

MAREK GOGOLEWSKI, GRZEGORZ GALUBA, MAŁGORZATA NOGAŁA-KAŁUCKA, ALDONA JASIŃSKA-STEPNIAK

## TECHNIKI CHROMATOGRAFICZNE STOSOWANE DO ROZDZIAŁU TOKOFEROLI W OLEJACH I KONDENSATACH Z ODWANIACZY

### Streszczenie

W pracy pokazano możliwości zastosowania różnych technik chromatograficznych do rozdziału i oznaczeń tokochochromanoli w produktach przemysłu olejarskiego. Pozwala to na ocenę olejów, kondensatów z odwaniaczy i koncentratów tokoferoli w aspekcie ich wartości witaminowej, a w przypadku kondensatów jako surowca do otrzymywania tokoferoli - natywnych przeciwutleniaczy. Podano warunki rozdziałów technikami TLC (jedno- i dwukierunkowej), kolumnowej (wypełnienie  $\text{CaHPO}_4$ ), GC, HPLC i SFC. Wszystkie techniki pozwalają z wyjątkiem SFC na rozdział homologicznych tokoferoli, a TLC i kolumnowa również tokotrienoli. W przypadku TLC jednokierunkowej zastosowania faza ruchoma pozwoliła na rozdział wszystkich homologicznych tokoferoli (w dotychczasowych pracach nie rozdzielały się  $\beta$ -T od  $\gamma$ -T). Również nowatorski charakter ma otrzymany rozdział przy zastosowaniu SFC.

### Wstęp

Potrzeba indywidualnego oznaczania homologicznych tokoferoli wynika z ich zróżnicowanych właściwości biologicznych i przeciwutleniających. Oznaczanie tokoferoli w surowcach i produktach spożywczych umożliwiło obliczenie dawki zapotrzebowania witaminy E u ludzi (przeliczając na j.m. i ekwiwalent D-alfa-tokoferolu, [3]) w celu zapewnienia jej stężenia 0,7 mg w 100 g osocza krwi [15] i współczynnika Harrisa, który określa właściwy fizjologicznie stosunek tokoferoli do niezbędnych nienasyconych kwsów tłuszczowych w diecie [9]. Biosyntetyzowane przez rośliny prawoskrętne tokoferole są aktywniejsze biologicznie niż otrzymane na drodze chemicznej racematy [11].

W produktach spożywczych i paszach oznacza się tokoferole w celu określenia ich rozkładu podczas procesów technologicznych, przechowywania, utrwalania radia-

cyjnego czy kontaktu z materiałami rozszczepialnymi oraz przy ustalaniu ilościowego ich dodatku jako przeciwutleniaczy [7, 13].

W pracy przedstawiono otrzymane najczęściej stosowanymi technikami chromatograficznymi rozdziały tokoferoli z uwzględnieniem opracowanych własnych warunków i modyfikacji metodycznych.

## Część doświadczalna

### *Materiały*

Żel krzemionkowy G;  $\text{CaHPO}_4$  otrzymany w reakcji  $\text{CaCl}_2$  z  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  o granulacji mniejszej niż 0,35 mm, aktywowany w  $130^\circ\text{C}$  przez 1 godz. [10]. Benzyna t.wrz.  $80\text{--}100^\circ\text{C}$ , metanol, chloroform, heksan, etanol abs., eter izopropylowy, eter etylowy wolny od nadtlenków,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  lod., 2-propanol,  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Odczynniki Emmerie-Engla: roztwór 0,1%  $\text{FeCl}_3$  i 0,2% 2,2'-dwupirydylu.

Standardy tokoferoli i tokotrienoli firmy Merck o cz. 98,7% (10 mg w  $10\text{ cm}^3$  heksanu), przeciwutleniacz Mix  $\delta$  – T firmy Eisai – Japonia.

Oleje – palmowy czerwony, złocisty (50% sojowy i 50% rzepakowy) i rzepakowy oraz kondensaty z odwaniaczy z rafinacji oleju rzepakowego i sojowego.

### *Metody*

Części niezmydlające się olejów otrzymano przez trzykrotne odsączenie acylogliceroli i kwasów tłuszczowych po ich wykrystalizowaniu w temp.  $-70^\circ\text{C}$  z roztworu acetonowego (1:10 m/v). Z połączonych przesączy oddestylowywano aceton w strumieniu  $\text{N}_2$ . Pozostałość rozpuszczano w metanolu. Następnie wykrystalizowane w  $-20^\circ\text{C}$  sterole odsączano, metanol oddestylowywano, a pozostałość rozpuszczano w znanej objętości benzyny lub heksanu i używano do rozdziałów tokoferoli technikami TLC, kolumnową i GC.

