

JOANNA SOBOLEWSKA, JACEK ROŻNOWSKI, TERESA FORTUNA

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WITAMIN A I E METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC) W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Streszczenie

W publikacji opisano oznaczanie zawartości podstawowych form witamin A i E w margarynie i kiełbasie pasztetowej, przy wykorzystaniu HPLC w odwróconym układzie faz, z zastosowaniem detektora UV-VIS. Zwrócono szczególną uwagę na wpływ sposobu przygotowania próbki na oznaczaną zawartość substancji (optymalizacja warunków zmydlania). Dokonano statystycznego opracowania wyników na przykładzie badanej margaryny i wyznaczono współczynniki zmienności (*RSD*) dla obu witamin.

Wstęp

Pod określeniem *witamina A* rozumie się dwie grupy związków: witamina A₁ (retinol, dawniej zwany akseroftolem), witamina A₂ (3,4-didehydroretinol; 3-dehydroretinol) wraz z ich biologicznie czynnymi izomerami, pochodnymi aldehydowymi, kwasowymi i estrowymi [11].

Metody biologiczne oznaczania witaminy A polegają na podawaniu jej preparatów (w postaci prowitamin i witamin) szczurom wykazującym wyraźne objawy hipowitaminozy. Zaletą tego postępowania jest wszechstronna ocena preparatu, gdyż wyniki zależą nie tylko od aktywności składników preparatu, ale również od ich przyswajalności [6]. Metody fizykochemiczne stosowane do oznaczania tej witaminy są metodami spektrofotometrycznymi, fluorescencyjnymi lub chromatograficznymi. Wśród metod opartych na pomiarze natężenia promieniowania, największą czułością charakteryzuje się metoda fluorymetryczna ($\lambda_{wzb} = 480 \text{ nm}$) [6, 10], lecz wymaga ona chromatograficznego oczyszczenia próbki w celu usunięcia przede wszystkim barwników

polienowych. Metoda Carr-Price'a oparta jest na reakcji witaminy A i jej estrów z chlorkiem antymonu(III) [4, 6, 10] lub kwasem trichloro- lub trifluorooctowym [6, 10], w której następuje przesunięcie pasma absorpcji wiązań podwójnych, a powstający kompleks ma szybko zanikające niebieskie zabarwienie ($\lambda = 620$ nm). Trzykrotnie mniej czułą i wymagającą znacznie bardziej czystych roztworów jest metoda pomiaru absorbancji próbki alkoholowej ($\lambda = 325$ nm) [4, 10]. Znaczny wzrost czułości następuje po uprzednim oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej w odwróconym układzie faz. Zasada ta jest podstawą analizy chromatograficznej wykorzystującej detektor UV [6, 7].

Nazwa *witamina E* obejmuje rodzinę tokoferoli, czyli metylowanych pochodnych [11]:

- tokolu (2-metylo-2(4',8',12'-trimetylotridecylo)-6-hydroksychromanu),
- tokotrienolu (2-metylo-2(4',8',12'-trimetylotridecylo-3',7',11'-trienylo)-6-hydroksychromanu).

Metody biologiczne oznaczania witaminy E polegają na podawaniu samicom szczurów, hodowanych na diecie bez tokoferolu, karmy zawierającej określoną ilość tej witaminy. W przypadku gdy dawka jest większa od pewnej wartości progowej, ciąża przebiega i kończy się normalnie. Metoda ta jest bardzo specyficzna i wystarczająco dokładna, chociaż bardzo czasochłonna [6]. Fizykochemicznymi metodami są: spektrofotometryczne oznaczanie czerwono zabarwionego kompleksu Fe^{2+} (powstającego w reakcji tokoferoli z Fe^{3+}) i 2,2'-bipirydyłu (reakcja Emmerie-Engel) [4, 10]. Stężenie kompleksu jest proporcjonalne do zawartości tokoferolu. Po zastąpieniu bipirydyłu batofenantroliną (4,7-difenylo-1,10-fenantroliną), następuje zwiększenie czułości metody [10]. Miareczkowanie czystego α -tokoferolu można prowadzić używając jako titranta alkoholowego roztworu siarczanu(VI) ceru(IV) wobec difenyloaminy jako wskaźnika [6]. Koniec miareczkowania wskazuje pojawienie się niebieskiego zabarwienia. Analiza próbek spożywczych musi zostać poprzedzona rozdzielaniem α -tokoferolu od innych substancji towarzyszących np. za pomocą cieczerwowej chromatografii kolumnowej, bibułowej lub cienkowarstwowej. Bardzo przydatna jest metoda HPLC, a rozdzielone związki można identyfikować kolorymetrycznie, spektrofluorymetrycznie czy spektrofotometrycznie [4, 6].

