

**B. STANOVENÍ OBSAHU VITAMINU E****1. Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vitamínu E v krmivech a premixech. Obsah vitamínu E se vyjadřuje jako mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu na kilogram. 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu odpovídá 0,91 mg DL- $\alpha$ -tokoferolu (vitamin E).

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

- 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 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 7.8).
- 3.7 Roztok fenolftaleinu,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  v ethanolu (3.1).
- 3.8 Mobilní fáze pro HPLC: směs methanolu (3.3) a vody, např. 980 + 20 (v + v). Přesný poměr bude upraven podle charakteristiky použité kolony.
- 3.9 Dusík, prostý kyslíku.
- 3.10 DL- $\alpha$ -tokoferol acetát, extra čistý, s ověřenou aktivitou.
- 3.10.1 Zásobní roztok DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 100 mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu (3.10). Rozpustí se v ethanolu (3.1) a doplní se jím po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu. (UV kontrola – viz 5.6.1.3; stabilizace – viz poznámky 7.4).
- 3.11 DL- $\alpha$ -tokoferol, extra čistý, s ověřenou aktivitou.
- 3.11.1 Zásobní roztok DL- $\alpha$ -tokoferolu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 100 mg DL- $\alpha$ -tokoferolu (3.11). Rozpustí se v ethanolu (3.1) a doplní se jím po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferolu. (UV kontrola – viz 5.6.2.3; stabilizace – viz poznámky 7.4).
- 3.12 2,6-di-terc-butyl-4-methylfenol (BHT) (viz poznámky 7.5).

**4. Přístroje a pomůcky**

- 4.1 Rotační odparka.
- 4.2 Tmavé sklo.
- 4.2.1 Baňky s plochým dnem nebo kónické baňky, 500 ml, se zábrusovým hrdlem.

- 4.2.2 Odměrné baňky s úzkým hrdlem a zábrusovou zátkou, objem 10, 25, 100 a 500 ml.
- 4.2.3 Dělicí nálevky, kónické, 1 000 ml, se zábrusovou zátkou.
- 4.2.4 Hruškovité baňky, 250 ml, se zábrusovým hrdlem.
- 4.3 Allihnův chladič, délka pláště 300 mm, se zábrusem a s adaptérem na zavádění plynu.
- 4.4 Skládáný filtrační papír pro oddělování fází, průměr 185 mm (např. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5 Zařízení HPLC s dávkovacím systémem.
- 4.5.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, náplň 5 nebo 10 μm nebo obdobná.
- 4.5.2 UV nebo fluorescenční detektor s nastavitelnou vlnovou délkou.
- 4.6 Spektrofotometr s 10 mm křemennými kyvetami.
- 4.7 Vodní lázeň s magnetickým mícháním.
- 4.8 Extrakční zařízení (viz obrázek 1) sestávající z:
  - 4.8.1 Skleněného válce o objemu 1 l vybaveného zábrusovým hrdlem a zátkou.
  - 4.8.2 Vkladatelného zařízení se zábrusem, s postranním raménkem a nastavitelnou trubičkou, která prochází středem. Nastavitelná trubička má konec vytvarovaný do tvaru U a zúženou výpust na opačné straně tak, aby bylo možné převést horní vrstvu z válce do dělicí nálevky.

