

Afdeling Levensmiddelen-additieven/
Micronutriënten 1985-02-12

RAPPORT 85.13 Pr.nr. 505.0010

Onderwerp: Literatuuronderzoek HPLC-
methoden voor vitamine E.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling AM (5x),
projektbeheer, projektleider.

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het bepalen van micronutriënten in levensmiddelen.

Onderwerp: Literatuuronderzoek HPLC-methoden voor vitamine E.

Doel:


Het inventariseren van HPLC-methoden voor vitamine E, eventueel in combinatie met vitamine A, in levensmiddelen.


Samenvatting:

Een overzicht van de in de literatuur beschreven HPLC-methoden vanaf + 1977 wordt gegeven.

Conclusie:

- Voor de bepaling van vitamine E is reversed phase HPLC met UV detectie geschikt.
- Eén extractie voor zowel vitamine A als E lijkt mogelijk.
- Simultaan bepalen van vitamine A en E met behulp van UV detectie is meestal niet mogelijk.
- De toepassing van fluorescentiedetectie biedt een aantal voordelen en zal nader onderzocht moeten worden.

Verantwoordelijk: ir P.C.H. Hollman 

Medewerker/samensteller: A. Altena 

Projectleider: ir P.C.H. Hollman

Inleiding

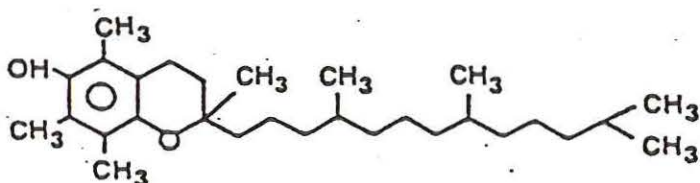
Bij de controle van de proefdiervoeders voor het toxicologieproject 404.0810 worden zowel vitamine A als vitamine E afzonderlijk bepaald. Voor vitamine E wordt hierbij de bewerkelijke klassieke Emmerie-Engel methode gebruikt. Behoeftte bestaat aan een meer specifieke methode voor vitamine E. Door combinatie met de HPLC-methode voor vitamine A is hier waarschijnlijk tijdwinst te behalen.

In dit literatuuronderzoek is alleen gebruik gemaakt van de in de F.S.T.A. (Food Science and Technology Abstracts) vermelde HPLC analysemethoden en de al aanwezige literatuur op de afdeling Levensmiddelenadditieven/Micronutriënten van het RIKILT;

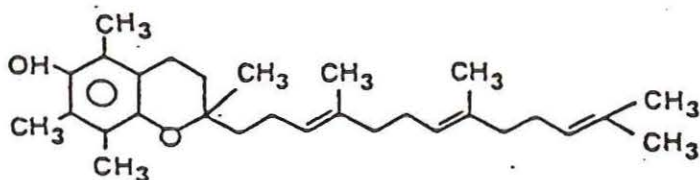
Een overzicht van de hier beschreven methoden is weergegeven in tabel 1.

Eigenschappen en structuren van vitamine E.

Over de biologische werking van vitamine E is weinig bekend. Wel weet men dat vitamine E deficiëntie bij ratten steriliteit veroorzaakt en dat deze stof een antioxidant is. Er zijn een aantal stoffen die vitamine E-aktiviteit bezitten. De tocoferolen en tocotriënolen (tocos = geboorte, fero = dragen) waarvan de α vormen de meeste vitamine aktiviteit hebben, de overige vormen hebben geen, of een te verwaarlozen vitamine-aktiviteit.

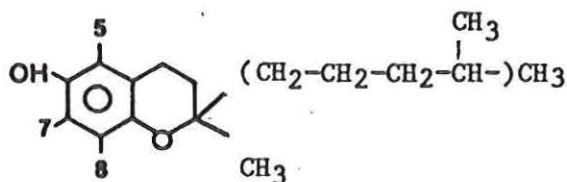


α tocoferol (5,7,8 trimethyltocol)



α tocotrienol (5,7,8 trimethyltocotrienol)

Alle methylderivaten van tocol komen voor, om deze te scheiden is alleen chromatografie geschikt, omdat het verschil alleen in de plaats of hoeveelheid methylgroepen zit.