Analiza chromatograficzna

Ze względu na właściwości fizykochemiczne witamin A i E możliwe jest przeprowadzenie równoczesnej analizy obu witamin stosując metodę HPLC. Ponieważ witaminy te są wyjątkowo wrażliwe na działanie światła, obecność tlenu, temperaturę i środowisko zasadowe, od pierwszego etapu analizy należy zwracać szczególną uwagę

na sposób jej prowadzenia, aby nie przyczynić się do rozkładu substancji oznaczanych [9, 12].

Początkowo, przy użyciu alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu o stężeniu 60–80%, prowadzi się zmydlanie frakcji tłuszczowej, w której witaminy są rozpuszczone [2, 9, 12]. Często zalecane jest wykonanie wcześniejszej ekstrakcji tłuszczu metodą Soxhleta [8, 9, 12]. Należy pamiętać o dodaniu przeciwutleniaczy, którymi mogą być: kwas askorbinowy, pirogallol, hydrochinon, BHT (butylohydroksytoluen). Zalecane jest przeprowadzanie procesu zmydlania w atmosferze gazu obojętnego [1, 2, 9, 12]. Niektórzy autorzy podają, że czas zmydlania powinien wynosić od 20 do 40 minut w temperaturze 70°C [4, 12], a nawet wyższej. Inni zaś twierdzą, że warunki te są zbyt agresywne i zalecają zmydlanie w temperaturze pokojowej przez całą dobę [1, 12].

Po etapie uwolnienia witamin z próbki przeprowadza się ich ekstrakcję. Najczęściej używa się heksanu, chloroformu, eteru etylowego lub nafty. W celu usunięcia resztek mydeł, po zebraniu ekstraktu przemywa się go wodą, do momentu, aż woda po płukaniu nie będzie wykazywała odczynu zasadowego (nie zabarwi fenoloftaleiny) [1, 4, 12]. Następnie ekstrakt witamin zagęszcza się na wyparce próżniowej. Ostatecznie pozostałość po destylacji rozpuszcza się w niewielkiej ilości fazy ruchomej.

Nowoczesne metody przygotowania próbki, do których należy ekstrakcja do fazy stałej (SPE) pozwalają na eliminację procesu zmydlania [2]. Dzięki temu można oznaczyć równocześnie wszystkie formy wolnych witamin, w tym także ich formy estrowe.

Do oznaczenia witamin A i E mogą służyć zestawy do HPLC, pracujące zarówno w normalnym układzie faz (NP) lub w odwróconym układzie faz (RP) [9, 10, 12]. W tych pierwszych, fazę ruchomą stanowi heksan – często z dodatkiem chloroformu i związku bardziej polarnego np. 2-propanolu lub metanolu. Fazę ruchomą mogą tworzyć mieszaniny: heksan : 2-propanol (99,5 : 0,5) [7, 9], heksan : chloroform (85 : 15) [13]. W przypadku odwróconego układu faz, eluentem może być metanol lub jego mieszanina z wodą, acetonitrylem, kwasem octowym [1, 9, 14]. Do detekcji używa się najczęściej detektorów UV-VIS [1, 3, 7, 8, 12] oraz spektrofluorocencyjnych [9], a dla bardzo niskich stężeń - elektrochemicznych [2].

