

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

СТЕЛЬМАЩУК І.І., КАРБОВСЬКА Р.В.

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІТАМІНУ Є В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Розроблена зручна, селективна і чутлива методика визначення жиророзчинного вітаміну Е в харчових продуктах методом обернено фазової вискоефективної рідинної хроматографії. Розділення досягнуте на колонці MOS (C18, 200 x 2.1mm, 5 μm — розмір частинок сорбенту) при температурі 40°C з градієнтним елююванням рухомої фази, що складається з води (розчин А), ацетонітрилу, (розчин В) і метанолу. Час аналізу складає 32 хвилини при швидкості подачі розчинників — 0,4 мл/хв. Визначення проводилося за допомогою ультрафіолетового і флуоресцентного детекторів, при цьому чутливість, у випадку використання флуоресцентного детектора, вище. Підготовка проб включає такі етапи, як омилення жирів, екстракцію вітамінів, концентрування за допомогою роторного випарника і розчинення в метанолі. На основі отриманих результатів показано, що методика є простою у виконанні і придатною для визначення вітаміну Е в харчових продуктах, не дивлячись на складну матрицю продукту.

Разработана удобная, селективная и чувствительная методика определения жирорастворимого витамина Е в пищевых продуктах методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение достигнуто на колонке MOS (C18, 200 x 2.1mm, 5 μm — размер частиц сорбента) при температуре 40°C с градиентным элюированием мобильной фазы, состоящей из воды (раствор А), ацетонитрила, (раствор В) и метанола. Время анализа составляет 32 минуты при скорости подачи растворителей — 0,4 мл/мин. Определение проводилось при помощи ультрафиолетового и флуоресцентного детекторов, при этом чувствительность, в случае использования флуоресцентного детектора, выше. Подготовка проб включает такие этапы, как омыление жиров, экстракцию витаминов, концентрирование при помощи роторного испарителя и растворение в метаноле. На основе полученных результатов показано, что методика является простой в исполнении и пригодной для определения витамина Е в пищевых продуктах, несмотря на сложную матрицу продукта.

A simple and highly sensitive method was developed for the determination of fat-soluble vitamin E in foodstuffs by reversed-phase high performance liquid chromatography. The separation was performed on a silica-based MOS (C18, 200 x 2.1mm, 5 μm particle size) column at 40°C with a gradient elution of mobile phase consisting of water (solvent A), acetonitrile (solvent B) and methanol. The separation was achieved within 32 min with a flow ra-

te of 0,4 ml/min and the detection was performed at ultraviolet (UV) and fluorescent detectors. Sensitive for fluorescent detector is higher than for UV. The sample preparation involved a saponification of fats, extraction of vitamins, concentration in a rotary evaporator and dissolving in methanol. Results demonstrate that the proposed method is simple, sensitive and reliable for the determination of vitamin E in foodstuff, despite the presence of the particularly complex matrix.

Сучасний розвиток харчової промисловості, впровадження нових технологій виготовлення харчової продукції, використання нових харчових добавок і вітамінів для підвищення якості і поживності харчових продуктів ставлять нові вимоги до системи контролю якості продовольчої сировини і готової продукції.

Вітамін Є — загальний термін для токоферолів і токотриенолів. В основі молекули токоферолів лежить токол, а токотриенолів — токол з боковим, насиченим ізопреноїдним ланцюгом (рис. 1).

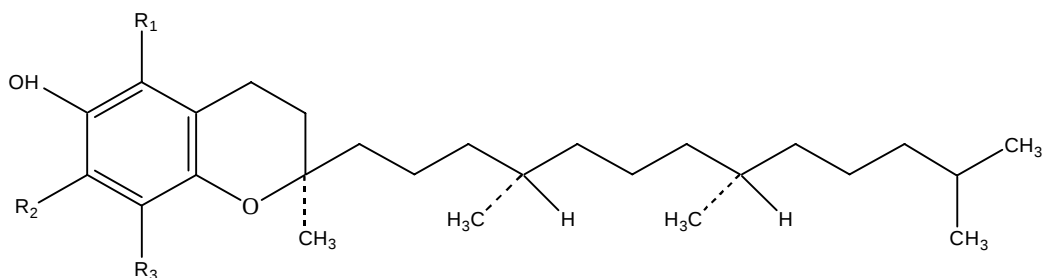


Рис. 1. Загальна формула токоферолу.

