STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNU A a VITAMINU E METODOU HPLC S UV DETEKCÍ

1 Rozsah a účel

Metoda je vhodná pro stanovení celkového obsahu vitamínu A a vitamínu E v kompletních krmivech i premixech doplňkových látek s obsahem nad 1 000 m.j./kg, respektive 2,5 mg/kg.

POZNÁMKY

1 Účinnou formou vitamínu A je retinol a neoretinol. Retinol je all-trans isomer a neoretinol je cis,trans-isomer a jsou esterově vázány na mastné kyseliny (tyto dvě formy převažují jako nativní vitamín A). Obsah vitamínu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách, ve zkratce m.j. retinolu na kg. Mezinárodní jednotka vitamínu A odpovídá aktivitě 0,3 μg all-trans-retinolu, což odpovídá 0,344 μg acetátu vitamínu A, 0,550 μg palmitátu vitamínu A, 0,359 μg propionátu vitamínu A.

2 Vitamín E je DL-α-tokoferol. Obsah vitamínu E se vyjadřuje v mg/kg, přičemž 0,91 mg DL-α-tokoferolu odpovídá 1,0 mg DL-acetátu tokoferolu.

2 Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní hydroxidem draselným, vitamin A a vitamin E se extrahuje do organického rozpouštědla (hexanu). Extrakt se zakoncentruje a odparek se rozpustí v methanolu, je-li to nutné, naředí se na požadovanou koncentraci. Obsah vitaminu A se stanoví metodou HPLC s UV detekcí při vlnové délce 325 nm. Nastaví se takové separační podmínky, aby nedocházelo k dělení cis a trans izomerů vitaminu A. Obsah vitaminu E se stanoví metodou HPLC s UV detekcí při vlnové délce 292 nm. V případě použití programovatelného detektoru UV detektoru se zjišťuje obsah vitaminu A i vitaminu E v jediném nástřiku.

3 Chemikálie

Používají se pouze chemikálie zaručené analytické čistoty, není-li určeno jinak.

1 Hexan nebo cyklohexan.

2 Methanol, HPLC grade.

3 Methanol, CH_3OH.

4 Ethanol, C_2H_5OH, denaturovaný hexanem 1 %.

5 Ethanol, vodný roztok 35 %, ρ = 0,945 g/l.

Příprava: V baňce se smíchá 746 ml ethanolu (4), 1036 ml vody (23) a 1,8 g kyseliny askorbové (11).

6 Ethanol pro UV.

7 2-Propanol, C_3H_7OH, čistota HPLC.

8 Hydroxid draselný, KOH.

9 Hydroxid draselný, KOH, vodný roztok, c = 600 g/l.

Příprava: Do kádinky se naváží 600 g KOH (8), rozpustí se ve vodě (23), nechá se vychladnout na laboratorní teplotu, převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou (23) po značku.

10 Hydroxid draselný (KOH), roztok, c = 200 g/l.

Příprava: Do kádinky se naváží 200 g KOH (8), rozpustí se v 800ml ethanolu (5), nechá se vychladnout na laboratorní teplotu.

11 Kyselina askorbová, $C_6H_8O_6$.

12 Hydrochinon pevný, $C_6H_6O_2$.

13 Sodná sůl EDTA (Chelaton III).

14 Síran sodný, Na_2SO_4, bezvodý.

15 Indikátor fenolftalein, roztok 10%.

Příprava: 1 g fenolftaleinu se rozpustí v 80 ml ethanolu a doplní se vodou na 100 ml. Takto připravený roztok se zředí 10 x.

16 Mobilní fáze.

Do 1000ml odměrné baňky se nalije 20 ml vody (23), přidá se methanol téměř po značku a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní po značku.

17 All-trans-vitamin A acetát ($C_{22}H_{32}O_2$), CAS = 127-47-9, M = 328,49 g/mol, extra čistý s certifikovanou aktivitou, např. SIGMA, No. R 3625, approx. 500 000 m.j./g.

18 DL-α-tokoferol-acetát, např. Sigma No. T3001, approx. 1360 IU/g.

19 Chlorid sodný, NaCl, nasycený roztok.

20 Chlorid sodný, NaCl, nasycený roztok v roztoku ethanolu.

Příprava: Do 500ml konické baňky se nalije cca 300 ml ethanolu (5) a za stálého míchání se přidává chlorid sodný (24) tak dlouho, než se roztok nasytí (chlorid sodný se nerozpouští).