Części niezmydlające do rozdziałów przy użyciu HPLC i SFC otrzymywano przez ich oddzielenie na niskociśnieniowej kolumnie SEP-PAK (500 mg) Waters Corp. Milford USA. Próby w ilości 20–25 mg rozpuszczano w  $1\text{ cm}^3$  heksanu i niosono na kolumnę uprzednio zwilżoną  $3\text{ cm}^3$  heksanu. Acyloglicerole wymywano  $10\text{ cm}^3$  heksanu, a części niezmydlające roztworem heksanu i 2-propanolu (85 /15 v/v). Rozpuszczalniki odparowywano w strumieniu  $\text{N}_2$ , a pozostałość rozpuszczano w  $500\text{ }\mu\text{l}$  heksanu w ampułce z silikonowym septum. Próby przeciwutleniaczy rozpuszczano w heksanie ( $10\text{ mg}$  w  $10\text{ cm}^3$ ).

Rozdziały techniką wstępującą TLC wykonywano na płytkach ( $20\times 20\text{ cm}$ ) pokrytych  $0,25\text{ mm}$  warstwą żelu krzemionkowego G stosując jako fazę ruchomą  $\text{CHCl}_3$

lub mieszaninę heksanu, eteru etylowego i amoniaku (90 : 10 : 1 v/v), a przy chromatografii dwukierunkowej  $\text{CHCl}_3$  oraz heksan / eter izopropylowy (4 : 1 v/v).

Rozdziały tokochromanoli techniką kolumnową (kolumna o  $\varnothing$  2 cm i dł. 20 cm wypełnioną  $\text{CaHPO}_4$ ) otrzymywano przez eluowanie ich benzyną ze zmieniającą się w sposób ciągły ilością eteru etylowego od 0 do 20%. Zestaw aparatury stosowanej w Inst. Żywności w Kopenhadze opisał Gogolewski [5].

Rozdziały techniką GC dokonywano w aparacie Hewlett - Packard, który wyposażony był w kolumnę niepolarną HP-1, detektor MS-5970, z programem temperatur 275°C do 300°C przy wzroście 10°C/min. Szybkość przepływu He wynosiła 0,5 ml/min.

Aparatura dla rozdzielców HPLC była wyposażona w pompę gradientu fazy ruchomej (Waters – model 600), detektor UV (Waters – model 996 PDA), automat do wstrzykiwania prób (Hitachi AS -2000) i komputer (NEC) z programem Waters Millennium. Rozdziałów dokonywano na kolumnie wypełnionej Lichosorbem Si 60 – 5  $\mu\text{m}$ , o wymiarach 250×4,6 mm i 30×4,6 mm (Phenomenex) przy użyciu fazy ruchomej heksanu i 2-propanolu (97,5/2,5 v/v).

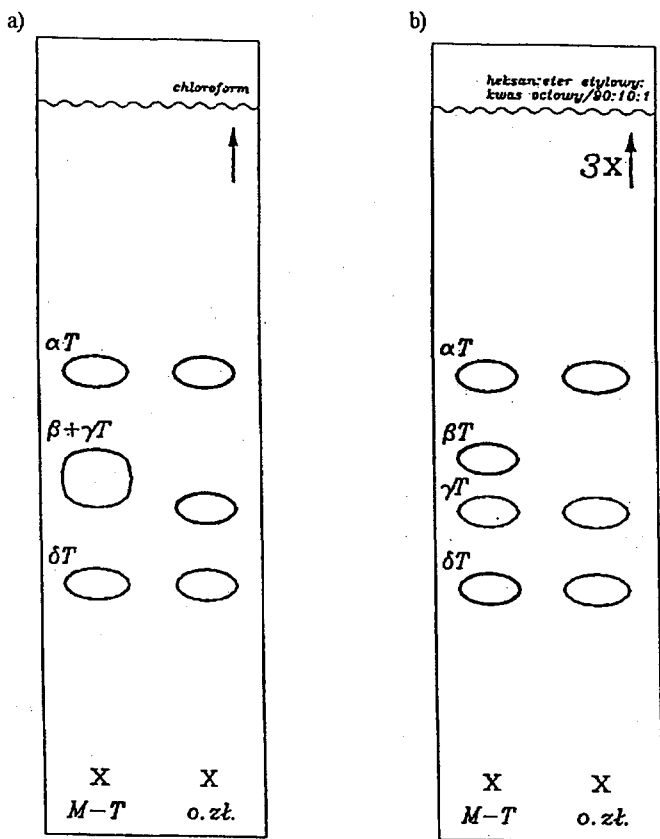
System SFC składał się z chromatografu Lee Scientific – model 600, wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny i integrator (Dionel 4400). Na końcu kolumny zainstalowano kapilarny restryktor o śr. 100  $\mu\text{m}$  w celu redukcji ilości  $\text{CO}_2$  kierowanego do detektora. Do rozdzielców tokoferoli używano kolumny kapilarnej, silikonowej SB - Biophenyl 30 (100  $\mu\text{m}$  ID, 0,25  $\mu\text{m}$  film, dł. 10 m – Lee Scientific Kat 15028). Fazę nośną stanowił  $\text{CO}_2$ . Próbkę chromatografowano programując ciśnienie od 120 do 200 atm z szybkością 4 atm/min. i do 350 atm – 10 atm/min. Temp. detektora wynosiła 350°C, a pieca 175°C [4].

