

Stanovenie lipofilných vitamínov vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou. I

M. ŠPAŇÁR — M. GRODOVSKÝ

Výhody chromatografických metód sú najmä v ich schopnosti rozdeliť alebo kvantitatívne stanoviť desiatky zložiek vzorky. Ďalšími prednosťami sú rýchlosť a reprodukovateľnosť rozdelenia, malá spotreba vzorky a možnosti automatizácie.

Porovnaním jednotlivých chromatografických metód na rozdelenie zmesí nízkomolekulárnych látok sa zistilo, že pomocou novovyvinutých stacionárnych fáz a detektorov sa HPLC približuje účinnosti plynovej chromatografie [1]. Prednosť vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie je v tom, že možno separovať aj termolabilné kvapalné látky. Podmienkou rýchleho rozdelenia je okrem malých rozmerov častíc náplne kolóny aj vysoká lineárna rýchlosť mobilnej fázy (v rozmedzí $0,001 \leq v \leq 0,1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$), čo znamená, že treba použiť vysoké tlaky [1]. Preto sa metóda nazýva aj vysokotlaková kvapalinová chromatografia (high pressure liquid chromatography — HPLC).

Cieľom vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie je rozdeliť jednotlivé zložky vzorky vo vhodnom čase tak, aby sa vymyli do detektora ako samostatné koncentračné zóny s gaussovským rozdelením koncentrácie zložiek.

Javy, ktoré prebiehajú v chromatografickej kolóne, vysvetľujú sa na základe teórie difúzie. Táto teória je založená na základe predpokladu nerovnovážnej koncentrácie zložky v mobilnej a stacionárnej fáze pri pohybe mobilnej fázy [2].

Pri stanovení lipofilných vitamínov vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou sme sa zamerali najmä na stanovenie tokoferolu — vitamínu E. Tokoferol sa stanovil v oleji a tukoch, a to z výrobkov n. p. Palma, ktoré sú fortifikované vitamínom A a E. Pri stanovení sme čerpali najmä z práce Carpentera [3].

Vitamín E — tokoferol sa skladá z ôsmich prírodne sa vyskytujúcich tokoferolov, z ktorých má každý odlišnú biologickú aktivitu. Skupina zlúčenín obsahuje štyri tokoly označované α , β , γ , δ . Z nich tokoferol α -(5,7,8-trimetyltokol) sa v potravinách vyskytuje najčastejšie a má najväčšiu biologickú aktivitu. Bol aj predmetom nášho stanovenia.

Vitamín E sa stanovuje chemickými, elektrochemickými a chromatografickými metódami. Pri chemických metódach je stanovenie založené najmä na oxidácii fenolickej skupiny [3, 4]. Z metód, ktoré sa najčastejšie používajú,

je to metóda podľa Emmerie—Engela. Princíp spočíva v oxidácii tokoferolov na chinóny a v redukcii železitých iónov na železnaté, čo sa v prítomnosti α, α -dipyridilu prejaví červeným sfarbením. Nevýhody tejto metódy:

1. Možno stanoviť iba α -tokoferol.
2. Dlhý čas analýzy, kde počas prípravy vzorky môže dochádzať k degradácii tokoferolu.

3. Zamedzenie farebnej reakcie za prítomnosti glyceridových olejov [3].

Dalšia polarografická metóda môže byť vhodná na stanovenie jednotlivých tokoferolov [3, 5] v selektívnych prípadoch, avšak rušenie spôsobené nedostatočným rozložením β a γ tokoferolu môže byť problémom aplikácie tejto metódy. Z chromatografických techník sa najčastejšie používa tenkovrstvová chromatografia, plynová a kolónová kvapalinová chromatografia. Tenkovrstvová a plynová chromatografia sa vyznačujú pomerne dlhým časom prípravy vzorky na stanovenie. Jedna z najúčinnějších metód, ktorá bola vypracovaná na stanovenie tokoferolov v oleji a tukoch, je vysokotlaková kvapalinová chromatografia.

Experimentálna časť

Vzorky s obsahom vitamínu E sa analyzujú ihneď postupným rozpúšťaním v mobilnej fáze. α -tokoferoly sa stanovia z kalibračnej krivky zhotovenej z referenčnej látky α -tokoferolu. Absorbancia sa meria pri 295 nm. Hlavné zložky olejov — triglyceridy, majú absorbanciu prívlnovej dĺžke menšej ako 225 nm, takže neinterferujú pri detekcii 295 nm [1].

Chromatografická separácia sa robila na kolóne MICROPAK SI-10 mobilnou fázou 1,5 % izopropylalkohol v hexáne na kvapalinovom chromatografe VARIAN 8500. Prístroj je vybavený bezpulznou pumpou, ktorá umožňuje pracovať s tlakmi 0—68,6 MPa (700 atm). Prístroj má bezseptový injektor. Pri stanovení sme použili izokratickú elúciu, t. j. s jedným elučným činidlom s nemeniacim sa zložením. Ako detektor sa použil VARI-CHROM, ktorý umožňuje merať absorbanciu v ultrafialovej a viditeľnej oblasti v rozmedzí 200—720 nm. Zapisovač TZ 21 S bol československej výroby.

Výsledky a diskusia

Pri nameraných hodnotách uvedených v tabuľke 1 boli tieto základné charakteristiky prístroja:

- mobilná fáza: spektrofotometrický n -hexán s 1,5 % izopropanolom,
- detekcia 295 nm,
- tlak na pumpe 5 MPa,
- prietok 60 ml/h,
- nástrek 100 μ l.