Materiał i metody badań

Materiałem badawczym były margaryna Flora wyprodukowana przez Unilever Polska S.A. oraz kiełbasa paszтетowa z Zakładów Mięśnych „IGAR” w Rabce. Zawartość analizowanych witamin A i E oznaczono przy użyciu zestawu do wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej firmy Merck Hitachi w odwróconym układzie faz przy użyciu kolumny LiChrosfer®100 (250×4,6 nm) z przedkolumną. Detekcję spektrofotometryczną do oznaczania witaminy A wykonano przy długości fali $\lambda = 325$ nm,

a w przypadku witaminy E – $\lambda = 290$ nm. Jako eluentu użyto metanolu (czystość do HPLC firmy Merck) o szybkości przepływu 2 ml/min. Analizę wykonano w temperaturze pokojowej. Substancjami użytymi do wykonania krzywej kalibracyjnej były czyste chemicznie formy witamin o największej aktywności biologicznej: trans-retinol (Sigma min. 95%) – wzorzec witaminy A i α -tokoferol (Sigma min. 95%) – wzorzec witaminy E.

Do analizy ilościowej zastosowano metodę wzorca zewnętrznego, nastrzykując kolejno metanolowe roztwory oznaczanej witaminy w dawkach o rosnącym stężeniu w zakresie $3,12 \div 500,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ dla witaminy A. Dla witaminy E zakres stężeń wynosił $6,25 \div 1000,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Postępowanie takie pozwala wyznaczyć funkcyjną zależność powierzchni pod pikiem chromatograficznym, od stężenia odpowiedniej witaminy w próbce.

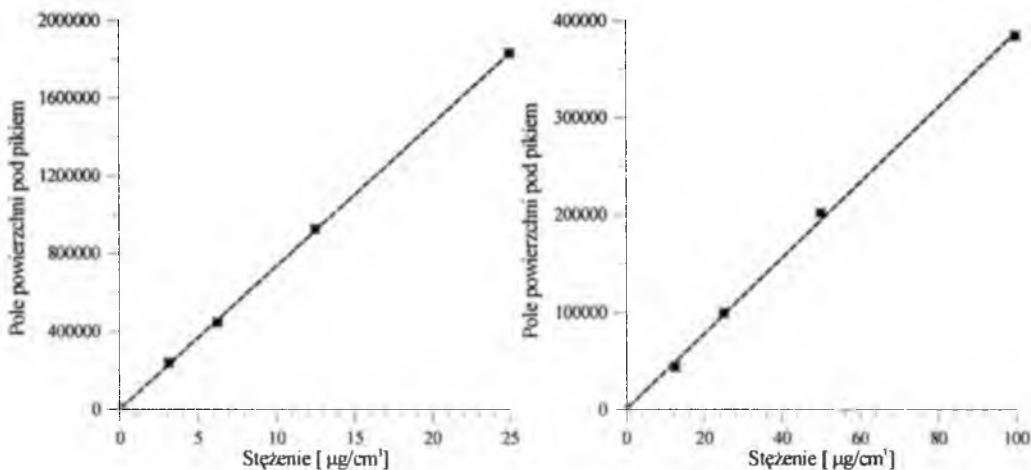
Przygotowanie próbki gotowej do nastrzyku składało się z następujących etapów: izolacji witamin w procesie zmydlania, ekstrakcji, zagęszczania próbki i odpowiedniego rozcieńczenia analitu.

Na etapie zmydlania potraktowano próbkę alkoholowym roztworem wodorotlenku potasu z dodatkiem hydrochinonu jako przeciwutleniacza, wytrząsano z częstotliwością 150 obr/min w temperaturze 45°C przez 60 min, po czym podniesiono temperaturę do 70°C i zmydlano do momentu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Po ostudzeniu zmydlonej próbki do temperatury pokojowej, prowadzono trzykrotnie ekstrakcję mieszaniną heksan : chloroform (2:1; v/v). W celu usunięcia mydeł, otrzymany ekstrakt przepłukano 3–4 razy wodą destylowaną wytrząsając go w rozdzielaczu. Ekstrakt osuszono z pozostałości wody sącząc go pod próżnią przez sączek Schotta wypełniony bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Następnie odparowano rozpuszczalnik w rotacyjnej wyparce próżniowej w temperaturze 50°C . Zagęszczony ekstrakt witaminowy odpowiednio rozcieńczono w metanolu i przesączono przez karbowany sączek z bibuły (prod. POCh – o średniej szybkości sączenia) do kolby miarowej. Tak przygotowany ekstrakt nastrzykiwano na kolumnę.