## Omówienie wyników

Przy rozdzielaniu tokoferoli stosuje się wszystkie znane rodzaje fazy ruchomej jak gazy, ciecze i fluid nadkrytyczny oraz fazy stacjonarne - ciała stałe i ciecze [2]. W produktach przemysłu spożywczego rozdział i oznaczanie tokoferoli poprzedza otrzymanie substancji niezmydlających się (SNZ) przez ich wyekstrahowanie eterem etylowym z prób uprzednio zmydlonych lub oddzielenie od głównej masy blastowej acylogliceroli na kolumnie wypełnionej adsorbentem. Związki, które występują w SNZ, rozdzielano jedną z technik chromatograficznych.

Tokoferole i tokotrienole rozdzielano stosując chromatografię cienkowarstwową (TLC), kolumnową, gazową (GC), cieczową – wysokociśnieniową (HPLC) i stanu nadkrytycznego (SFC).

Rys. 1 ilustruje rozdział tokoferoli na żelu krzemionkowym G w układzie jednokierunkowym z chloroformem (konieczna obecność 1% etanolu, który zwykle stosuje się jako dodatek stabilizujący  $\text{CHCl}_3$ ). Zgodnie z licznymi danymi literaturowymi nie rozdzielał się  $\beta$ -T od  $\gamma$ -T. Natomiast po wielu próbach z różnymi układami rozpuszczalników otrzymano rozdział czterech standardów tokoferoli. Fazą ruchomą, która dawała ten optymalny rozdział była mieszanina heksanu/ eteru etylowego/ kwasu octowego w stosunku 90: 10: 1 v/v/v.



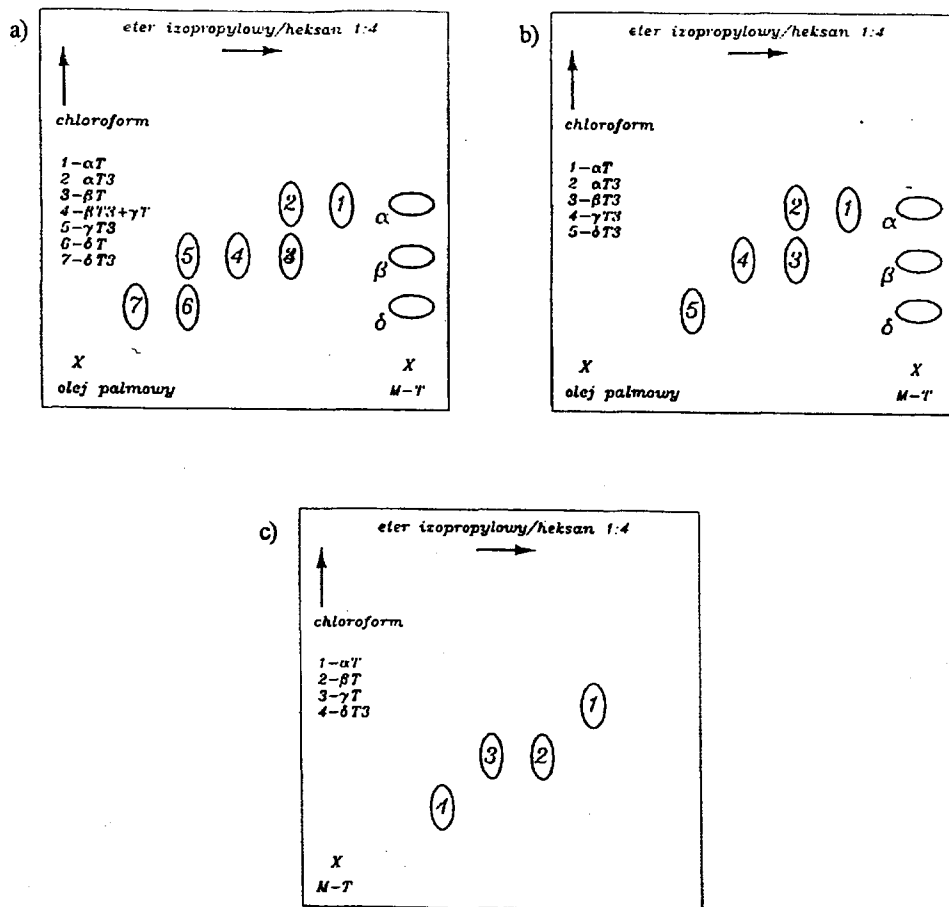
Rys. 1. Rozdział tokoferoli techniką TLC; a) w chloroformie, b) w mieszaninie heksan (eter etylowy) kwas octowy;

