

B) STANOVENÍ OBSAHU VITAMINU E

Obsah vitamínu E se stanoví takto:

- metodou analýzy stanovenou v normě EN 17547 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení obsahu vitamínu A, E a D ⁽³⁾ – Metoda využívající extrakci a přečištění na pevné fázi (SPE) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nebo
- vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 9 níže.

1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vitamínu E v krmivech. Obsah vitamínu E se vyjadřuje jako mg DL- α -tokoferol-acetátu na kg. 1 mg DL- α -tokoferol-acetátu odpovídá 0,91 mg DL- α -tokoferolu (vitamin E).

Mez stanovitelnosti je 2 mg vitamínu E/kg. Tato mez stanovitelnosti je dosažitelná pouze s fluorescenčním detektorem. Při použití UV detektoru je mez stanovitelnosti 10 mg/kg.

2. Princip

Vzorek se hydrolyzuje ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a vitamin E se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v methanolu a, pokud je to nutné, naředí se na vhodnou koncentraci. Obsah vitamínu E se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s fluorescenční nebo UV detekcí.

3. Činidla

- 3.1. Ethanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petrolether, bod varu 40–60 °C
- 3.3. Methanol
- 3.4. Roztok hydroxidu draselného, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Roztok askorbátu sodného, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (viz poznámky v bodě 7.7)
- 3.6. Sulfid sodný, $\text{Na}_2\text{S}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Roztok sulfidu sodného, $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$ v glycerolu, $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$ (pro $x = 9$) (viz poznámky v bodě 7.8)
- 3.7. Roztok fenolftaleinu, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ v ethanolu (bod 3.1)
- 3.8. Mobilní fáze pro HPLC: směs methanolu (bod 3.3) a vody, např. 980 + 20 (v + v). Přesný poměr bude určen podle charakteristiky použité kolony.
- 3.9. Dusík, prostý kyslíku
- 3.10. DL- α -tokoferol-acetát, extra čistý, s ověřenou aktivitou
 - 3.10.1. Zásobní roztok DL- α -tokoferol-acetátu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 100 mg DL- α -tokoferol-acetátu (bod 3.10). Rozpustí se v ethanolu (bod 3.1) a doplní se jím po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL- α -tokoferol-acetátu. (UV kontrola – viz bod 5.6.1.3; stabilizace – viz poznámky v bodě 7.4).

⁽³⁾ Metoda analýzy stanovená v normě EN 17547 se označuje jako alternativní metoda, která se má použít pro účely úřední kontroly pro stanovení obsahu vitamínu A a E namísto metody popsané pro stanovení obsahu vitamínu A v části A této přílohy a pro stanovení obsahu vitamínu E v části B této přílohy.

- 3.11. DL- α -tokoferol, extra čistý, s ověřenou aktivitou
- 3.11.1. Zásobní roztok DL- α -tokoferolu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 100 mg DL- α -tokoferolu bod (bod 3.11). Rozpustí se v ethanolu (bod 3.1) a doplní se jím po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL- α -tokoferolu. (UV kontrola – viz bod 5.6.2.3; stabilizace – viz poznámky 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT) (viz poznámky 7.5)

4. **Přístroje**

- 4.1. Rotační filmová odparka
- 4.2. Nádobí z tmavého skla
 - 4.2.1. Baňky s plochým dnem nebo kónické baňky, 500 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem
 - 4.2.2. Odměrné baňky s úzkým hrdlem a skleněnou zábrusovou zátkou, objem 10, 25, 100 a 500 ml
 - 4.2.3. Dělicí nálevky, kónické, 1 000 ml, se skleněnou zábrusovou zátkou
 - 4.2.4. Hruškovité baňky, 250 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem
- 4.3. Allihnův chladič, délka pláště 300 mm, se skleněným zábrusem a s adaptérem na zavádění plynu
- 4.4. Skládaný filtrační papír pro separaci fází, průměr 185 mm (např. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Zařízení pro HPLC s dávkovacím systémem
 - 4.5.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm \times 4 mm, C₁₈, náplň 5 nebo 10 μ m, nebo obdobná
 - 4.5.2. Fluorescenční nebo UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou
- 4.6. Spektrofotometr s 10 mm křemennými kyvetami
- 4.7. Vodní lázeň s magnetickou míchačkou
- 4.8. Extrakční zařízení (viz obrázek 2) sestávající z/ze:
 - 4.8.1. Skleněného válce o objemu 1 litr opatřeného skleněným zábrusovým hrdlem a zátkou
 - 4.8.2. Vkladatelného zařízení se skleněným zábrusem, s postranním raménkem a nastavitelnou trubičkou, která prochází středem. Nastavitelná trubička má spodní konec vytvarovaný do tvaru U a zúženou výpust na opačné straně tak, aby bylo možné převést horní vrstvu kapaliny z válce do dělicí nálevky.