Фізіологічна дія вітаміну Є зумовлена його участю в окисно-відновних процесах в організмі. Токофероли протидіють окисненню вітаміну А та жирних кислот в ліпідах, впливають на біосинтез ферментів. Найбільш чутливі до нестачі вітаміну Є статеві органи, при цьому у самок це призводить до порушення процесу вагітності, а у самців — порушення сперматогенезу і здатності сперматозоїдів до запліднення. У зв'язку з цим вітамін Є називають антистерильним вітаміном чи вітаміном розмноження. При авітамініозі також порушуються функції судинної, нервової систем [1].

Токофероли в значній кількості містяться в рослинних об'єктах: зеленій траві, різних оліях, в олії насіння зародків пшениці [2].

Найпоширенішими ізомерами токоферолу є α -, β -, γ -, δ -ізомери (залежно від характеру замісників у кільці токолу), які подані в таблиці 1. Найбільш фізіологічно активний α -ізомер токоферолу [1, 3].

Таблиця 1

Ізомери токоферолу

Ізомери \ Замісники	R ₁	R ₂	R ₃
α -токоферол	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -токоферол	CH ₃	H	CH ₃
γ -токоферол	H	CH ₃	CH ₃
δ -токоферол	H	H	CH ₃
Токол	H	H	H

Токоферол — це злегка жовтувата масляниста рідина, яка не кристалізується. В кристалічній формі можна одержати лише ефіри токоферолів. Токоферолі добре розчинні в хлороформі, метанолі, гексані, діетиловому ефірі, гірше — в спирті та ацетоні [4].

Токоферолі легко утворюють ефіри з різними кислотами: оцтовою, пропійною, янтарною, стеариноюю, пальмітиноюю та ін., що свідчить про наявність у молекулі вільної гідроксильної групи. Токоферолі нестійкі до окисників: особливо легко окислюються δ - та γ -ізмери, тому вони є хорошими антиоксидантами [5]. При відсутності кисню токоферолі відносно стійкі до нагрівання. Вони руйнуються під дією ультрафіолетових променів. З їдкими лугами взаємодіють повільно, і при омиленні рослинних об'єктів не руйнуються.

Сьогодні у харчовій промисловості застосовуються міжнародні документи серії ISO (Міжнародна стандартизаційна організація) щодо визначення вмісту жиророзчинних вітамінів у харчових продуктах [6], та європейські документи серії EN (європейські нормативи) [7].

Обидві серії міжнародних нормативних документів щодо визначення вітаміну Є пропонують однакові стадії у процесі пробопідготовки: омилення ліпідів, екстракцію вітаміну та випаровування розчинника. Залежно від обраної фази, зразок розчиняється у відповідному розчиннику. В прямофазній вискоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) найчастіше використовують гексан, ізооктан, 2-пропанол [8, 9]. Для зворотньофазної ВЕРХ рекомендовано використання метанолу, ацетонітрилу та води [8, 9].

Для визначення вітаміну Є рекомендується застосування фотометричного та флуоресцентного детекторів. Також пропонується перевіряти концентрацію стандартних розчинів спектрометричним методом, вимірюючи оптичну густину розчину.

Зараз в Україні, як нормативні документи щодо методів визначення жиророзчинних вітамінів, використовують міждержавний стандарт ГОСТ 30417-96, "Методы определения массовых долей витаминов А и Е" [10]. Вітамін Є визначають методом тонкошарової хроматографії за допомогою реактиву Еммери-Енгеля (суміш хлорного заліза та α , α' -діпіридила) з утворенням сполуки з рожевим забарвленням.