\*M-T - mieszanina standardów tokoferoli,

\*o-zł - olej złocisty.

Rys. 2 przedstawia rozdział tokoferoli w czerwonym oleju palmowym przy użyciu dwukierunkowej TLC. Rozdział ten jest zgodny z otrzymanym przez Whittle i Pennocka [14]. Nie następował rozdział  $\beta$ -T od  $\gamma$ -T-3. W oleju palmowym stwierdzo-

no występowanie obok  $\alpha$ -T wszystkich czterech tokotrienoli. Na podstawie otrzymanych rozdzielów opracowano metodę otrzymywania standardów tokotrienoli [6]. Technika ta pozwala na oddzielenie plastochromanolu-8 od tokochromanoli.



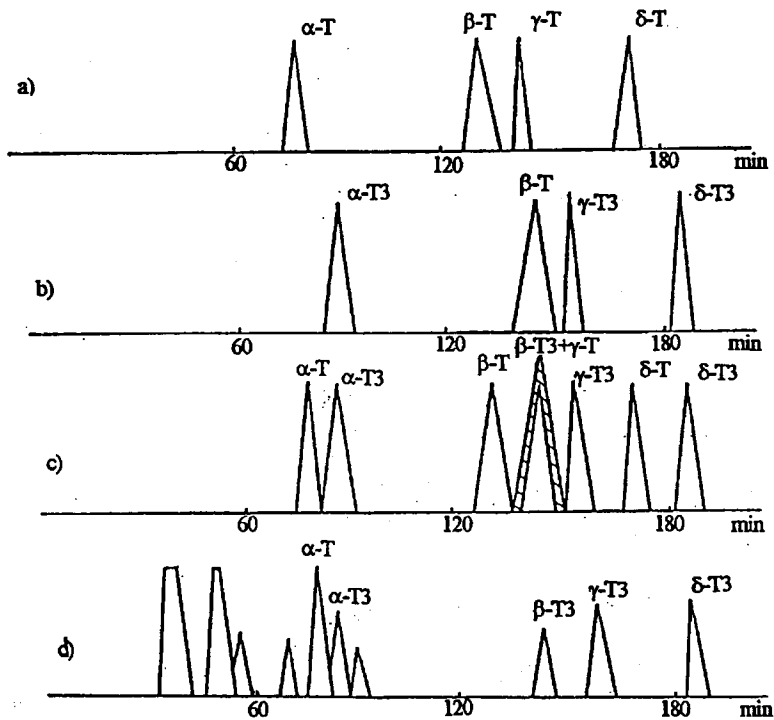
Rys. 2. Rozdział tokochromanoli techniką dwukierunkową TLC - standardy tokoferoli i tokochromanole w oleju palmowym;  
\*M-T – mieszanina tokoferoli.