21 Kyselina chlorovodíková, HCl, c(HCl) = 1 mol/l.

Příprava: V 1000ml baňce se smíchá 87 ml koncentrované HCl (25) s vodou (23) a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní po značku.

22 Dusík, žárovkárenský, prostý kyselých látek a plynů.

23 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

24 Chlorid sodný NaCl.

25 Koncentrovaná kyselina chlorovodíková, HCl.

26 Kyselina askorbová, $C_6H_8O_6$, 20% vodný roztok.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se odváží 20 g kyseliny askorbové (11), přidá se 50 ml vody (23) a kyselina askorbová se rozpustí. Pak se doplní vodou (23) po značku. Roztok se připravuje denně čerstvý.

4 Přístroje a pomůcky

1 Analytické váhy.

2 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf a UV detekcí, příp. FLD detekcí.

3 Rotační vakuová odparka nebo koncentrátor vzorku.

4 Rotační třepačka.

5 Laboratorní odstředivka.

6 Kolonky SPE, např. Chromabond (Machery Nagel)

5 Postup

5.1 Úprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1. Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

5.2 Zmýdelnění vzorku

Do kónické 500ml baňky se zábrusem se podle deklarovaného obsahu vitamínů s přesností na 0,01 g naváží 5 až 15 g premixů doplňkových látek nebo 40 g až 80 g minerálně doplňkových krmiv resp. krmných směsí zkušebního vzorku.

Podle tabulky 1 se přidá definovaný objem ethanolu (4) a hydroxidu draselného (9).

Tabulka 1. Objem hydrolyzačních činidel.

Navážka (g)	Objem ethanolu (ml)	Objem KOH (ml)	Celkový objem (ml)
5 až 15	110	45	150
40	160	45	200
80	320	90	400

Postupně se přidá 750 mg kyseliny askorbové (11), 500 mg pevného hydrochinonu (12) a 500 mg EDTA (13) a obsah baňky se promíchá. Baňka se uzavře polyethylenovou zátkou, nasadí do rotační třepačky a zmýdelňuje se 14 h až 16 h při laboratorní teplotě.

Poznámky

3 Roztoky vitamínu A i vitamínu E se musejí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Těsně před zmýdelněním a dalším zpracováním se vzorek homogenizuje na částice o velikosti 1 mm. Během homogenizace se vzorek nesmí přehřát.

4 Lze použít také zmýdelňování za tepla, které probíhá na vodní lázni s mícháním pod zpětným chladičem v atmosféře dusíku 30 min při 80 ° C. Po uplynutí této doby se baňka vyjme z vodní lázně a nechá se pod zpětným chladičem ochladit na laboratorní teplotu.

5 Při přípravě krmných směsí s vyšším obsahem tuku (např. mléčné krmné směsi, krmné směsi pro psy) je potřeba zajistit úplné zmýdelnění, a proto volíme nižší navážku.

5.3 Extrakce

Postup A – Extrakce kapalina - kapalina

Do 500ml dělicí nálevky se nalije 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (19), 30 ml vody (23) a 50,0 ml zmýdelněného roztoku podle 5.2. Do dělicí nálevky se zmýdelněný roztok převede tak, aby jeho pevný podíl zůstal v baňce. Přidá se 50,0 ml hexanu (1). Dělicí nálevka se uzavře a třepe se manuálně po dobu 30 s. Obě fáze se nechají asi 2 min až 5 min rozdělit. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml ethanolu (5) k rozrušení vzniklé emulze. Vodná fáze se hexanem extrahuje ještě dvakrát až třikrát tak, že se vodná fáze extrahuje nejprve s 50 ml hexanu (1) a poté opět s 40 ml hexanu, přičemž po rozdělení fází (viz výše) se hexanové extrakty spojují v dělicí nálevce na 500 ml. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá ethanol (5). Spojené extrakty se propláchnou 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propláchne 2 × 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží tak dlouho, až je promývací voda neutrální (po přidání roztoku fenolftaleinu (15) zůstává roztok bezbarvý). Extrakt se filtruje do 200ml odměrné baňky přes skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného. Nálevka i filtr se propláchnou 20 ml hexanu (1) a odměrná baňka se doplní hexanem po značku a promíchá.

Postup B – Extrakce na pevné fázi

Odpipetuje se 40 ml zmýdelněného roztoku podle 5.2 a doplní se roztokem kyseliny askorbové (26) na 50 ml v odměrné baňce. Po pořádném promíchání eventuálně vzniklé emulze se pipetuje 15 ml na SPE kolonku. Po 15 min se zakotvená fáze vymyje hexanem (1). Eluát se jímá do 50ml nebo 100ml odměrné baňky a doplní se hexanem po značku. Pokud se ve vzorku očekává vysoký obsah vitamínu A a E, je nezbytné ověřit, že vitamíny byly z SPE kolonky zcela vymyty a v případě pozitivního nálezu zajistit eluci veškerých vitamínů.