Ako dôkaz účinnosti vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie uvádzame výsledky v tabuľke 2, kde porovnávame výsledky dvoch stanovení. Na jednej strane stanovenie vitamínu E podľa ČSN a na druhej vysokotlakovú kvapalinovú chromatografiu. Merania prebiehali na totožných vzorkách.

Na základe výsledkov uvedených v tabuľkách 1 a 2 môžeme uviesť, že ide o progresívnu metódu pri stanovení tokoferolov v oleji a tukoch. Reproduk-

Tabuľka 1. Stanovenie tokoferolu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou

Meranie	HELIOL	JUNO	HERA
	výška piku (cm)	výška piku (cm)	výška piku (cm)
1.	9,6	8,7	7,7
2.	9,7	8,6	7,7
3.	9,6	8,8	8,0
4.	9,5	8,5	7,8
5.	9,7	8,4	7,6
	α -tokoferol (mg . kg ⁻¹)	α -tokoferol (mg . kg ⁻¹)	α -tokoferol (mg . kg ⁻¹)
1.	540	443	375
2.	543	440	375
3.	540	445	380
4.	536	438	377
5.	543	436	372
priemer \bar{x}	540,4	440,4	375,8
smerodajná odchýlka s_x	2,92	3,67	3,08

Tabuľka 2. Porovnanie výsledkov stanovenia vitamínu E vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) so stanovením podľa ČSN 56 0055

	HPLC (mg . kg ⁻¹)	ČSN 56 0055 (mg . kg ⁻¹)
Hera	375	300
Juno	440	350
Heliol	540	392

vateľnosť tejto metódy je dobrá, so smerodajnou odchýlkou okolo 3%. Vyššia spoľahlivosť výsledkov pri stanovení α tokoferolu pomocou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie je zrejmá z tabuľky 2. Ďalšia, pomerne dôležitá prednosť vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie oproti ostatným metódam je v dĺžke trvania analýzy.

Stanovenie α tokoferolu podľa ČSN 56 0055 spočíva v zmydelnení a extrakcii nezmydeliteľného podielu, chromatografickom delení a vo vlastnom kolorimetrickom stanovení tokoferolu. Celé stanovenie trvá 5—6 hodín [8]. Nie je zanedbateľný ani fakt, že pri jednotlivých operáciách môže dochádzať k degradácii a stratám vzorky. Tokoferoly treba stanovovať pri nepriamom osvetlení. Z uvedeného vyplýva pomerne veľká prácnosť a zdĺhavosť metódy ČSN 56 0055 na stanovenie tokoferolov v oleji a v tukoch.

Naproti tomu pri vysokotlakovej kvapalinovej chromatografii sa vzorka tuku alebo oleja priamo rozpustí v mobilnej fáze bez predchádzajúceho zmydelnenia a extrakcie. Alikvotný podiel vzorky sa priamo nastrekne na kolónu. Čas trvania analýzy od nástreku vzorky na kolónu je desať minút. Z uvedeného vyplýva, že odpadá zdĺhavý proces prípravy vzorky, čím sa

skrácuje čas trvania analýzy a znižuje sa možnosť degradácie vzorky počas analýzy.

Súhrn

Článok sa zaoberá využitím vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie na stanovenie lipofilných vitamínov, najmä α tokoferolu. Reprodukovateľnosť metódy je dobrá. Výsledky získané pomocou HPLC sú vyššie ako podľa príslušných ČSN.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia pre stanovenie α — tokoferolu v oleji a tukoch je metóda rýchla, citlivá a presná. Reprodukovateľnosť metódy je dobrá.

Literatúra

1. Kardoš, E. — Berek, D.: Základy kvapalinovej chromatografie. Bratislava, Alfa 1979.
2. Giddings, J. C.: Dynamic of Chromatography. Part I. New York, Marcel Decker, Inc. 1965, s. 29—193.
3. Carpenter, A. P., Jr.: Determination of Tocopherols in Vegetable Oils. Procter and Gamble Co., Winton Hill Technical Center 1966.
4. Strohecker, R. — Henning, H. M.: Vitamin A o y — Fested Methods. Cleveland, CRC Press 1966.
5. WALKING, A. E. — KIERME, M. — BLEFFORT, G. N.: Assoc. Anal. Chemists 1977.
6. Grodovský, M.: Rýchle metódy na stanovenie lipofilných vitamínov. Záverečná správa. Bratislava 1980.
7. Hadden, N. — Baumann, F. — Mac Donald, F. — Munk, M. — Stevenson, R., Gere, D. — Ramaroni, F., Majors, R.: Basic Liquid Chromatography, CALIFORNIA 1971.
8. Príběla, A.: Analýza prírodných látok v potravínach. Bratislava, Alfa 1978.

Шпаняр, М. — Гродовски, М.

Определение липофильных витаминов с помощью высоконагнетательной жидкостной хроматографии. I.

Выводы

Использование высоконагнетательной жидкостной хроматографии для определения липофильных витаминов особенно α -токоферола. Воспроизводимость метода хорошая. Результаты приобретенные с помощью высоконагнетательной жидкостной хроматографии показывают высшие значения чем результаты приобретенные методом по соответствующим чехословацким нормам.

Špaňár, M. — Grodovský, M.

A determination of the lipophile vitamins by the high-pressure liquid chromatography method. I.

Summary

The use of the high-pressure liquid chromatography method for the determination of the lipophile vitamins mainly α -tocopherol. The reproducibility of this method is good. The results obtained by this method are higher as those obtained by the method according to the competent Czechoslovak Standards.