Rys. 3 ilustruje na schematach rozdział tokoferoli i tokotrienoli występujących w oleju palmowym techniką kolumnową z wypełnieniem  $\text{CaHPO}_4$ . Jest to technika, którą opracowano w Państwowym Instytucie Żywności w Kopenhadze. W skonstruowanym zestawie aparatury w ciągu dwóch godzin otrzymuje się pełny rozdział tokochromanoli z wyjątkiem  $\beta$ -T-3 od  $\gamma$ -T, które wymywane są z kolumny w tym samym czasie. Udo-

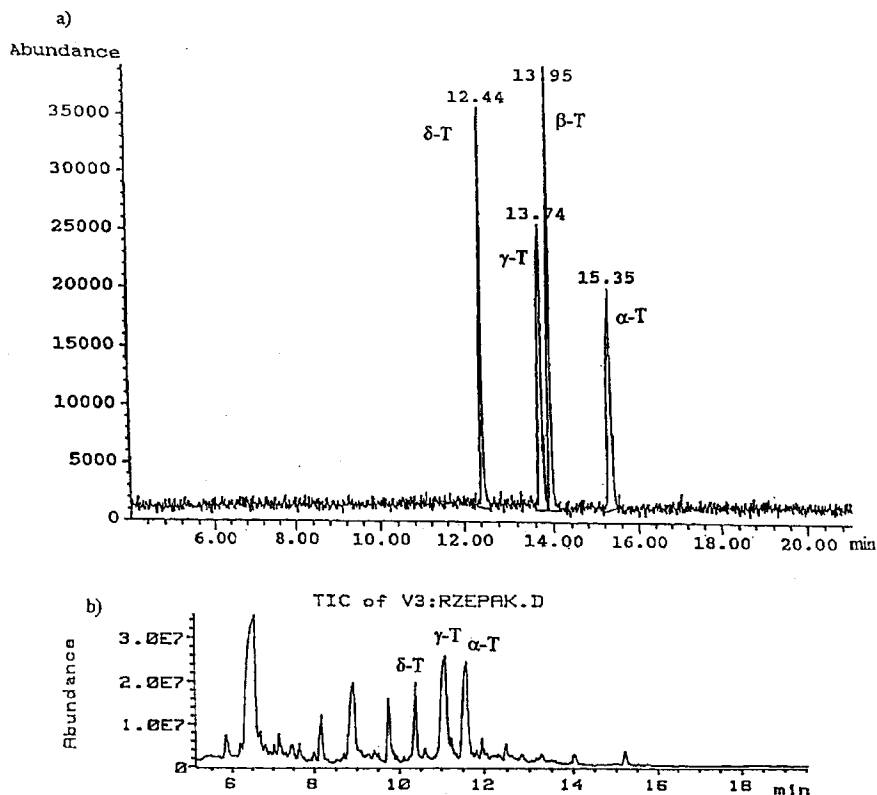
skonalenie metody polegające na wydłużeniu czasu wymywania związków z kolumny pozwoliło na oddzielenie PC-8 od  $\gamma$ -T występujących razem np. w oleju lnianym oraz rozdział dimerów i trimerów tokoferoli [5].

Zastosowanie GC do rozdziału tokoferoli przy użyciu niepolarniej kolumny przedstawia rys. 4. Wszystkie cztery homologi rozdzielają się w czasie 16 min. – w kolejności:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -T. Jako przykład aplikacyjnego zastosowania tej techniki przedstawiono rozdział tokochromanoli występujących w oleju rzepakowym. Metoda ta pozwala także na rozdział tokoferoli posiadających obok podstawnika metylowego w położeniu 8 podstawnik etylowy, propylowy lub butylowy [12].

Rys. 5 przedstawia chromatogramy rozdziału mieszaniny standardów tokoferoli, tokoferoli zawartych w przeciwutleniaczu Mix  $\delta$ -T oraz kondensacie z odwaniaczy po rafinacji oleju rzepakowego przy zastosowaniu HPLC. Uzyskano rozdział wszystkich czterech homologów, a ponadto tokoferole są oddzielone od wszelkiego rodzaju substancji towarzyszących łącznie ze sterolami, które występują np. w dużych ilościach w kondensatach.