5.4 Úprava hexanového extraktu

5.4.1 Krmné směsi a premixy

Alikvotní podíl hexanového extraktu (5.3) se odfouká pod proudem dusíku a takto vzniklý odparek se rozpustí v alikvotním podílu methanolu (3). Pokud se pipetuje objem nad 10 ml, extrakt se pipetuje do 100ml varné baňky s kulatým dnem. V tomto případě se obsah baňky odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Odparek se rozpustí v definovaném objemu methanolu (3).

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (0,45 µm) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 min při 9 000 ot/min.

5.4.2 Krmiva s obsahem robenidinu

Obsahují-li premixy doplňkových látek robenidin, robenidin se extrahuje kyselinou chlorovodíkovou (21). Do 250ml dělicí nálevky se pipetuje definované množství hexanového extraktu, v případě nutnosti se objem hexanové fáze upraví na cca 10 ml hexanem a přidá se 20 ml kyseliny chlorovodíkové (21). Obsah se protřepe, po rozdělení fází se vodná fáze odpustí a extrahuje se ještě 2 × s 20 ml kyseliny chlorovodíkové (21). Po odpuštění posledního podílu vodné fáze se obsah dělicí nálevky promyje 3 × 100 ml vody do odstranění kyselé reakce, hexanová fáze se přefiltruje přes vrstvu síranu sodného bezvodého (14) do varné baňky s kulatým dnem na 100 ml, přičemž filtr s vrstvou síranu sodného i dělicí nálevky se propláchnou 20 ml hexanu, obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu pod proudem dusíku (22). Odparek se rozpustí v definovaném množství methanolu.

V případě obsahu robenidinu v krmných směsích se postupuje podle 5.3, hexanové extrakty se shromažďují v 500ml dělicí nálevce. Přidá se 50 ml kyseliny chlorovodíkové (21) a obsah se třepe manuálně asi 30 s. Po rozdělení fází se vodná fáze odpustí a extrakce se opakuje ještě 2 × s 50 ml kyseliny chlorovodíkové (21). Po odpuštění posledního podílu vodné fáze se obsah dělicí nálevky promyje 3 × 100 ml vody do odstranění kyselé reakce, hexanová fáze se přefiltruje přes vrstvu síranu sodného bezvodého (14) do 250ml varné baňky s kulatým dnem, přičemž filtr s vrstvou síranu sodného i dělicí nálevky se propláchnou 20 ml hexanu, obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (22). Odparek se rozpustí v definovaném množství methanolu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (0,45 µm) nebo se 3 min odstředí na laboratorní odstředivce při 9 000 ot/min.

5.5 Chromatografické stanovení

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému. Uvedené podmínky jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

Tabulka 2. Chromatografické stanovení.

Kolona:	C18 - Nova-Pak 4 µm, 150 mm × 3,9 mm (Waters) nebo podobná
Mobilní fáze:	16
Průtok:	1 ml/min Objem nástřiku (20 – 50) µl
Detektor:	325 nm (0. min až 4. min) 292 nm (4. min až 8. min)
Teplota:	30 °C, Čas analýzy 12,5 min
Retenční čas:	asi 2,1 min - Retinol asi 5,6 min - Tokoferol

5.6 Kalibrace

5.6.1 Příprava pracovního roztoku

Do 250ml kulaté zábrusové baňky s plochým dnem se naváží asi 500 mg vitamínu A (17) a 500 mg vitamínu E (18), přičemž se dbá na ustanovení v poznámce 3, standard se převrství 10 ml ethanolu (4). Postupně se přidá 750 mg kyseliny askorbové (11), 500 mg pevného hydrochinonu (12), 500 mg EDTA (13) a 75 ml roztoku hydroxidu draselného (10). Na baňku se nasadí zpětný chladič a po 5minutovém odvzdušnění dusíkem (22) se baňka ponoří do vodní lázně a obsah baňky se zmýdelňuje po dobu 60 min při teplotě 80 °C za stálého míchání. Po ukončení zmýdelnění se zpětný chladič opláchne asi 30 ml ethanolu (5), přidá se 14 ml vody a obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu.

