jódgőzzel előhívva értékeltük.

Az A-vitamin meghatározás esetén a meghatározás szórása ±6,3 μg/g érték volt 10 szabadsági fokkal, az E-vitamin meghatározás szórása ±13 μg/g érték 10 szabadsági fokkal. A visszanyerhetőség 80 és 90% közötti; ez elsősorban az elszappanosítást követő szűrési és extrakciós műveletek eredménye.

6. táblázat

Komplett premixminta A- és E-vitamin tartalmának változása tárolás során EMQ antioxidáns jelenlétében és távollétében

Tárolási idő hét	Antioxidáns nélkül		2530 μg/g EMÉ	
	A	E	A	E
0	60	310	73	225
8	61	280	64	225
12	71	200	74	190

7. táblázat

Az antioxidánsmentes és EMQ tartalmú komplett premix-szel készített takarmány A- és E-vitamin tartalmának meghatározási eredményei és visszanyerhetősége

Deklarált érték: 3,6 μg/g A és 13 μg/g E

Takarmány	A μg/g	E μg/g	Minta + 36 μg A és + 130 μg E	
			A μg/g	E μg/g
Antioxidáns nélkül	1,9	22,8	5,9	33,9
	2,8	23,8	4,6	32,7
	1,7	22,9	5,3	36,0
	2,0	26,5	4,4	35,1
	2,1	23,8	5,0	36,4
Átlag	2,1	24,0	5,0	34,8
Visszanyerési %			81	83
127 μg/g EMÉ-t tart. takarmány	2,4	20,2	5,9	29,3
	2,0	18,8	6,0	32,5
	3,7	17,3	6,9	29,0
	1,9	15,6	5,5	31,0
	3,0	18,1	4,6	28,3
Átlag	2,6	18,0	5,8	30,0
Visszanyerési %			89	92

Az elszappanosítás idejét a kísérletek alapján 60 percre választottuk, amely tökéletes elszappanosítást biztosított, de bomlást még nem tapasztaltunk.

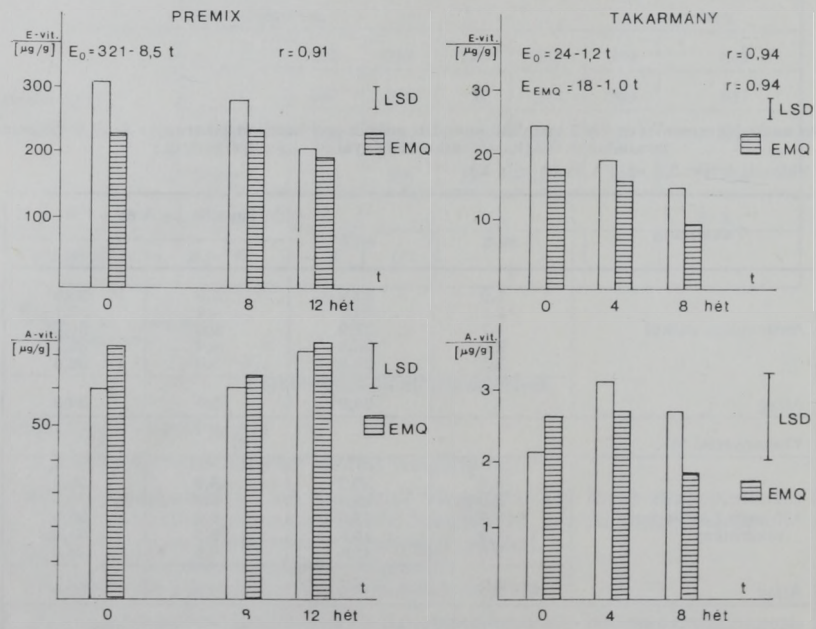
A kidolgozott módszerrel egy antioxidáns mentes és egy EMQ-t tartalmazó komplett premix minta A- és E-vitamin tartalmának változását követtük 3 hónapos tárolás során. A kísérlet eredményeit a *6. táblázatban* foglatuk össze és a 8. *ábrán* a legkisebb szignifikáns különbségnek megfelelő távolságot is feltüntettük (t $s/\sqrt{n}$)

A *6. táblázatban* összefoglalt eredmények alapján az A-vitamin tartalom a premixekben 12 hetes tárolás alatt szignifikánsan nem változott.

8. táblázat

Takarmányok A- és E-vitamin tartalmának változása tárolás során

Tárolási idő	Antioxidáns nélkül		127 μg/g EMQ-val	
	A μg/g	E μg/g	A μg/g	E μg/g
0	2,1	24	2,6	18
4	3,2	18	2,7	16
8	2,7	15	1,8	9



7. ábra

Az E-vitamin tartalom az antioxidánst nem tartalmazó premixben szignifikánsan csökkent. A csökkenés 2,6%/hét. Mivel még a 12. héten is jelentős mennyiségű E-vitamin volt jelen, feltételezhető, hogy ez fejtett ki védőhatást az A-vitaminra, és ennek mennyisége azért nem változott, illetve az sem kizárt, hogy a komplett premix készítéshez speciálisan stabilizált A-vitamin készítményt használtak fel. A kidolgozott módszer alkalmas a premixek hatóanyagtartalmának, illetve a hatóanyagtartalom változásának meghatározására.