## 5. Postup

*Poznámka:* Vitamin E je citlivý na (UV) světlo a oxidaci. Všechny operace se provádí bez přístupu světla (používá se tmavé sklo nebo se 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 rozmělní tak, aby prošel sítím o velikosti oka 1 mm a aby během úpravy nedošlo k jeho zahřátí. Rozmělnění musí být provedeno **bezprostředně** před vážením a saponifikací, jinak dochází 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 (4.2.1). Za intenzivního míchání se postupně přidá 130 ml ethanolu (3.1), asi 100 mg BHT (3.1.2), 2 ml roztoku askorbátu sodného (3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (3.6). Baňka se připojí k chladiči (4.3) a ponoří se do vodní lázně s magnetickým mícháním (4.7). Zahřeje se k varu a vaří se pod refluxem 5 minut. Potom se přes chladič (4.3) přidá 25 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4) a vaří se pod refluxem za míchání pod pomalým proudem dusíku dalších 25 minut. Potom se chladič opláchne asi 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 (4.2.3) nebo do extrakčního zařízení (4.8). Saponifikační baňka se postupně opláchne 25 ml ethanolu (3.1) a 100 ml petroletheru (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 2 minuty intenzivně třepe a potom se nechá 2 minuty stát.

#### 5.3.1 Extrakce v dělicí nálevce (4.2.3)

Po rozdělení vrstev (viz poznámka 7.3) se petroletherová vrstva převede do další dělicí nálevky (4.2.3). Extrakce se opakuje dvakrát se 100 ml petroletheru (3.2) a dvakrát s 50 ml petroletheru (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 fenoltaleinu (3.7) bezbarvá (obvykle stačí 4 promytí). Promytý extrakt se přefiltruje do 500 ml odměrné baňky (4.2.2) přes suchý skládaný filtr pro oddělování fází (4.4), aby se odstranila suspendovaná voda. Dělicí nálevka se opláchne 50 ml petroletheru (3.2) a ten se přidá přes filtr do téže odměrné baňky. Baňka se petroletherem (3.2) doplní po značku a důkladně promíchá.

#### 5.3.2 Extrakce v extrakčním zařízení (4.8)

Po rozdělení vrstev (poznámka 7.3) se odstraní zátká z válce (4.8.1) a místo ní se vloží vnitřní zařízení (4.8.2). Spodní strana U-trubice 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 (4.2.3). Přidá se 100 ml petroletheru (3.2), válec se zazátkuje a důkladně protřepe. Po oddělení vrstev se horní vrstva opět převede stejným způsobem do dělicí nálevky. Extrakce se opakuje s dalšími 100 ml petroletheru (3.2) a pak ještě dvakrát s 50 ml petroletheru (3.2). Po rozdělení fází se vždy horní petroletherová vrstva 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 bodu 5.3.1.

#### 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 (4.2.4). Roztok se na vakuové rotační odparce (4.1) odpaří za sníženého tlaku při teplotě do 40 °C téměř do sucha. Atmosférický tlak se obnoví zavedením dusíku (3.9) do baňky a ta se odpojí od rotační odparky. Zbytek rozpouštědla se odpaří pod proudem dusíku (3.9) a odparek se ihned rozpustí ve známém objemu (10–100 ml) methanolu. (3.3). Výsledná koncentrace DL- $\alpha$ -tokoferolu musí být 5–30  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 5.5 Stanovení HPLC

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

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

#### Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou doporučené; mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou 250 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$ , náplň 5 nebo 10  $\mu\text{m}$  nebo obdobná chromatografií (4.5.1):

Mobilní fáze (3.8): směs methanolu (3.3) a vody např. 980 + 20 (v + v)

Průtok: 1–2 ml/min

Detektor (4.5.2): fluorescenční detektor  
(excitace: 295 nm/emise: 330 nm) nebo UV detektor (292 nm).

#### 5.6 Kalibrace (DL- $\alpha$ -tokoferol acetát nebo DL- $\alpha$ -tokoferol)

##### 5.6.1 Standardní DL- $\alpha$ -tokoferol acetát

##### 5.6.1.1 Příprava pracovního standardního roztoku

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

#### 5.6.1.2 Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do odměrných baněk na 20 ml se odpipetuje postupně 1,0, 2,0, 4,0 a 10,0 ml pracovních standardních roztoků, doplní se methanolem (3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,5, 5,0, 10,0 a 25,0 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu, tj. 2,28, 4,55, 9,10 a 22,8 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferolu.