- α tocoferol = 5,7,8 trimethyltolcol
- β tocoferol = 5,8 dimethyltolcol
- γ tocoferol = 7,8 dimethyltolcol
- tolcoferol = 8 methyltolcol
- tolcoferol = 7 methyltolcol
- tolcoferol = α tocotriënol = 5,7,8 trimethyltocotriënol
- tolcoferol = β tocotriënol = 5,8 dimethyltocotriënol

Alle tocoferolen hebben sterk reducerende eigenschappen, dit maakt de bepaling moeilijk. Omdat deze stoffen vetoplosbaar zijn is het noodzakelijk ze uit het vet te isoleren. Ook wordt vaak de acetaatvorm aan voeding toegevoegd, zodat meestal een verzeeping nodig is.

Voor vitamine E wordt meestal alleen α tocoferol bepaald (deze vorm is voor 80% van de vitamine-aktiviteit verantwoordelijk). 1 mg DL α tocoferol = 1,1 IE vit. E.

Rijk aan vitamine E zijn plantaardige oliën (b.v. tarwekiemolie 90 mg/100 g). Ook de meeste groenten bevatten vitamine E (0,5 mg/100 g) evenals lever (1,4 mg/100 g), spier (0,6 mg/100 g), vis (0,4 mg/100 g), ei (2 mg/100 g) en volkorenbrood (1,3 mg/100 g).

Extraktie

Omdat tocoferolen lichtgevoelig zijn moeten de voorbereidingen plaatsvinden in bruin glaswerk of in een donkere kamer.

Verder zal het vrijwel altijd nodig zijn antioxidanten toe te voegen.

Vaak wordt hiervoor natriumascorbaat genomen.

Er zijn globaal genomen 2 soorten extracties

- met verzeeping (II en III, tabel 1)
- zonder verzeeping (I, tabel 1).

De methode met verzeeping kan weer in tweeën worden gesplitst, n.l.

- extraheren voor de verzeeping (II, tabel 1)
- extraheren na de verzeeping (III, tabel 1).

Volgens McMurray (1) worden de beste resultaten verkregen als de verzeeping voor de extractie wordt uitgevoerd.

Behalve Hung (2), die vitamine E in vis-lever bepaalde, wordt er altijd verzeept als er sprake is van een vet-bevattend produkt.

Bij bepalingen in produkten die geen of heel weinig vet bevatten wordt er vaak niet verzeept. Dergelijke produkten zijn verschillende graanprodukten en meelsoorten.

De verzeeping, die met sterk loog, meestal KOH, wordt uitgevoerd, vindt vaak plaats in ethanolisch milieu. De verzeepingstijd hangt af van de gebruikte temperatuur, bij refluxen varieert de tijd van 30 min tot 1 1/2 uur. Bij lagere temperaturen wordt de tijd verlengd tot soms een hele nacht (ca. 15 uur).

Er wordt met verschillende soorten extractiemiddelen geëxtraheerd, zoals: ethylether (peroxide vrij!), hexaan, acetonitril, pet-ether en chloroform. Het monster wordt verschillende keren met het extractiemiddel geëxtraheerd, waarna de organische fasen worden verzameld en gewassen met water. Ook wordt wel een bekende hoeveelheid extractievloeistof (pet-ether 65-95°C) aan het monster toegevoegd, waarna lang (ca. 30 min) met water wordt geschud. De organische laag wordt dan gebruikt voor injectie (3).

