	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50102.1 – Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNU E V ŘEPKOVÉM OLEJI METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

2 Princip

Zkušební dávka oleje se rozpustí v n-heptanu a přefiltruje přes nylonový filtr. Obsah vitamínu E, vyjádřený jako obsah jednotlivých tokoferolů a jejich suma, se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí v systému s normální fází.

3 Chemikálie

Chemikálie jsou analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Acetonitril, pro HPLC.
- 2 Ethanol, $\approx 96\%$, denaturovaný.
- 3 Petrolether.
- 4 Tetrahydrofuran, pro HPLC.
- 5 n-Heptan, pro HPLC.
- 6 Butylhydroxytoluen (BHT).
- 7 Mobilní fáze.

Tetrahydrofuran, roztok v n-heptanu, $c = 3,85 \%$.

Příprava: K 1000 ml n-heptanu (5) se pomocí 20ml odměrné pipety přidá 2×20 ml tetrahydrofuranu (4). Směs se homogenizuje 15 min v ultrazvukové lázni.

- 8 α -Tokoferol, standard, např. Supelco DL- α -Tocopherol, 100 mg, 47783.
- 9 γ -Tokoferol, standard, např. Supelco (+)- γ -Tocopherol, 25 mg, 47785.
- 10 δ -Tokoferol, standard, např. Supelco- δ -Tocopherol, 100 mg, 47784.
- 11 α -Tokoferol, zásobní roztok, $c \approx 2000 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 50ml odměrné banky z hnědého skla se naváží asi 100 mg α -tokoferolu (8) a doplní se po značku n-heptanem (5).

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50102.1 – Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

12 γ -Tokoferol, zásobní roztok, $c \approx 1000 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 25ml odměrné banky z hnědého skla se naváží asi 25 mg γ -tokoferolu (9) a doplní se po značku n-heptanem (5).

13 δ -Tokoferol, zásobní roztok, $c \approx 2000 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 50ml odměrné banky z hnědého skla se naváží asi 100 mg δ -tokoferolu (10) a doplní se po značku n-heptanem (5).

14 Směsný pracovní roztok tokoferolů.


Příprava: Postup přípravy směsného pracovního roztoku tokoferolů je popsán v kapitole 5.3.2.

Poznámky

- 1 *Po otevření lahve lze tetrahydrofuran (4) skladovat na tmavém místě při laboratorní teplotě nanejvýš 3 měsíce.*
- 2 *Mobilní fáze (7) se uchovává v lahvi z tmavého skla nanejvýš 1 týden v chladničce.*
- 3 *Skutečná koncentrace α -, γ - a δ -tokoferolu v zásobních roztocích (11), (12), (13) se stanoví spektrofotometricky, viz kapitola 5.3.1.*
- 4 *Zásobní roztoky (11), (12), (13) lze skladovat chráněné před světlem v chladničce po dobu maximálně 1 měsíc.*

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s fluorescenčním detektorem.
- 2 Spektrofotometr.
- 3 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Topné hnízdo pro 250ml baňky.
- 6 Extrakční přístroj (např. podle Twiselmanna).
- 7 Zpětný chladič s účinnou délkou (20 – 30) cm, se zábrusem pro připojení baňky.
- 8 Extrakční baňka se zábrusem, 250 ml.
- 9 Skleněné varné kuličky.
- 10 Rotační vakuová odparka, topná lázeň.
- 11 Stříkačkové nylonové filtry s velikostí pórů 0,45 μm .
- 12 Injekční stříkačky, 2 ml, injekční jehly.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50102.1 – Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

- 13 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.
- 14 Vialky z tmavého skla se šroubovacím uzávěrem, 2 ml.
- 15 Koncentrátor vzorků, např. Termovap 10.
- 16 Laboratorní mlýnek ZM 200.

5 Postup

5.1 Příprava zkušební vzorku

5.1.1 Extrakce oleje

Zkušební vzorek oleje se připraví extrakcí semene řepky. Použije se postup popsany v JPP ÚKZÚZ 10058.1 Stanovení obsahu tuku.