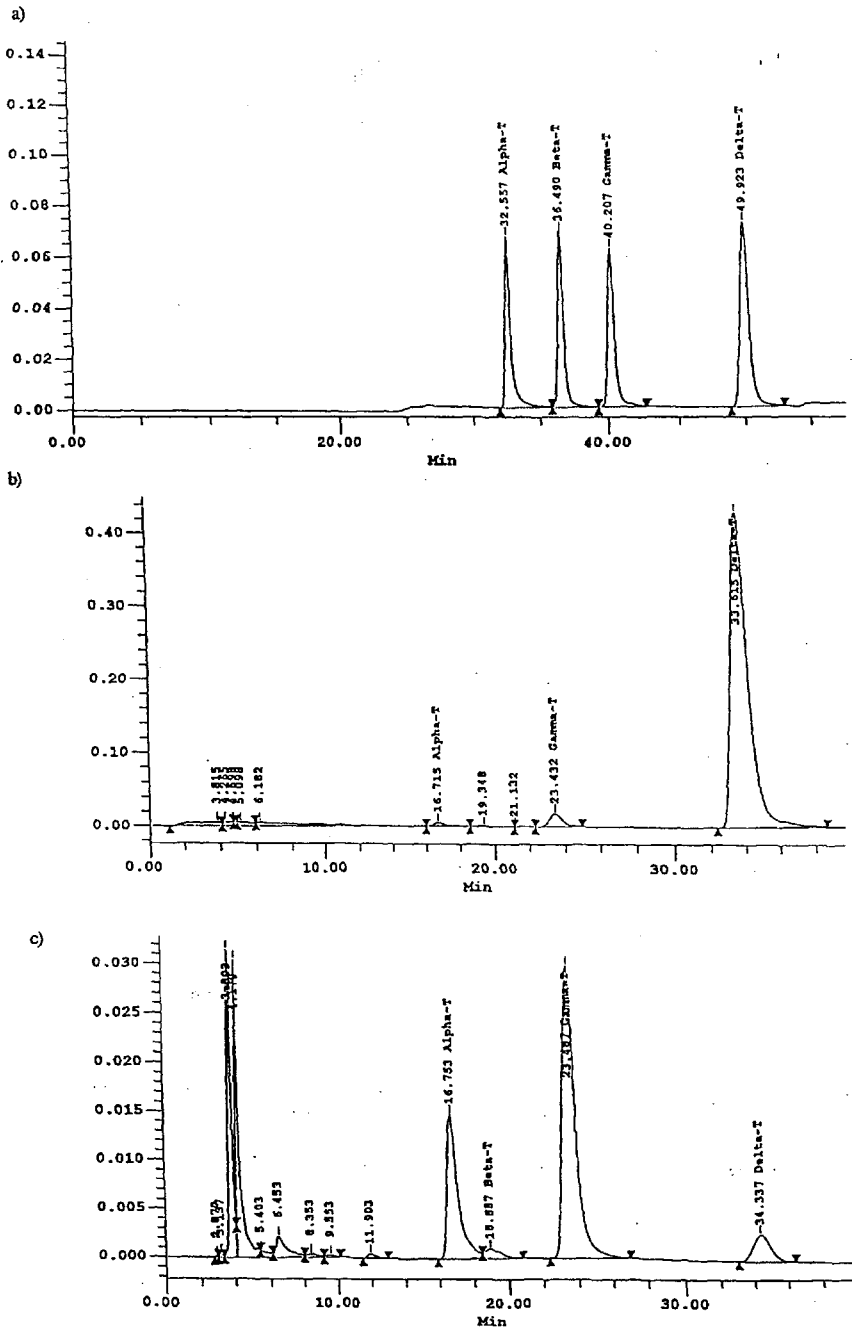
Rys. 3. Rozdziály tokochromanoli w oleju palmowym techniką kolumnową (wypełnienie –  $\text{CaHPO}_4$ ); a) tokoferole, b) tokotrienole, c) tokochromanole w oleju palmowym.



Rys. 4. Rozdział tokoferoli techniką GC; a) standardy tokoferoli, b) tokoferole w oleju rzepakowym.

Na rys. 6 przedstawiono rozdział standardów tokoferoli i zawartych w kondensacie z odwaniaczy po rafinacji oleju sojowego techniką chromatografii cieczowej stanu nadkrytycznego (SFC). Uzyskano rozdział trzech tokoferoli od pozostałych związków towarzyszących. W stosowanych warunkach rozdziału mieszaniny standardów tokoferoli  $\beta$ -T nie oddzielał się  $\delta$ -T, który jako najbardziej polarny wmywany był z kolumny. Chromatografia stanu nadkrytycznego wymaga dalszych prac nad wykorzystaniem jej możliwości czego przykładem może być otrzymanie rozdziału tokoferoli i steroli w materiale roślinnym [4].