Застосування традиційних методів аналізу жиророзчинних вітамінів обмежене складністю підготовки проби, і вимагає значних затрат часу [10]. Методики аналізу і контролю якості харчової продукції повинні бути експресними, селективними, чутливими та інформативними, мати, по можливості, просту пробопідготовку.

Авторами розроблено методику визначення вітаміну в оліях відповідно до міжнародних вимог методом зворотньофазної рідинної хроматографії. Об'єктами дослідження було обрано кілька сортів олій, які аналізували на вміст жиророзчинного вітаміну Є.

Експериментальна частина

Процес підготовки зразків складається з кількох стадій, серед яких: сапонізація, екстракція, випаровування і подальше розведення у метанолі. [6, 7]

Сапонізація. Готують наважку досліджуваного продукту 2-5 г. До гомогенізованого зразка додають 0,25 г аскорбінової кислоти, 50 мл метанолу та 20 мл 50%-го гідроксиду калію [7]. Важливо додавати антиоксидант перед введенням розчину гідроксидом калію, щоб запобігти окисненню вітаміну. Для проведення гідролізу ліпідів отриману суміш поміщають в круглодонну колбу, з'єднану зі зворотним холодильником і витримують на водяній бані при температурі 80°C протягом 40 хв., за-

побігаючи впливу прямого сонячного світла. Якщо після омилення та охолодження на поверхні розчину будуть знаходитися краплини жиру, слід ще додати розчину гідроксиду калію і продовжити гідроліз.

Екстракція. Після гідролізу ліпідів зразок охолоджують і переносять в ділильну лійку, де відбувається екстракція неомиленої частини ліпідів, у тому числі і жиророзчинних вітамінів. Екстракцію проводять 3-4 рази сумішшю гексану та діетилового ефіру у співвідношенні 1:1, в об'ємах від 50 до 150 мл розчинника. Щоб запобігти утворенню емульсії, до розчину слід додати воду у співвідношенні до об'єму кінцевого розчину 1:1, або 4% розчин NaCl. Далі промивають розчин водою до нейтральної реакції промивних вод, перевіряючи лакмусовим папером. Зазвичай, 3-4 разове промивання 50-150 мл розчинника виявляється достатнім. Залишки води видаляють за допомогою фільтрування через безводний сульфат натрію.

Випаровування. отриманий екстракт повністю випаровують використовуючи ротатійний випаровувач, у вакуумі при температурі 30°C.

Розведення. Розчиняють залишки в колбі розчинником, щоб отримати концентрацію співвідносну з діапазоном вимірювання.

Проведення вимірювання

В роботі використали рідинний хроматограф HP 1100 з чотириканальною системою подачі розчинників і насосом, здатним працювати у градієнтному режимі, авто інжектором, для введення різних об'ємів проби, термостатом колонок, діодноматричним (DAD) і флуоресцентним детекторами і комп'ютерною системою HPLC (3D) ChemStation зі спеціальним програмним забезпеченням для автоматичного інтегрування та ідентифікації речовин за допомогою бібліотеки спектрів.

Умови проведення аналізу токоферолів:

Колонка – зворотньофазна C18 MOS 200x2,1мм з передколонкою 20x2,1мм; розмір частинок сорбента в колонці – 5 мкм.

Мобільна фаза: В – ацетонітрил, D – вода, С – метанол.

Градієнт: старт – D – 20%, В – 80%,
15 хв. – В – 80 %, D – 20%,
18 хв. – В – 90%, D – 10%,
21 хв. – В – 95%, С – 5%,
25 хв. – В – 95%, С – 5%,
26 хв. – В – 70 %, D – 30%.

Тривалість аналізу – 32 хв.

Температура термостатування колонки – 40 °C.

Об'ємна витрата елюента: 0,4 мл/хв.

Об'єм введення: 5 мкл.

Детектор: УФ-DAD: А – 280 нм (10);

Обговорення результатів

Ідентифікація проб зразків проводилась шляхом порівняння часів утримування стандартних розчинів та розчинів аналізованих речовин. На рис. 2 представлені хроматограми стандартних розчинів α - та δ -токоферолів, записані за допомогою УФ та флуоресцентного детектора. На хроматограмі перший пік відповідає δ -токоферолу, а другий α -токоферолу.