Do přístroje se opakovaně nastříkuje 20 µl jednotlivých kalibračních roztoků a stanoví se průměrné hodnoty výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka.

#### 5.6.1.3 UV standardizace zásobního roztoku DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu (3.10.1)

Do 25 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,0 ml zásobního roztoku DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu (3.10.1) a doplní se po značku ethanolem. Na spektrofotometru (4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti ethanolu (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- $\alpha$ -tokoferol

##### 5.6.2.1 Příprava pracovního standardního roztoku

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

##### 5.6.2.2 Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do odměrných baněk na 20 ml se odpipetuje postupně 1,0, 2,0, 4,0 a 10,0 ml pracovních standardních roztoků, doplní se methanolem (3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,0, 4,0, 8,0 a 20,0 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferolu, tj. 2,20, 4,40, 8,79 a 22,0 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu.

Do přístroje se opakovaně nastříkuje 20 µl jednotlivých kalibračních roztoků a stanoví se průměrné hodnoty výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka.

##### 5.6.2.3 UV standardizace zásobního roztoku DL- $\alpha$ -tokoferolu (3.11.1)

Do 25 ml odměrné baňky se odpipetuje 2,0 ml zásobního roztoku DL- $\alpha$ -tokoferolu (3.11.1) a doplní se po značku ethanolem. Na spektrofotometru (4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti ethanolu (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 získána hodnota extinkce 0,6.

### 6. Výpočet a vyjádření výsledků

Ze průměrné výšky (plochy) píků vitamínu E pro roztok vzorku se stanoví koncentrace roztoku vzorku v µg/ml (počítáno jako  $\alpha$ -tokoferol acetát) porovnáním s kalibrační křivkou (5.6.1.2 nebo 5.6.2.2).

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

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

kde:

c = koncentrace vitamínu E (jako  $\alpha$ -tokoferol acetátu) v extraktu vzorku (5.4) v µg/ml

V<sub>1</sub> = objem extraktu vzorku (5.4) v ml

V<sub>2</sub> = objem alikvotní části (5.4) v ml

m = navážka zkušební vzorku v g.

7. **Poznámky**

- 7.1 Pro vzorky s nízkým obsahem vitamínu E může být užitečné spojit dva petroletherové extrakty ze dvou saponifikovaných vzorků (navážka: 25 g) do jednoho roztoku vzorku pro stanovení HPLC.
- 7.2 Navážka vzorku pro zkoušku nesmí obsahovat více než 2 g tuku.
- 7.3 Pokud nedojde k rozdělení fází, přidá se asi 10 ml ethanolu (3.1), aby se odstranila emulze.
- 7.4 Po spektrofotometrickém měření roztoku DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu nebo DL- $\alpha$ -tokoferolu podle bodů 5.6.1.3 nebo 5.6.2.3 se přidá do roztoku (3.10.1 nebo 3.10.2) přibližně 10 mg BHT (3.12) a roztok se skladuje v chladničce (maximální doba skladovatelnosti je čtyři týdny).
- 7.5 Místo BHT je možno použít hydrochinon.
- 7.6 Oddělení  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferolů je možné s použitím normální fázové kolony.
- 7.7 Místo roztoku askorbátu sodného lze použít asi 150 mg kyseliny askorbové.
- 7.8 Místo roztoku sulfidu sodného lze použít asi 50 mg EDTA.
- 7.9 Vitamin E acetát hydrolyzuje v alkalickém prostředí 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 na stejném vzorku nesmí překročit 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

9. **Výsledky kruhových testů<sup>(1)</sup>**

	Premix	Premix krmiva	Mínérální kon- centrát	Proteinové krmivo	Krmivo pro selata
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
průměr (mg/kg)	17 380	1 187	926	315	61,3
$S_r$ (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

<sup>(1)</sup> Provedla pracovní skupina pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Obrázek 1: Extrakční zařízení (4.8)