Wyniki i dyskusja

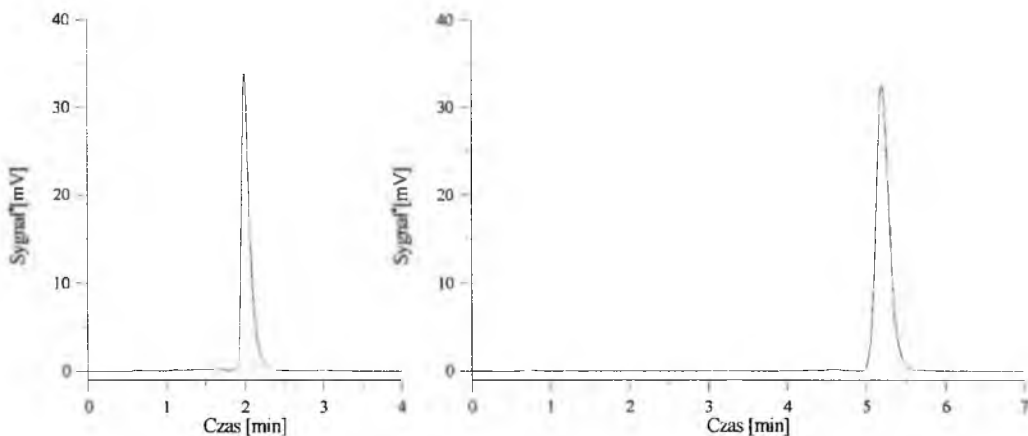
Sporządzone krzywe kalibracyjne pozwalają określić czasy retencji analizowanych witamin oraz wyznaczyć współczynniki korelacji liniowej.

Zakres liniowości krzywych kalibracyjnych (rys. 1) ze współczynnikami korelacji $R > 0,99$ dla witaminy A wynosi $3,12 \div 500,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, a dla witaminy E $6,25 \div 1000,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Czas retencji wzorca witaminy A wynosi 2,00 min, a witaminy E 5,20 min. Typowe chromatogramy substancji wzorcowych przedstawiono na rys. 2.



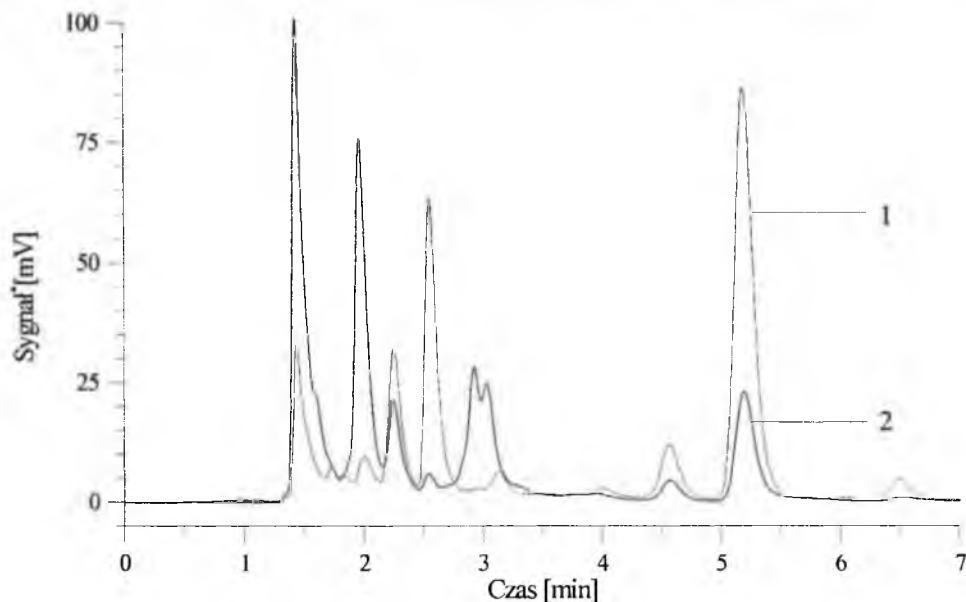
Rys. 1. Krzywe kalibracyjne: 1 – trans-retinolu ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tokoferolu ($\lambda = 290$ nm).
 * absorbancja jest wyrażona w jednostkach napięcia [mV] sygnału analogowego wysyłanego na rejestrator.