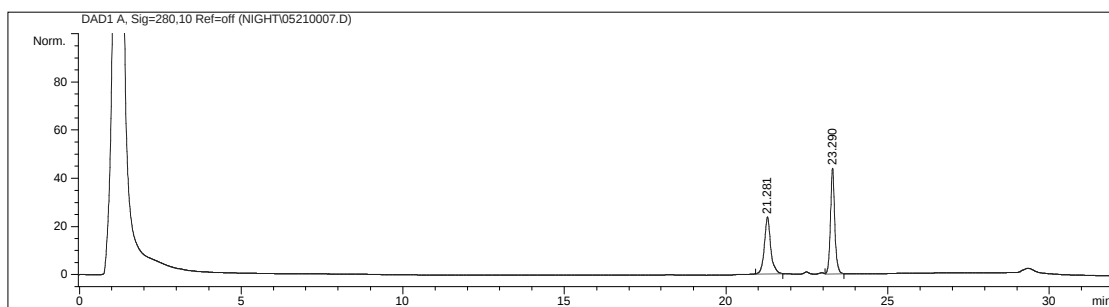


Рис. 2. Хроматограма стандартного розчину суміші α -та δ -токоферолів у співвідношенні 1:1 при 280 нм.

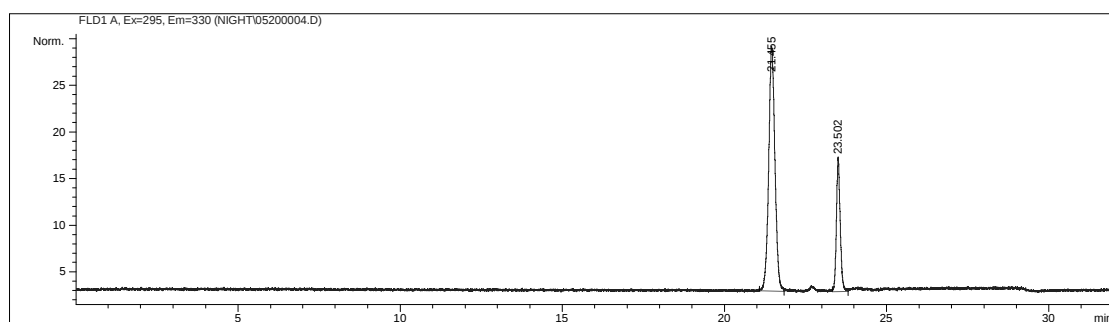


Рис. 3. Хроматограма стандартного розчину α - та δ -токоферолів у співвідношенні 5:1 на флуоресцентному детекторі.

Використовуючи діодно-матричний детектор у точках вершин піків зняли спектр α - та δ -токоферолів в усьому УФ діапазоні (Рис. 4,5).

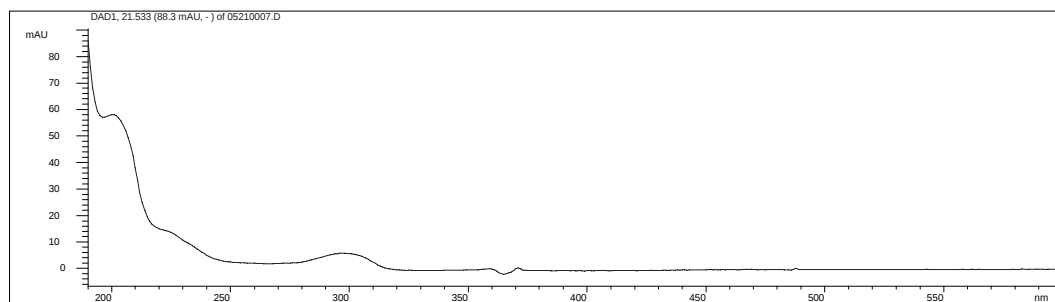


Рис. 4. Спектр α -токоферолу.