Do 500ml dělicí nálevky se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (20) a zmýdelněný roztok se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Zmýdelňovací baňka se vypláchne 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (20) a kapalina se převede do dělicí nálevky. Tento postup se opakuje ještě jednou s 60 ml hexanu (1) a krouživým pohybem se promíchá. Hexanový podíl převede do dělicí nálevky k vodno-ethanolické fázi, dělicí nálevka se uzavře a třepe se manuálně po dobu 30 s. Obě fáze se nechají asi 2 min až 5 min rozdělit. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml ethanolu (5) k rozrušení vzniklé emulze. Vodná fáze se hexanem extrahuje ještě 5 × tak, že se vodná fáze extrahuje nejprve s 50 ml hexanu (1) a poté opět s 50 ml hexanu, přičemž po rozdělení fází (viz výše) se hexanové extrakty spojují v 500ml dělicí nálevce. Spojené extrakty se propláchnou 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propláchne 2 × 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží, tak dlouho, až je promývací voda neutrální (po přidání roztoku fenolftaleinu (15) zůstává roztok bezbarvý). Extrakt se filtruje do 500ml odměrné baňky přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (14). Nálevka i filtr se propláchnou 20 ml hexanu (1) a odměrná baňka se doplní hexanem po značku a promíchá. Ke kontrole obsahu vitamínu A a vitamínu E se hexanové extrakty naředí 50 × 2-propanolem (7) pro vitamín A (1 ml do 50ml odměrné baňky) resp. 25 × ethanolem (6) pro vitamín E (1 ml do 25ml odměrné baňky). Takto připravené roztoky standardů se proměří na spektrofotometru v 1cm kyvetě v absorpčním maximu příslušného vitamínu proti příslušnému rozpouštědlu a pro výpočet koncentrace standardu (c) v mg/l pak platí

$$\boldsymbol{c = 10\,000 \times \frac{A}{A_{1cm}^{1\%}}}$$

Je-li navážka standardu m (g), konečný objem extraktu V (l) a ředění R, pak platí pro koncentraci standardu X (mg/g)

$$X = 10\,000 \times \frac{AV \times R}{\boldsymbol{A_{1cm}^{1\%} \times m}}$$

Pro vitamín A (m.j./g) platí

$$Y = 1\,000 \times \frac{X}{0{,}3} = 10^7 \times \frac{AV \times R}{\boldsymbol{A_{1cm}^{1\%} \times m \times 0{,}3}}$$

Pro DL-α-tokoferol v ethanolu při vlnové délce 292 nm je $A_{1cm}^{1\%}$= 74,7, pro retinol v 2- propanolu při vlnové délce 325 nm je $A_{1cm}^{1\%}$= 1821.

5.6.2 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibrační křivky

Do sady 25ml odměrných baněk se odpipetuje postupně (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml hexanového extraktu vitamínu A a vitamínu E, získaného podle 5.6.1, rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku (22), doplní se methanolem (3) po značku a promíchá. Aktuální koncentrace vitamínu A a vitamínu E se přepočte podle zjištěné koncentrace podle 5.6.1. Takto připravené kalibrační roztoky se nanáší postupně na chromatografickou kolonu o objemu nástřiku 25 µl. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

6 Výpočet

Obsah vitamínu A vyjádřený v m.j./kg a obsah vitamínu E v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$\boldsymbol{X = \frac{c \times V \times R}{m_a} = \frac{c}{F}}$$

kde

c je koncentrace vitamínu odečtená z kalibrační křivky v m.j./l nebo mg/l,

m_a hmotnost zkušebního vzorku v g,

V objem hexanového extraktu v ml,

R ředění resp. zkoncentrování během přípravy,

F faktor ředění.

Poznámky

6 Faktor korigovaný se vypočítá takto

$$F_k = F \times F\% \qquad F\% = \frac{V_{kor}}{V} \qquad V_{kor} = \frac{V}{\rho} \qquad \rho = \frac{m}{V_{pip}}$$

kde

F_K je korigovaný faktor ředění resp.zakoncentrování,

F faktor ředění resp.zakoncentrování,

F% přepočtený faktor na korigovaný objem,

V kor objem extraktu korigovaný na ρ (ml),

V objem extraktu (ml),

V_{pip} *pipetovaný objem zmýdelněného vzorku (ml),*

P hustota výluhu (g/ml),

m hmotnost pipetovaného objemu zmýdelněného vzorku (g).

7 Literatura

1 Prováděcí nařízení komise (ES) č.2024/771 Příloha IV postup A, s uplatněním přílohy II. C, tohoto Nařízení.