Poznámky


- 5 *Olej se se musí extrahovat bezprostředně po namletí vzorku.*
- 6 *Před extrakcí se k rozpouštědлу přidá asi (5 – 10) mg butylhydroxytoluenu (BHT) (6) na ochranu tokoferolů během extrakce.*
- 7 *Šestihodinovou extrakci vzorku lze rozdělit do dvou dní (např. první den 4 h, druhý den 2 h).*
- 8 *Zbytky petroletheru a vody se ze vzorku po extrakci oleje odpaří na rotační vakuové odparce do sucha.*
- 9 *Olej se extrahuje ve 2 paralelních stanoveních.*

5.2 Úprava vzorku před chromatografickým stanovením

Do 10ml tmavé odměrné baňky se naváží pipetou 0,1 g zkušební vzorku oleje s přesností na 0,01 g. Přidá se asi 5 ml n-heptanu (5), krouživým pohybem se baňka promíchá a doplní n-heptanem (5) po značku. Takto připravený extrakt se přefiltruje přes stříkačkový nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 µm do 2ml vialky a bezprostředně se použije k vlastní chromatografické analýze.

Poznámky

- 10 *Vzorek je během celé přípravy nutné chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem.*
- 11 *Z důvodu ochrany tokoferolů se vzorek pro chromatografické stanovení připravuje bezprostředně po extrakci oleje a následném odpaření zbytku rozpouštědla.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
		50102.1 – Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC	Revize

5.3 Kalibrace

5.3.1 Stanovení přesné koncentrace jednotlivých tokoferolů v zásobních roztocích

Skutečná koncentrace α -, γ - a δ -tokoferolu v zásobních roztocích (11), (12), (13) se stanoví spektrofotometricky:

- 1 ml zásobního roztoku α -tokoferolu (11) se pipetou odebere do 5ml extrakční vialky, která se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v ethanolu (2) a kvantitativně se převede do 50ml odměrné baňky a doplní ethanolem (2) po značku.
- 1 ml zásobního roztoku δ -tokoferolu (13) se pipetou odebere do 5ml extrakční vialky, která se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v ethanolu (2) a kvantitativně se převede do 50ml odměrné baňky a doplní ethanolem (2) po značku.
- 2 ml zásobního roztoku γ -tokoferolů (12) se pipetou odebere do 5ml extrakční vialky, která se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v ethanolu (2) a kvantitativně se převede do 50ml odměrné baňky a doplní ethanolem (2) po značku.

Pomocí spektrofotometru se změří maximální absorbance těchto roztoků v rozsahu vlnových délek 270 nm až 310 nm. Takto připravené roztoky standardů se proměří na spektrofotometru v 1 cm kyvetě v absorpčním maximu příslušného tokoferolu proti příslušnému rozpouštědлу. Pro výpočet koncentrace standardu (c) v $\mu\text{g/ml}$ pak platí:

$$c = 10000 \times \frac{A \times R}{A_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

kde c je koncentrace standardu v $\mu\text{g/ml}$,

A absorbance roztoku,

R ředění roztoku tokoferolu v ethanolu (R = 50).


Pro α -tokoferol v ethanolu při vlnové délce 292 nm $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 76$,

γ -tokoferol v ethanolu při vlnové délce 296 nm, $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 91$,

δ -tokoferol v ethanolu při vlnové délce 298 nm, $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 87$.

Poznámky

12 Každý jednotlivý roztok tokoferolu v ethanolu se měří spektrofotometricky ve třech opakováních. Pro každý z roztoků se vypočítá průměrná absorbance A, která se použije k výpočtu skutečné koncentrace zásobních roztoků.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50102.1 – Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

5.3.2 Příprava směsného roztoku tokoferolů

Pracovní roztoky jednotlivých tokoferolů se připraví ředěním příslušných zásobních roztoků:

Pracovní roztok α -tokoferolu, $c \approx 40 \mu\text{g/ml}$ (A).

Příprava: Do 50ml tmavé odměrné baňky se pipetuje 1 ml zásobního roztoku α -tokoferolu (11) a doplní se po značku n-heptanem (5).

Pracovní roztok δ -tokoferolu, $c \approx 40 \mu\text{g/ml}$ (B).

Příprava: Do 50ml tmavé odměrné baňky se pipetuje 1 ml zásobního roztoku δ -tokoferolu (13) a doplní se po značku n-heptanem (5).

Pracovní roztok γ -tokoferolu, $c \approx 40 \mu\text{g/ml}$ (C).

Příprava: Do 25ml tmavé odměrné baňky se pipetuje 1 ml zásobního roztoku γ -tokoferolu (12) a doplní se po značku n-heptanem (5).

Pracovní směsný roztok tokoferolů (14).