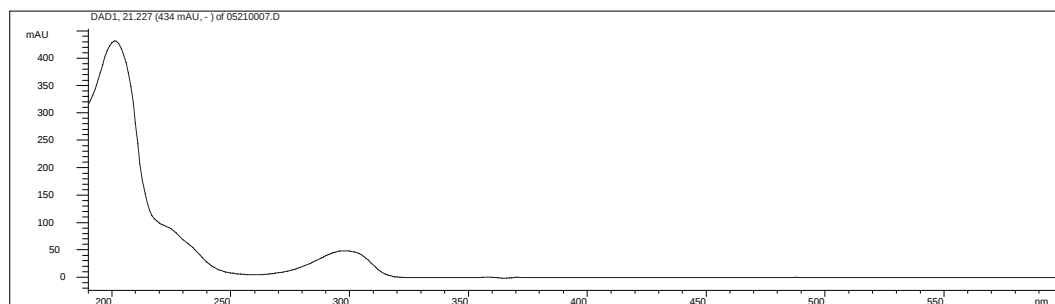


Рис. 5. Спектр δ -токоферолу

Як видно зі спектру поглинання, найбільш інтенсивний пік спостерігається при довжині хвилі 210 нм. Але при цій довжині хвилі поглинають майже всі сполуки, що входять до складу аналізованого продукту. Щоб виключити накладання піків досліджуваних речовин, з піками речовин, що теж присутні в зразку, для ідентифікації обрали менш інтенсивний, але характерний максимум на спектрі поглинання токоферолів при довжині хвилі 280 нм.

З табл. 2 і 3 видно кількісні характеристики хроматографічного розділення за допомогою флуоресцентного та УФ детекторів. Визначено межу детектування, яка для флуоресцентного детектора значно нижча, ніж для УФ.

Таблиця 2

Характеристики проведення хроматографічного аналізу токоферолів за допомогою флуоресцентного детектора

Компонент	Час утримання, хв.	Діапазон вимірювання, мкг/мл	Межа детектування, мкг/мл	Довжина хвилі збудження, нм	Довжина хвилі випромінювання, нм
α -токоферол	23,39	10-50	4	295 нм	330 нм
δ -токоферол	21,39	2-10	0,8	295 нм	330 нм

Таблиця 3

Характеристики проведення хроматографічного аналізу токоферолів за допомогою УФ-DAD детектора

Компонент	Час утримання, хв.	Діапазон вимірювання, мкг/мл	Межа детектування, мкг/мл	Довжина хвилі, нм
α -токоферол	23,39	100-500	10	280 (10)
δ -токоферол	21,39	100-500	10	280 (10)

За допомогою запропонованої методики досліджено готову продукцію: соняшникову, оливкову, рапсову та соєву олії. Отримані результати показали, що визначений вміст вітаміну Е в оліях відповідає задекларованому на етикетках, а іноді навіть перевищує його. В оліях присутні всі ізомери токоферолу (рис. 6).

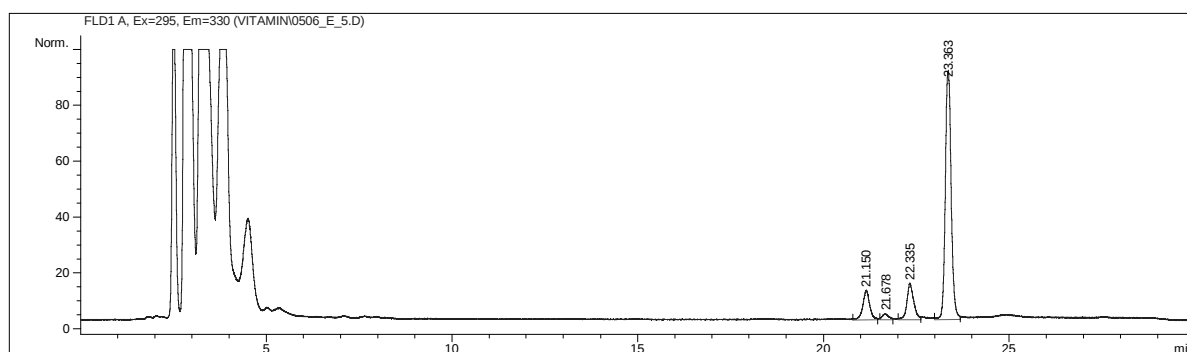


Рис.6. Хроматограма соняшникової олії.