5. **Postup**

Poznámka: Vitamin E je citlivý na (UV) světlo a oxidaci. Všechny úkony se provádí bez přístupu světla (používá se nádobí z tmavého skla nebo se skleněné nádoby chrání před světlem hliníkovou fólií) a kyslíku (pod dusíkem). Vzduch nad kapalinou se během extrakce vytěsňuje dusíkem (aby nedošlo k přetlakování, je nutno občas uvolnit zátku).

5.1. *Příprava vzorku*

Vzorek se rozemele tak, aby prošel sítem s oky o velikosti 1 mm a aby během přípravy nedošlo k jeho zahřátí. Mletí musí být provedeno bezprostředně před vážením a saponifikací, jinak může dojít ke ztrátám vitamínu E.

5.2. Saponifikace

Podle obsahu vitamínu E ve vzorku se s přesností na 0,01 g naváží 2–25 g vzorku do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (bod 4.2.1). Za intenzivního míchání se přidá 130 ml ethanolu (bod 3.1), přibližně 100 mg BHT (bod 3.12), 2 ml roztoku askorbátu sodného (bod 3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (bod 3.6). Baňka se připojí k chladiči (bod 4.3) a ponoří se do vodní lázně s magnetickou míchačkou (bod 4.7). Zahřeje se k varu a vaří se pod refluxem 5 minut. Potom se přes chladič (bod 4.3) přidá 25 ml roztoku hydroxidu draselného (bod 3.4) a vaří se pod refluxem za míchání pod pomalým proudem dusíku dalších 25 minut. Potom se chladič opláchne přibližně 20 ml vody a obsah baňky se nechá vychladnout na laboratorní teplotu.

5.3. Extrakce

Saponifikovaný roztok se dekantací a propláchnutím celkem 250 ml vody převede kvantitativně do 1 000 ml dělicí nálevky (bod 4.2.3) nebo do extrakčního zařízení (bod 4.8). Saponifikační baňka se postupně opláchne 25 ml ethanolu (bod 3.1) a 100 ml petroletheru (bod 3.2) a oba oplachy se převedou do dělicí nálevky nebo do extrakčního zařízení. Konečný poměr vody a ethanolu v kombinovaných roztocích musí být asi 2:1. Roztok se dvě minuty intenzivně třepe a potom se nechá dvě minuty stát.

5.3.1. Extrakce v dělicí nálevce (bod 4.2.3)

Po separaci vrstev (viz poznámka v bodě 7.3) se petroletherová vrstva převede do další dělicí nálevky (bod 4.2.3). Extrakce se opakuje dvakrát se 100 ml petroletheru (bod 3.2) a dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 3.2).

Spojené extrakty v dělicí nálevce se dvakrát promyjí mírným kroužením (aby nevznikala emulze) 100 ml vody a potom se opakovaně protřepávají se 100 ml vody, dokud voda nezůstane po přidání roztoku fenolftaleinu (bod 3.7) bezbarvá (obvykle stačí čtyři promytí). Promytý extrakt se přefiltruje do 500 ml odměrné baňky (bod 4.2.2) přes suchý skládaný filtr pro separaci fází (bod 4.4), aby se odstranila suspendovaná voda. Dělicí nálevka a filtr se opláchne 50 ml petroletheru (bod 3.2). Baňka se petroletherem (bod 3.2) doplní po značku a důkladně promíchá.

5.3.2. Extrakce v extrakčním zařízení (bod 4.8)

Po separaci vrstev (viz poznámka v bodě 7.3) se ze skleněného válce (bod 4.8.1) odstraní zátky a místo ní se vloží vkladatelé zařízení se skleněným zábrusem (bod 4.8.2). Spodní strana nastavitelné U-trubičky se umístí tak, aby byla právě nad rozhraním. Za použití tlaku dusíku (přiváděného postranním raménkem) se převede horní petroletherová vrstva do 1 000 ml dělicí nálevky (bod 4.2.3). Přidá se 100 ml petroletheru (bod 3.2), skleněný válec se zazátkuje a důkladně protřepe. Po separaci vrstev se horní vrstva opět převede stejným způsobem do dělicí nálevky. Extrakce se opakuje s dalšími 100 ml petroletheru (bod 3.2) a pak ještě dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 3.2). Horní petroletherová vrstva se vždy přidá k předchozí do dělicí nálevky.