Příprava: Pracovní směsný roztok se připraví smícháním pracovních roztoků jednotlivých tokoferolů (A), (B), (C) do 50ml tmavé odměrné baňky. Objem pracovních roztoků jednotlivých tokoferolů se zvolí tak, aby jejich výsledná koncentrace odpovídala požadovanému rozsahu analýzy. Obvyklá koncentrace pro analýzu je pro α -tokoferol, $c \approx 11 \mu\text{g/ml}$, pro δ -tokoferol, $c \approx 13 \mu\text{g/ml}$, pro γ -tokoferol, $c \approx 0,8 \mu\text{g/ml}$. Objem baňky se doplní po značku n-heptanem (5).


5.3.3 Příprava kalibračních roztoků tokoferolů

Do sady 10ml tmavých odměrných baněk se pipetuje postupně (0; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0) ml pracovního směsného roztoku tokoferolů (14). Baňky se doplní po značku n-heptanem (5). Vypočítá se aktuální koncentrace jednotlivých tokoferolů v kalibračních roztocích z koncentrací zjištěných podle 5.3.1.

5.4 Chromatografické stanovení

Vlastní analýza se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím fluorescenčního pole. Jednotlivé tokoferoly se separují izokratickou elucí na chromatografické diolové koloně s normální fází. Detekují se při 295 nm (excitace) a 330 nm (emise). Příklad nastavení chromatografických podmínek je uveden v tabulce č. 1.

Jednotlivé tokoferoly se identifikují srovnáním retenčních časů standardů α -tokoferolu, γ -tokoferolu a δ -tokoferolu s retenčními časy píků v analyzovaném vzorku. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu. Pro α -, γ - a δ -tokoferol se připraví nejméně sedmibodové kalibrační přímky. Kontroluje se linearita kalibračních grafů.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50102.1 – Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

Tabulka č.1. Chromatografické podmínky, příklad.

Kolona	LiChrospher 100Diol 5 μ m, (250 \times 4) mm CrtdgCol
Předkolona	LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 DIOL (5 μ m)
Mobilní fáze	Tetrahydrofuran, roztok v n-heptanu (7)
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Teplota kolony	25 °C
Objem nástřiku	10 μ l
Detekce	295 nm (excitace), 330 nm (emise).

Poznámky


13 Při separaci jednotlivých tokoferolů je vhodné po každém vzorku kolonu propláchnout mobilní fází po dobu 10 min, při průtoku 1ml/min; před měřením po dobu 15 min, při průtoku 0,5ml/min, po měření po dobu 30 min, při průtoku 0,5ml/min.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah vitamínu E, stanovený jako obsah jeho vitamerů α -, γ - a δ -tokoferolů ve vzorku řepkového oleje se vypočítá z kalibrační závislosti. Vitamin E se může stanovit také jako výpočtový parametr – suma tokoferolů ($\alpha + \gamma + \delta$) tokoferol. Sestrojí se grafy závislosti plochy píků tokoferolů na koncentraci v požadovaném rozsahu. Ze směrnice kalibrační přímky se zjistí koncentrace každého tokoferolu v extraktu. Výsledná koncentrace α -, γ - a δ -tokoferolu ve vzorku, vyjádřená v mg/kg se vypočítá podle vztahu:

$$x = \frac{c \times V}{m}$$

- kde
- x je obsah tokoferolu (α -), nebo (γ -), nebo (δ -) ve vzorku v mg/kg,
 - c koncentrace tokoferolu (α -), nebo (γ -), nebo (δ -) zjištěná z kalibrační závislosti v μ g/ml,
 - V objem extrakční směsi vzorku v ml,
 - m navážka vzorku v g.

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50102.1 – Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

Poznámky

14 Podle ČSN EN ISO 9936 je na výpočet možné použít také vztah:

$$x = \frac{\rho \times A_t \times V}{A_s \times m}$$

- kde x je obsah tokoferolu (α -), nebo (γ -), nebo (δ -) ve vzorku v mg/kg,
 ρ koncentrace tokoferolu (α -), nebo (γ -), nebo (δ -) zjištěná z kalibrační závislosti v $\mu\text{g/ml}$,
 A_t průměrná plocha píku tokoferolu (α -), nebo (γ -), nebo (δ -) ve zkušebním vzorku,
 V objem extrakční směsi vzorku v ml,
 A_s průměrná plocha píku získaného pro standard tokoferolu (α -), nebo (γ -) nebo (δ -).
 m navážka vzorku v g.

7 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 9936. 2016. Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení obsahu tokoferolu a tokotrienolu metodou HPLC.