Як видно з хроматограми, значний внесок у загальний вміст токоферолів у соняшниковій олії робить саме фізіологічно активний α -токоферол.

В оливковій олії токоферолів небагато, але в основному міститься α -токоферол, що свідчить про її корисність (рис. 7).

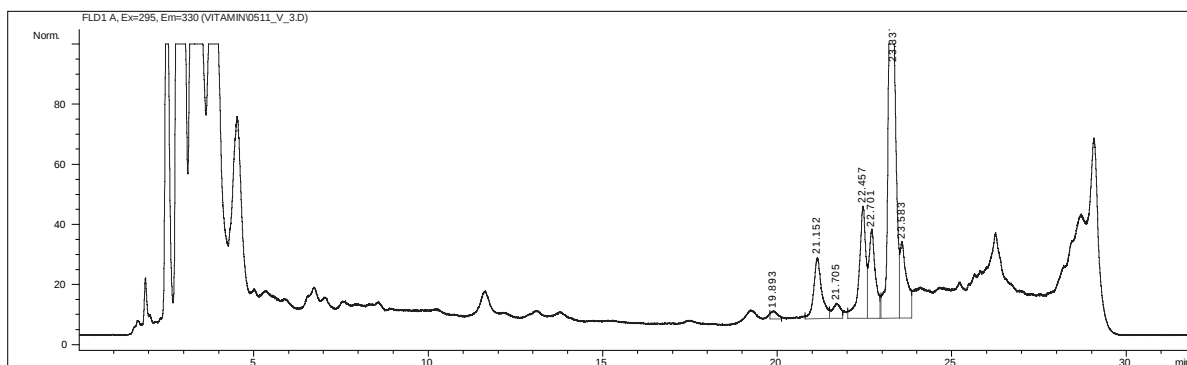


Рис. 7. Хроматограма оливкової олії.

В рапсовій олії переважно присутні β -, γ -токофероли, які є фізіологічно малоактивними (рис. 8).

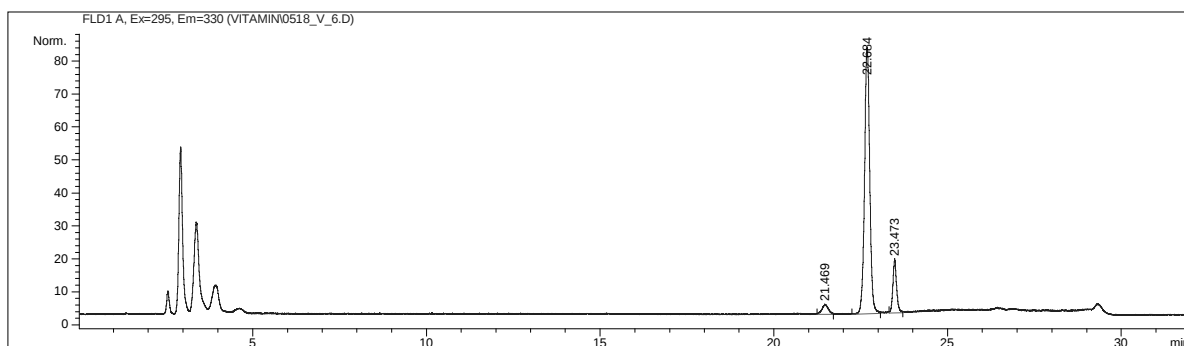


Рис. 8. Хроматограма рапсової олії.

А от в соєвій олії основний внесок роблять β -, γ -, δ -токофероли, які не є фізіологічно активними. Отже, рапсова та соєва олії не є вітамінізованими позаяк містять загалом фізіологічно малоактивні ізомери вітаміну Е. Дані щодо вмісту основних токоферолів у оліях подано на діаграмі (рис. 9).

