

8. Oznaczanie zawartości *all-trans*-retinolu (witaminy A), cholekalcyferolu (witaminy D₃) oraz α -tokoferolu (witaminy E) w produktach spożywczych i farmaceutycznych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Ważnymi składnikami pokarmowymi w żywieniu człowieka są substancje egzogenne, zwane witaminami. Nie pełnią one w organizmie funkcji nośników energii lub elementów budulcowych, jednakże są substancjami niezbędnymi dla normalnego przebiegu procesów zachodzących w tkankach. Witaminy, wchodząc w szlaki przemiany materii, umożliwiają przebieg różnych reakcji biochemicznych. Ponieważ substancje te nie mogą być wytwarzane przez organizm, muszą być dostarczane z pożywieniem lub w postaci preparatów farmaceutycznych. W organizmie mogą być magazynowane jedynie w niewielkich ilościach.

Z chemicznego punktu widzenia witaminy należą do różnych grup związków organicznych, a jedynie ich znaczenie dla organizmów żywych pozwala opisywać je pod wspólną nazwą. Tradycyjnie, ze względu na rozpuszczalność, witaminy dzieli się na:

- rozpuszczalne w tłuszczach: witamina A, D, E oraz K,
- rozpuszczalne w wodzie: witamina C i witaminy z grupy B: witamina B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ oraz B₁₂.

Zasada oznaczenia:

Witaminy są zmydlane w próbkach za pomocą wodnego roztworu wodorotlenku potasu a następnie ekstrahowane heksanem. Końcowe oznaczenie zawartości witamin wykonywane jest metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w układzie faz odwróconych, z detekcją w ultrafiolecie. Witaminy identyfikowane są na podstawie czasów retencji, a ich zawartość oznaczana jest metodą krzywej wzorcowej.

Odczynniki:

1. Heksan
2. Metanol
3. Bezwodny siarczan sodu
4. Wodorotlenek potasu
5. 2,6-di-*t*-butylo-4-metylofenol (BHT)
6. Metanolowe roztwory wzorcowe witamin: A (0,5 mg/mL), D₃ (1 mg/mL) i E (0,5 mg/mL) z dodatkiem przeciwutleniacza (BHT)
7. Kontrolny roztwór wzorcowy zawierający 0,5 μ g/mL witaminy A, 1 μ g/mL witaminy D₃ oraz 5 μ g/mL witaminy E

Sprzęt laboratoryjny i pomocniczy:

1. Zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej składający się z detektora UV, pompy oraz komputera z oprogramowaniem
2. Spektrofotometr UV-Vis
3. Waga analityczna
4. Moździerz porcelanowy lub homogenizator
5. Wyparka rotacyjna próżniowa
6. Płaszcz grzejny
7. Szkło laboratoryjne: chłodnica zwrotna, kolby okrągłodenne, pipety wielomiarowe, cylindry miarowe, lejki, zlewki, rozdzielacz, kolby stożkowe płaskodenne
8. Sączki
9. Probówki Eppendorfa

Wykonanie doświadczenia:

1. Zmydlanie badanych próbek

Do kolbki okrągłodennej (o poj. 250 mL) naważyc 0,2 – 5 g badanego produktu spożywczego lub farmaceutycznego (jeśli ciało stałe, to dokładnie rozdrobnionego wcześniej) z dokładnością 0,001 g, dodać 50 mL metanolu oraz około 0,03 g BHT (przeciwutleniacz), a następnie dodać 50 mL wodnego roztworu KOH (25 g KOH na 50 mL roztworu) i rozpocząć zmydlanie pod chłodnicą zwrotną ogrzewając kolbę z mieszaniną za pomocą łaźni elektrycznej. Proces zmydlania prowadzić 40 minut w temperaturze około 70°C. W trakcie zmydlania wstrząsać kolbę reakcyjną tak, aby substancja zmydlana nie przywierała do ścianek naczynia. Po zakończeniu zmydlania kolbę reakcyjną ochłodzić wodą z kranu i przenieść mieszaninę reakcyjną do rozdzielacza (o pojemności 500 mL). Przeprowadzić trzykrotną ekstrakcję heksanem, stosując kolejno następujące objętości heksanu: 100, 60 oraz 40 mL. Połączone ekstrakty heksanowe przemyć trzykrotnie wodą (3×100 mL) do odczynu obojętnego, a następnie usunąć ślady wody za pomocą bezwodnego siarczanu sodu. Ekstrakt przesączyć na sączku i odparować do sucha. Pozostałość rozpuścić w metanolu (np. w 1 mL) i przeprowadzić oznaczenie zawartości witamin z zastosowaniem zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

2. Analiza chromatograficzna

Przed rozpoczęciem właściwej analizy badanej próbki należy wykonać analizę chromatograficzną kontrolnego roztworu wzorcowego.

Warunki analizy:

- chromatograf cieczowy składający się z pompy Knauer K-1001 i detektora UV Knauer K-2001;
- kolumna Beckman ODS (5 μ m), o wymiarach 250×4,6 mm;
- objętość dozowania 25 μ l;
- temperatura kolumny 25°C;
- faza ruchoma MeOH : H₂O (83 : 17; v/v);
- natężenie przepływu fazy ruchomej 1,3 mL/min;
- czas analizy 20 min;
- warunki detekcji: witamina A $\lambda = 325$ nm (od 0 do 6 minuty),
witamina D₃ $\lambda = 254$ nm (od 6 do 13 minuty),
witamina E $\lambda = 280$ nm (od 13 do 20 minuty);

3. Przedstawienie wyników końcowych

Dla poszczególnych witamin wykreślić krzywe wzorcowe przedstawiające zależność powierzchni piku od stężenia wzorca (odpowiednie dane przekazuje prowadzący ćwiczenia). W celu wykreślenia krzywych wzorcowych należy wybrać funkcje liniowe przechodzące przez 0. Obliczyć wartości współczynników korelacji dla poszczególnych krzywych wzorcowych (powinny być większe lub równe 0,995). Na podstawie czasów retencji zidentyfikować witaminy w badanej próbce, a ich zawartość wyznaczyć na podstawie powierzchni pików. Wynik końcowy oznaczenia przedstawić w μ g/100g badanego produktu z dokładnością do 0,001.