Indien er verzeeping heeft plaatsgevonden kan er op 2 manieren geneutraliseerd worden: 1. voor de extractie (Cohen en la Pointe) (4), 2. of na de extractie wassen tot alkalivrij milieu (M. Cort e.a.) (5). Vaak wordt voor injectie op HPLC het voorbereide monster ingedampt. Dit gebeurt onder N₂ atmosfeer om oxidatie door luchtzuurstof te voorkomen. Het zo geconcentreerde residu wordt soms opgelost of verdund met de elutievloeistof, of ook wel rechtstreeks geïnjecteerd. Dit indampen wordt altijd gedaan, behalve als het gaat om recovery van standaarden, toegevoegde hoeveelheden aan het produkt of bij die methoden waar geen extractie nodig was (Carpenter) (6), om een behoorlijke concentratie van tocoferol te verkrijgen.

Om de vitamines tegen oxidatie te beschermen worden ze vaak gecoat met gelatine, dat niet oplost in organische oplosmiddelen als hexaan (10). Eriksen (12) beschrijft een methode om gelatine gecoate vitamines snel te bepalen.

De extraktiemethoden voor het simultaan bepalen van meerdere vitamines (A,D,E,) wijken niet af van de extraktiemethoden die worden gebruikt voor de bepaling van alleen vitamine E.

HPLC

Zowel Reversed Phase (RP) als Normal Phase (NP) worden gebruikt bij de diverse bepalingen. Het gebruikte eluens is bij RP vaak een methanol-watermengsel, bij NP komen verschillende mengsels van apolaire oplosmiddelen voor zoals hexaan, isopropanol en iso-octaan. Bij bepaling van meerdere vitamines tegelijkertijd wordt wel gebruik gemaakt van gradiëntelutie (zie ook tabel 1).

Detektie geschiedt met UV absorptie en fluorescentie. Als er meerdere vitamines in één run worden bepaald, wordt vaak bij meerdere golflengten (UV) gemeten. Van deze twee detektiemethoden wordt de UV absorptie het meest gebruikt. Fluorescentiedetektie biedt daarentegen een aantal voordelen omdat winst in zowel specificiteit als gevoeligheid verwacht kan worden (Thompson) (20). Door gebruik te maken van deze techniek vervalt de indampstap.

Conclusies

Voor de bepaling van vitamine E is RP-HPLC met UV detektie goed geschikt. Voor monsters die vet bevatten is een verzeeping voor de extractie het meest geschikt. De verzeeping is om tweeërlei redenen noodzakelijk: I. om de goed vetoplosbare vitamines uit de vetmatrix vrij te maken, II. om de eventuele acetaatvormen te hydrolyseren. Deze acetaatvormen worden vaak toegevoegd aan het voedsel. De concentratie van vitamine E is zo laag dat indampen vaak noodzakelijk is. Daarom verdient het aanbeveling en vluchtig extraktiemiddel (pet-ether o.i.d.) te gebruiken.

Bij dit indampen moet rekening worden gehouden met mogelijke oxidatie door luchtzuurstof, daarom wordt dit onder stikstof uitgevoerd. Omdat vitamine E lichtgevoelig is moet de bepaling worden uitgevoerd in een donkere kamer en/of in bruin glaswerk.

Verder moet(en) er vanaf het begin antioxidant(en) toegevoegd worden. Fluorescentiedetektie biedt een aantal voordelen boven UV detektie, nl. betere specificiteit en grotere gevoeligheid. Het aantal beschreven toepassingen is echter nog klein.

Het moet mogelijk zijn om met één extraktiemethode zowel vitamine E als A te extraheren. Omdat de gehalten ver uit elkaar liggen en er verschillende golflengten bij de detektie nodig zijn, wordt het moeilijker deze beide vitamines in één run met behulp van HPLC te bepalen.