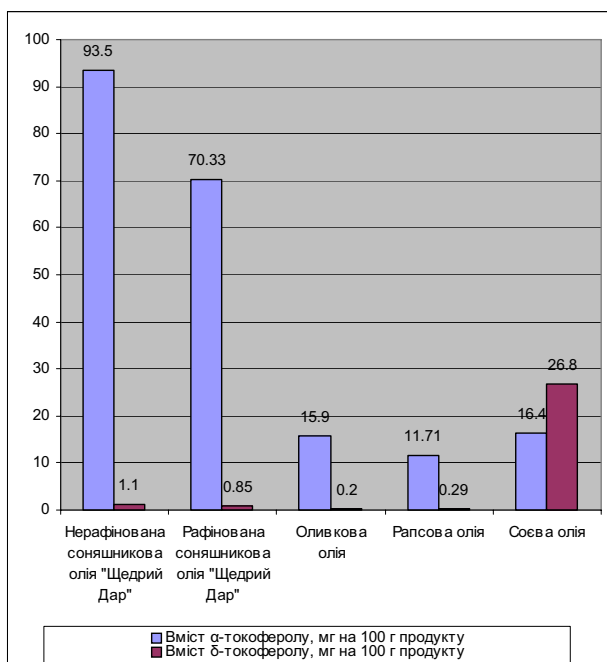


Рис. 9. Діаграма вмісту α - та δ - токоферолів у різних зразках олій.

Висновки

Розроблено методику визначення вмісту вітаміну Е в рослинних оліях на зворотньофазній колонці. Як мобільну фазу було експериментально обрано суміш ацетонітрилу, метанолу та води, завдяки якій досягли ефективнішого розділення ізомерів вітаміну Е. Встановлено оптимальні хроматографічні параметри: температуру, об'ємну витрату елюента, час елюювання. Експериментально вибрано оптимальні довжини хвиль і практично доведено ефективність детектування вітамінів на встановленій аналітичній довжині хвилі. Запропоновано та доведено доцільність детектування вітамінів на двох детекторах, залежно від концентрації аналізованого компонента.

Завдяки таким перевагам як точність, селективність, мінімальна затрата часу та реагентів, розроблену методику можна використовувати для визначення вітаміну Е у харчових продуктах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березовский В.М. Химия витаминов. — М.: Пищевая промышленность, 1973.
2. Скурихин В.Н., Шабаев С.В. Методы анализа витаминов А, Е, D и каротина в кормах биологических объектах и продуктах животноводства. — М.: Мир, 1986.
3. Johanna K.Lang, Lester Packer, Quantitative determination of vitamin E and oxidized and reduced coenzyme Q by high-performance liquid chromatography with in-line ultraviolet and electrochemical detection // J.Chromatography. — 1987. — №385, 109-117.
4. Покровский А.А. Химический состав пищевых продуктов. — М.: Пищевая промышленность, 1982. — 227 с.
5. Kozlov E.I., Salunina I.A., Lyubareva M.L., Nadtochii M.A. HPLC determination of vitamins A, D and E in multivitamin composition // Pharmaceutical chemistry Journal, 2003 — Vol.37.
6. ISO/DIS 6867 "Animal Feeding stuffs — Determination of vitamin E content — High-performance liquid chromatographic method.
7. EN 12822 Foodstuffs — Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography — Measurement of α -, β -, γ -, δ -tocopherols.
8. Хеншен А. Высокоэффективная жидкосная хроматография в биохимии. — М.: Мир, 1988.
9. Arbatskii A.P., Afonshin G.N., Vostokov V.M. Determination of Vitamins in Feed and Foodstuffs by High-performance Liquid Chromatography // Journal of analytical chemistry, 2004 — Vol 59.
10. ГОСТ 30417-96 Масла растительные. Методы определения массовых долей витаминов А и Е.

*Центр випробування продукції Укрметртестстандарт,
м. Київ, вул. Метрологічна, 4, 03143*