Spojené extrakty petroletheru v dělicí nálevce se promyjí, jak je popsáno v bodě 5.3.1, a postupuje se dále podle popisu v uvedeném bodě.

5.4. Příprava roztoku vzorku pro stanovení HPLC

Alikvotní část roztoku petroletheru (podle bodu 5.3.1 nebo 5.3.2) se odpipetuje do 250 ml hruškovité baňky (bod 4.2.4). Rozpouštědlo se na rotační odparce (bod 4.1) odpaří za sníženého tlaku při teplotě vodní lázně nepřekračující 40 °C téměř do sucha. Atmosférický tlak se obnoví zavedením dusíku (bod 3.9) do baňky a ta se odpojí od rotační odparky. Zbytek rozpouštědla se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.9) a odparek se ihned rozpustí ve známém objemu (10–100 ml) methanolu (bod 3.3) (koncentrace DL- α -tokoferolu musí být v rozmezí 5 $\mu\text{g/ml}$ až 30 $\mu\text{g/ml}$).

5.5. Stanovení pomocí HPLC

Vitamin E se separuje na koloně C_{18} s reverzní fází (bod 4.5.1) a jeho koncentrace se měří fluorescenčním detektorem (excitace: 295 nm, emise: 330 nm) nebo UV detektorem (292 nm) (bod 4.5.2).

Do přístroje se nastříkuje alikvotní část (např. 20 µl) methanolickeho roztoku získaného podle bodu 5.4 a eluuje se mobilní fází (bod 3.8). Průměrná hodnota výšek (ploch) píků se vypočte z několika opakovaných nástřiků téhož roztoku vzorku nebo kalibračních roztoků (bod 5.6.2).

Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou doporučeny; lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , náplň 5 nebo 10 µm nebo obdobná
Mobilní fáze (bod 3.8):	Směs methanolu (bod 3.3) a vody např. 980 + 20 (v + v).
Průtok:	1–2 ml/min
Detektor (bod 4.5.2):	fluorescenční detektor (excitace: 295 nm/ emise: 330 nm) nebo UV detector (292 nm)

5.6. Kalibrace (DL- α -tokoferol-acetát nebo DL- α -tokoferol)

5.6.1. Standardní DL- α -tokoferol-acetát

5.6.1.1. Příprava pracovního standardního roztoku

Do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (bod 4.2.1) se odpipetuje 25 ml zásobního roztoku DL- α -tokoferol-acetátu (bod 3.10.1) a hydrolyzuje se podle bodu 5.2. Potom se provede extrakce petroletherem (bod 3.2) podle bodu 5.3 a doplní se na 500 ml petroletherem. 25 ml tohoto extraktu se odpaří na rotační odparce téměř do sucha (viz bod 5.4), zbylé rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.9) a odparek se rozpustí v 25,0 ml methanolu (bod 3.3). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 45,5 µg DL- α -tokoferolu/ml, což odpovídá 50 µg DL- α -tokoferol-acetátu/ml. Pracovní standardní roztok se připravuje před použitím čerstvý.

5.6.1.2. Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do sady 20 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/4,0 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku, doplní se methanolem (bod 3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,5/5,0/10,0 a 25,0 µg/ml DL- α -tokoferol-acetátu, tj. 2,28/4,55/9,10 a 22,8 µg/ml DL- α -tokoferolu.

Provede se opakovaný nástřik 20 µl každého kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestojí kalibrační křivka.

5.6.1.3. UV standardizace zásobního roztoku DL- α -tokoferol-acetátu (bod 3.10.1)

Do 25,0 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,0 ml zásobního roztoku DL- α -tokoferol-acetátu (bod 3.10.1) a doplní se po značku ethanolem. Na spektrofotometru (bod 4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti ethanolu (bod 3.1) v rozmezí 250–320 nm.

Absorpční maximum je při 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ při } 284 \text{ nm v ethanolu}$$

Při tomto ředění musí být získaná hodnota extinkce 0,84–0,88.