Takarmányok vizsgálatának eredményei

Vizsgálataink kiterjedtek a meghatározás pontosságának, valamint a visszanyerhetőségnek a meghatározására. Itt már a premixeknél megfelelőnek talált elszappanosítási idővel dolgoztunk.

A vizsgálati eredményeinket a 7. *táblázatban* foglaltuk össze.

Az A-vitamin meghatározás szórása = 0,6 μg/g szab. fok 16.

Az E-vitamin meghatározás szórása = 1,6 μg/g szab. fok 16.

A visszanyerhetőséget a premixmintánál megfigyelt értéknek megfelelően találtuk.

A kidolgozott módszerrel vizsgáltuk a takarmányok A- és E-vitamin tartalmának tárolás alatti viselkedését (Lásd *8. táblázat* és *7. ábra*). Az A-vitamin tartalomban a komplett premixmintákhoz hasonlóan szignifikáns változás nem következett be, azonban az E-vitamin tartalom csökkenése mindkét takarmányban szignifikáns. A változás lineáris modellel közelítve az alábbi egyenletekkel írható le:

Antioxidáns mentes takarmány:

$C = 24 - 1{,}2\ t \qquad r = 0{,}94$

EMQ tartalmú takarmány:

$C = 18 - 1{,}0\ t \qquad r = 0{,}94$

C = a takarmány E-vitamintartalma μg/g

t = tárolási idő hét

Az antioxidánst tartalmazó takarmányban a csökkenés 20%-kal kisebb, mint az antioxidánst nem tartalmazó takarmányban.

A kidolgozott módszer tehát alkalmas a takarmányok hatóanyag-tartalmának meghatározására, illetve a változások kinetikus követésére.

IRODALOM

(1) *Freed, M.;* Methods of Vitamin Analysis. Interscience Press, New York, 1966.
(2) *Sebrell, W. H., Harris, R. S.;* The Vitamins Academic Press, New York , 1964.
(3) *Williams, R. C. et. al.;* J. Chromatog. Sci. *10*, 494, 1972.
(4) *Barnett, S. A. et al.;* Anal. Chem. *52*, 610, 1980.
(5) *Eriksen, S.;* JAOAC *63*, 1154, 1980.
(6) *Söderhjelm, P., Anderson, B.;* J. Sci. Food Agric. *29*, 697, 1978.
(7) *Widicus, W. A., Kirk, J. R.;* JAOAC *62*, 637, 1979.
(8) *Rückeman, H., Ranfft, K.;* Z. Lebensm. Unters. Forsch. *166*, 151, 1973.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИН С ПОМОЩЬЮ ИНТЕНСИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ А И Е ВИТАМИН

Ф. Ёрши и А. Аброхам – Сабо

Авторы адаптировали описанный в литературе метод жидкостной хроматографии для определения витамин А и Е.

Авторы провели дальнейшее усовершенствование метода и разработали его для отделения, проводимого из животного корма и из премиксов.

После омыления проб, применяли отделение в реверсной неподвижной фазе с последующим уф детектированием.

Исследовали омыление и мешающее действие некоторых антиоксидантов.

DETERMINATION OF LIPOSOLUBLE VITAMINS BY INTENSIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY I. DETERMINATION OF VITAMIN A AND VITAMIN E

F. Örsi and Á. Ábrahám – Szabó

The liquid chromatographic method described in literature has been adapted by the authors for the determination of vitamin A and vitamin E. On a further development of the method a procedure has been evolved for the separation of these vitamins from premixes and fodders. Subsequent to the saponification of the samples a separation carried out in a reversed stable phase and detection by UV were applied. The interfering effect of the saponification and of some antioxidants were investigated.

BESTIMMUNG VON FETTLÖSLICHEN VITAMINEN MITTELS INTENSIVER FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE I. BESTIMMUNG VON VITAMIN A UND VITAMIN E

F. Örsi und Á. Ábrahám – Szabó

Die in der Literatur beschriebene Methode der Flüssigkeitschromatographie wurde von den Autoren zur Bestimmung von Vitamin A und Vitamin E angewendet. Durch eine weitere Entwicklung der Methode erhielt man ein Verfahren zur Trennung dieser Vitamine von Premixen und Futtermitteln. Nach der Verseifung der Muster wurde eine Abtrannung auf einer verkehrten stabilen Phase mittels UV-Nachweis angewendet. Die störende Wirkung der Verseifung und einiger Antioxydationsmittel wurde untersucht.

LE DOSAGE DES VITAMINES SOLOUBLES EN MATIÈRE GRASSE PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE I. LE DOSAGE DE LA TENEUR EN VITAMINES A ET E

F. Örsi et Á. Ábrahám – Szabó

Les auteurs ont adapté une méthode de chromatographie en phase liquide rapportée dans la bibliographie pour la détermination les vitamines A et E.

Il ont développé cette méthode pour faire propre à la séparation des vitamines dans les fourrages.

Ils ont employé une UV-détection après la saponification et la séparation en phase stationnaire inverse.

La saponification et l'action troublante de certains antioxidants ont été analysées.