Fig. 1. Calibration curves: 1 – axophterol ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tocopherol ($\lambda = 290$ nm).
 * absorbance was expressed as voltage unit [mV] of an analog signal sent to data recorder.



Rys. 2. Chromatogramy wzorców: 1 – trans-retinolu ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tokoferolu ($\lambda = 290$ nm).

Fig. 2. HPLC chromatograms of standards: 1 – axophterol ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tocopherol ($\lambda = 290$ nm).



Rys. 3. Chromatogram ekstraktu witaminy E z margaryny ($\lambda = 290$ nm): 1 – optymalne warunki zmydlenia, 2 – nieoptymalne warunki zmydlenia.

Fig. 3. HPLC chromatogram of vitamin E extract from margarine ($\lambda = 290$ nm): 1 – optimal saponification conditions, 2 – unoptimal saponification conditions.

Dostępne metody oznaczania witamin A i E metodą HPLC w układzie odwróconych faz podają czas retencji dla witaminy A w zakresie 0,95÷5,5 min, natomiast dla witaminy E – 1,3÷19,0 min [1, 9, 10]. Rozpiętość czasów retencji jest dość duża, co jest szczególnie widoczne w przypadku witaminy E. Fakt ten można tłumaczyć stosowaniem rozmaitych eluentów, zawierających różne proporcje wody, metanolu, a nawet acetonitrylu [1, 3, 7, 8, 9, 13].

Oznaczona zawartość witaminy A w badanej margarynie wynosiła 924 $\mu\text{g}/100$ g, w kiełbasie paszтетowej 3256 $\mu\text{g}/100$ g, natomiast zawartość witaminy E odpowiednio: 31 $\text{mg}/100$ g i 0,24 $\text{mg}/100\text{g}$. Wyniki zawartości witamin A i E w margarynie porównano z ilościami deklarowanymi przez producenta na opakowaniu (tab. 1). Porównano je także z wartościami podanymi w tabelach składu i wartości odżywczych [5], które w odniesieniu do 100 g margaryny wynoszą: 600 μg witaminy A oraz 31,51 mg witaminy E. W tablicach brak jest pozycji "kiełbasa paszтетowa". Ponieważ składa się ona głównie z podrobów i wątroby wieprzowej, tę ostatnią przedstawiono poniżej; opisana wątroba zawiera średnio około 2931 μg witaminy A (wartość bliska w oznaczonej próbce) oraz 0,11 mg witaminy E (wartość dwukrotnie niższa od oznaczonej) [5].

Na podstawie siedmiu powtórzeń analizy margaryny (od etapu pobrania próbki, do właściwego oznaczenia chromatograficznego) oszacowano precyzję metody. Uzyskane wyniki pozwoliły wyznaczyć odchylenia standardowe s oraz względne odchylenia standardowe (współczynniki zmienności) RSD . Wyniki zestawiono w tab. 1.

Tabela 1

Deklarowane na opakowaniu i średnie oznaczone zawartości witamin A i E w margarynie, wraz z odchyleniami standardowymi i współczynnikami zmienności.

Declared at consumer package and mean chromatographically determined contents of vitamins A and E in margarine, their standard deviations and coefficients of variation.

Substancja oznaczana Component	Zawartość / Content		Odchylenie standardowe Standard deviation (s)	Współczynnik zmienności Coefficient of variation (RSD) [%]
	deklarowana declared	oznaczona determined		
witamina A vitamin A [$\mu\text{g}/100\text{g}$]	900	924	72,80	7,88
witamina E vitamin E [$\text{mg}/100\text{g}$]	26	31	2,35	7,55