5.6.2. Standardní DL- α -tokoferol

5.6.2.1. Příprava pracovního standardního roztoku

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 2 ml zásobního roztoku DL- α -tokoferolu (bod 3.11.1), zředí se methanolem (bod 3.3) a doplní se jím po značku. Nominální koncentrace tohoto roztoku je 40 µg DL- α -tokoferolu/ml, což odpovídá 44,0 µg DL- α -tokoferol-acetátu/ml. Pracovní standardní roztok se připravuje před použitím čerstvý.

5.6.2.2. Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do sady 20 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/4,0 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku, doplní se methanolem (bod 3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,0/4,0/8,0 a 20,0 µg/ml DL- α -tokoferolu, tj. 2,20/4,40/8,79 a 22,0 µg/ml DL- α -tokoferol-acetátu.

Provede se opakovaný nástřik 20 µl každého kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka.

5.6.2.3. UV standardizace zásobního roztoku DL- α -tokoferolu (bod 3.11.1)

Do 25,0 ml odměrné baňky se odpipetuje 2,0 ml zásobního roztoku DL- α -tokoferolu (bod 3.11.1) a doplní se po značku ethanolem. Na spektrofotometru (bod 4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti ethanolu (bod 3.1) v rozmezí 250–320 nm. Absorpční maximum je při 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ při } 292 \text{ nm v ethanolu}$$

Při tomto ředění musí být získaná hodnota extinkce 0,6.

6. Výpočet výsledků

Z průměrné výšky (plochy) píků vitamínu E v roztoku vzorku se stanoví koncentrace roztoku vzorku v µg/ml (počítáno jako DL- α -tokoferol-acetát) porovnáním s kalibrační křivkou (bod 5.6.1.2 nebo 5.6.2.2).

Obsah vitamínu E (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

kde:

- c = koncentrace vitamínu E (jako DL- α -tokoferol-acetátu) v roztoku vzorku (bod 5.4) v µg/ml
- V₁ = objem roztoku vzorku (bod 5.4) v ml
- V₂ = objem alikvotní části (bod 5.4) v ml
- m = hmotnost navážky vzorku v g

7. Poznámky

- 7.1. U vzorků s nízkou koncentrací vitamínu E může být užitečné spojit extrakty petroletheru ze dvou saponifikovaných vzorků (navážka: 25 g) do jednoho roztoku vzorku pro stanovení HPLC.
- 7.2. Hmotnost vzorku pro analýzu nesmí obsahovat více než 2 g tuku.
- 7.3. Pokud nedojde k separaci fází, přidá se přibližně 10 ml ethanolu (bod 3.1), aby se odstranila emulze.
- 7.4. Po spektrofotometrickém měření roztoku DL- α -tokoferol-acetátu nebo DL- α -tokoferolu podle bodů 5.6.1.3 nebo 5.6.2.3 se přidá do roztoku (bod 3.10.1 nebo 3.10.2) přibližně 10 mg BHT (bod 3.12) a roztok se skladuje v chladničce (maximální doba skladovatelnosti činí čtyři týdny).
- 7.5. Místo BHT lze použít hydrochinon.
- 7.6. Separace α -, β -, γ - a δ -tokoferolu je možná s použitím běžné fázové kolony.

- 7.7. Místo roztoku askorbátu sodného lze použít přibližně 150 mg kyseliny askorbové.
- 7.8. Místo roztoku sulfidu sodného lze použít přibližně 50 mg EDTA.
- 7.9. Vitamin-E-acetát hydrolyzuje za alkalických podmínek velmi rychle, a proto je velmi citlivý na oxidaci, zejména v přítomnosti stopových prvků, jako je železo nebo měď. V případě stanovení vitamínu E v premixech s obsahem vyšším než 5 000 mg/kg by důsledkem mohl být rozklad vitamínu E. Proto se pro potvrzení doporučuje metoda HPLC včetně enzymatického rozkladu vitamínu E bez alkalické saponifikace.
8. Opakovatelnost
Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.
9. **Výsledky kolaborativní studie** (*)

	Premix	Premix krmiva	Minerální koncentrát	Proteinové krmivo	Krmivo pro selata
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
prů- měr [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L:	počet laboratoří
n:	počet jednotlivých hodnot
s _r :	standardní odchylka opakovatelnosti
s _R :	standardní odchylka reprodukovatelnosti
r:	opakovatelnost
R:	reprodukovatelnost
CV _r :	variační koeficient opakovatelnosti
CV _R :	variační koeficient reprodukovatelnosti

(*) Provedla pracovní skupina pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Obrázek 2

Extrakční zařízení (4.8)