Oznaczanie ilościowe tokoferoli i tokotrienoli po ich rozdziale (TLC, kolumna z  $\text{CaHPO}_4$ ) wykonywano stosując reakcję Emmerie – Engla lub przy użyciu detektorów płomieniowo-jonizacyjnych (GC, HPLC, SFC). Zawartości tokochromanoli w wybranych olejach, kondensatach podezdoryzacyjnych i preparacie Mix  $\delta$ -T z przedstawionych na rycinach chromatogramów przedstawiono w tabeli 1.



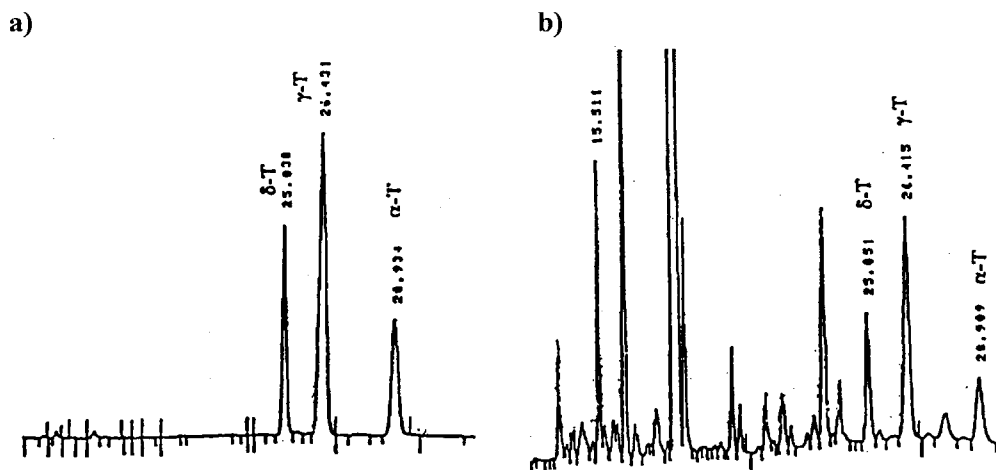
Rys. 5. Rozdziály tokoferoli techniką HPLC; a) rozdziály standardów tokoferoli, b) rozdziály tokoferoli w przeciwnieźniaczu Mix- $\delta$ -T, c) rozdziály tokoferoli w kondensacie z odwłoniaczy z oleju rzepakowego.



Tabela 1

Zawartości tokochromanoli oznaczonych stosowanymi w pracy technikami chromatograficznymi

Produkt	Tokoferole [mg/100 g]				
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	Suma
Olej złocisty	19,0	–	53,1	23,4	95,5
Olej palmowy <sup>1</sup>	18,1	–	–	–	30,7
Olej rzepakowy	15,2	–	20,9	0,7	36,8
Przeciwutleniacz Mix $\delta$ -T	730,0	–	261,0	89860,0	93200,0
Kondensat z odwaniaczy oleju rzepakowego	2971,5	120,1	3860,4	447,2	6499,2
Kondensat z odwaniaczy z oleju sojowego	411,0	–	3569,8	1815,7	5796,5

<sup>1</sup>Tokotrienole:  $\alpha$ -T-3 3,2;  $\beta$ -T-3 1,8;  $\gamma$ -T-3 4,2;  $\delta$ -T-3 4,1

Rys. 6. Rozdział kondensatu z odwaniaczy soi przy użyciu SFC; a) standard tokoferoli, b) kondensat z odwaniaczy.

Zawartości i skład homologicznych tokochromanoli w olejach są na poziomie średnich wartości podawanych w innych publikacjach. Kondensaty zawierające 5,8% (sojowy) i 6,5% (rzepakowy) tokoferoli świadczą o stosowaniu umiarkowanych warunków odwaniania olejów bielonych w celu zachowania największej ilości tokoferoli w olejach rafinowanych. Preparat Mix  $\delta$ -T zawiera prawie 90%  $\delta$ -T, 2,6%  $\gamma$ -T i 0,7%  $\alpha$ -T, a tylko 6,3% innych związków, potwierdza to precyzyjną metodę rozdziału toko-

feroli stosowaną do jego produkcji przez japoński koncern Eisai. Użycie tego preparatu jako przeciwutleniacza może mieć szerokie zastosowanie przy produkcji żywności i pasz.