Podczas analizy chromatogramów zwrócono uwagę na wpływ warunków zmydlenia, na wyznaczoną zawartość witamin. Obrazuje to rys. 3. Chromatogram 1. (zaznaczony linią ciągłą) obrazuje analizę próbki zmydlanej w temperaturze 45°C przez 60 min. Po tym czasie temperaturę podniesiono do 70°C , a proces został zakończony po uzyskaniu jednorodnej mieszaniny. Natomiast chromatogram 2. (zaznaczony linią przerywaną) został wykonany dla próbki zmydlanej przez dłuższy okres czasu (powyżej 1,5 godziny), w temperaturze powyższej 70°C . Czasy retencji dla odpowiadających sobie pików w obu przypadkach są takie same, natomiast zmieniają się proporcje ich wielkości (3,8 : 1 w przypadku α -tokoferolu). Sugeruje to powstawanie tych samych produktów, lecz w innych proporcjach. W przypadku oznaczania witaminy A prowadzenie analizy w warunkach nieprawidłowych skutkuje zmniejszeniem wielkości pików o 42%.

Na chromatogramie witaminy E oprócz pików charakterystycznego dla tej witaminy ($t_{\text{ret}} = 5,2$ min), widoczny jest pik witaminy A ($t_{\text{ret}} = 2$ min). Niestety, z powodu obecności wielu innych pików o podobnych czasach retencji ($t = 1,2 + 2,5$ min) nie można określić jednoznacznie stężenia retinolu przy tej długości fali ($\lambda = 290$ nm).

Wnioski

1. Adaptowana metoda oznaczania witamin A i E, dzięki dobrej powtarzalności i dokładności uzyskanych wyników, może znaleźć zastosowanie w ilościowym oznaczaniu witamin w produktach spożywczych; decydujący wpływ na powtarzalność wyników ma etap przygotowania próbek.
2. Duży wpływ na oznaczaną zawartość witamin A i E ma temperatura i długość procesu zmydlania próbek.

LITERATURA

- [1] Albalá-Huratta S., Novella-Rodríguez S.: Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **778**, 1997, 243.
- [2] Delgado Zamarrero M., Sanchez Perez A.: Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. *Talanta*, **43**, 1996, 1555.
- [3] Hewavitharana A.: Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Vitamins A, E and β -carotene in Common Dairy Foods. *International Dairy Journal*, **6**, 1996, 613.
- [4] Krelowska-Kułas M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.
- [5] Łoś-Kuczera M. (red.): Produkty spożywcze. Skład i wartość odżywcza. Instytut Żywności i Żywienia im. Prof. A. Szczygła, Warszawa 1990.
- [6] Moszczyński P., Pyć R.: Biochemia witamin. Część II. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy. PWN, Warszawa, Łódź 1999.
- [7] Mulholland M., Dolphin R.: Analysis of the fat-soluble vitamins using narrow bore high-performance liquid chromatography with multichannel UV-VIS detection. *Journal of Chromatography*, **350**, 1995, 285.
- [8] Pikkariainen S., Parviainen M.: Determination of retinyl palmitate and total vitamin A content in liver and liver-based ready-to-eat foods. *Journal of Chromatography*, **577**, 1992, 163.
- [9] Rizzolo A., Polesallo S.: Chromatographic determination of vitamins in foods. *Journal of Chromatography*, **624**, 1992, 103.
- [10] Rutkowska U. (red.): Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności. PZWL, Warszawa 1981.
- [11] Sikorski Z. (red.): Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT, Warszawa 1996.
- [12] Tyszkiewicz S. (red.): Postęp w analizie żywności. Tom I, Warszawa 1990.
- [13] Widicus W., Kirk J.: High Pressure Liquid Chromatographic determination of vitamins A and E in cereal products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **62**, 1979, 637.
- [14] Vinãs P., Campillo N.: Liquid chromatographic determination of fat-soluble vitamins in paprika and paprika oleoresin. *Food Chemistry*, **45**, 1992, 349.

DETERMINATION OF VITAMINS A AND E IN SOME FOOD PRODUCTS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

S u m m a r y

This paper describes the determination of basic forms of vitamins A and E in margarine and liver sausage using reversed phase of HPLC with UV-VIS detection. Special attention was paid on influence of sample preparation on appointed content of substance (optimization of saponification conditions). Also statistical data analysis, based on margarine analysis and relative standard deviation (*RSD*) for both vitamins was performed. ☒