## Wnioski

1. Stosowane techniki chromatograficzne pozwalają na rozdział czterech tokoferoli. W przypadku TLC znaleziono fazę ruchomą składającą się z mieszaniny heksanu, eteru etylowego i kwasu octowego pozwalającą na dotychczas niewykonalny rozdział  $\beta$ - od  $\gamma$ -tokoferolu na żelu krzemionkowym G.
2. Chromatografia dwukierunkowa w cienkiej warstwie żelu krzemionkowego i kolumnowa z wypełnieniem  $\text{CaHPO}_4$  pozwalają na rozdział homologicznych, natiwnych tokochromanoli z wyjątkiem  $\gamma$ -tokoferolu i  $\beta$ -tokotrienolu, które tworzą jedną plamę lub są wymywane równocześnie.
3. Dobry i szybki rozdział tokoferoli otrzymano stosując GC i HPLC.
4. Zastosowanie nowej chromatografii stanu nadkrytycznego (SFC) pozwoliło na rozdział  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferoli. W przypadku występowania  $\beta$ -T tworzy on jeden pik z  $\delta$ -tokoferolem.
5. Wszystkie opisane techniki chromatograficzne dały dobre rozdziały tokoferoli znajdujących się w olejach i kondensatach z odwaniaczy.

## LITERATURA

- [1] Bourgeois C.: Determination of vit. E: Tocopherols and Tocotrienols. Elsevier Applied Science, London, 1992.
- [2] De Leenheer A.P., Lambert W.E.: Modern Chromatography Analysis of the Vitamins. Chromatographic Sciences, Ed. Marcel Dekker. New York, 1985.
- [3] Elmadfa I., Bosse W.: Vitamine E. Wissenschaftliche Verlag. Stuttgart, 1985.
- [4] Galuba G., Gogolewski M.: Separation of tocopherols and sterols in soybean condensate utilizing SFC. *Chemia Analityczna - praca przyjęta do druku*, 1996.
- [5] Gogolewski M.: Zmiany jakościowe i ilościowe niektórych pochodnych chromanolu w kiełkujących nasionach soi i rzepaku., Praca habilitacyjna, zeszyt 44, *Roczniki AR*, Poznań, 1973.
- [6] Gogolewski M.: Czerwony olej palmowy jako źródło tokochromanoli., *Rośliny oleiste*, 1995, 16.
- [7] Gogolewski M., Jasińska-Stępnik A., Szeliga M., Bartkowiak E.: Wpływ promieniowania jonizującego na jakość wybranych olejów (Cz I), *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, **29**, 1996, 63.
- [8] Gogolewski M., Galuba G.: Porównanie oznaczenia tokoferoli metodami HPLC i SFC w przeciwutleniaczu Tenox GT - 2. *Chemia Analityczna*, **41**, 1996, 737.
- [9] Harris L.P., Embree N.D.: Quantitative consideration of the effect of PUFA content the diet upon requirement for vit. E. *Am. J. Clin. Nutr.*, **13**, 1963, 385.
- [10] Hjarde W., Leerbek E., Leth T.: The chemistry and chemical determination of vitamin E. *Materiały sympozjum NJF, Mindsganl Castle, Middelfat, Dania*, 1971, 53.
- [11] Janiszowska W.: Biosynteza tokoferoli. *Postępy Biochemii*, **33**, 1986, 79.
- [12] Jasińska-Stępnik A.: 1995 - dane nie publikowane.

- [13] Pirronen V.: Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods and vegetables, fruits and berries., J. Agric. Food Chem., **34**, 1986, 742.
- [14] Whittle K.J. , Pennock J.F.: The examination of tocopherols and tocotrienols by two-dimensional thin layer chromatography and subsequent colorimetric determination, Analyst, **92**, 1967, 423.
- [15] Ziemiański S., Budzyńska-Topolowska J.: Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe, PWN, Warszawa, 1991.

## CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES APPLIED FOR SEPARATION OF TOCOPHEROLS IN THE OIL INDUSTRY PRODUCTS

### S u m m a r y

In the study the possibilities of applying various chromatographic techniques for separation and determination of tocopherols in the oil industry products are presented. This allows assessment of oils, post-dedodorization condensates and tocopherols concentrates as far as their vitamin value is concerned; the value of condensates as a source of native antioxidants can also be determined. The conditions for separation using the following techniques are presented: TLC (one- and two-dimensional), column filled with  $\text{CaHPO}_4$ , GC, HPLC and SFC. All techniques, except for SFC, allow separation of the homologous tocopherols, and TLC and column - also of tocotrienols. In the case of one-dimensional TLC the mobile phase applied separation of all homologous tocopherols (in the investigation carried out so far  $\beta$ -T and  $\gamma$ -T have not separated). The separation with the use of SFC is innovative too. 