Tabel 1. Overzicht van HPLC-methoden voor vitamine E

Kolom	Eluens	Phase	* Extraktie	Detektie	Produkt	Samen met vit. A	Ref. nr.
2 in serie: μ Bondapak fenyl + μ Bondapak C18 30 cm, 3,9 ID	gradiënt 91,5 100% MeOH	RP	I	UV 289 nm en 254 nm	vitamine- preparaten	ja	7
μ Porasil, 30 cm 4 mm ID	hexaan/ CHCl_3 85/15	NP	I	UV 280 nm en fluor ex 360 em 415	graanprodukten	ja	8
μ Bondapak C18 25 cm 4,2 mm ID	methanol/water 95/5	RP	I	UV 280 nm	diervoeders	ja	9
Zipax (r) 1 m, 2,1 ID	gradiënt 50°C methanol/water 95/5	RP	I	UV 254 nm		ja	10
2 x Zorbax in serie 25 cm 4,6 ID	gradiënt methanol/water 86/14 100% ACN	RP	III + lipase	UV 264 nm	babyvoeding	ja	11
chromegasphere SI 60 15 cm 4,6 ID	iso-octaan/tetra- hydrofuraan 97,5/2,5	NP	I en III	fluor 294 nm ex 325 nm em	voedingstoffen	nee	5
μ Bondapak	methanol/water 95/5	RP	II en III	fluor	diervoeders	nee	1
10 μ Partisil 10-pac 25 cm 4 mm ID	iso-octaan en iso- octaan/1,4 dioxaan 98/2 en hexaan/ CH_2Cl_2 /iso-propyl- alkohol 70/30/0,2	NP	II	UV 292 nm	diervoeders	nee	4

Vervolg tabel 1. Overzicht van HPLC-methoden voor vitamine E

Kolom	Eluens	Phase	* Extraktie	Detektie	Produkt	Samen met vit. A	Ref. nr.
μ Bondapak 30 cm 4 mm ID C18	methanol/water 95/5	RP	I	UV 280 nm	toegev. vit. E gelatine gecoat in voedsel	nee	12
μ Bondapak C18 30 cm 3,9 ID + voorkolom	methanol/water 90/10	RP	I	UV 280 nm	vis-lever	nee	2
10 μm ODS 25, cm 4,6 ID; μ Bondapak 30 cm, 4,6 ID Partisil 25 cm 4,6 ID	RP: MeOH/H ₂ O 90/10 NP: cyclohexaan/ isopropanol 98,75/1,25	RP en NP	geen	UV 287 nm en UV 325 nm	vitaminepreparaten	ja	19
Corasil I 60 cm 2 mm ID	hexaan/di-isopro- pylether 94/6	NP	I A	UV 280 nm	menselijk bloedplasma	nee	13
25 cm kiesegel ODS C18	methanol/1% Ammo- niumcarbonaat 95/5	RP	III A	UV 292 nm	vitamineconcentr. mengsels mineraal voedingsmiddelen	nee	3
30 cm 4 mm ID μ Bondapak C18	methanol/water 100,0/ 98/2, 94/4	RP	I A	UV 280 nm	toegevoegd vit. E aan voedsel	nee	14
30 cm 4 mm ID μ Parasil	hexaan/isopropyl- alkohol 98,5/1,5	NP	geen	UV 295 nm	plantaardige oliën	nee	6
25 cm, 16 mm ID en 4 mm ID, lichrosorb SI 60, silicagel, 7,4 (resp. preperatief en analytisch)	iso-octaan/iso- propanol 99,5/0,5	NP	geen	UV 296 nm	olie-achtig tocoferolmengsel	nee	15

Vervolg tabel 1. Overzicht van HPLC-methoden voor vitamine E

Kolom	Eluens	Phase	* Extraktie	Detektie	Produkt	Samen met vit. A	Ref. nr.
25 cm 2 mm ID 5 µ spherisorb	hexaan/isopropanol 9,75/0,25	NP	geen	UV 280 nm	standaardoplossing	nee	16
25 cm 4,6 ID, zorbax ODS + voorkolom met filter	CH ₃ Cl + 0,001% triethylamide (1) /acetonitril/metha- nol 300/700/(2)	RP	I	UV 280 nm 313 nm	babyvoeding	ja	17
25 cm 4,6 ID lichrosorb 10 µm	gradiënt acetoni- tril/water 80/20 100/0 in 9,9 min	RP	III	UV 270 of 295 nm	melkpoeder, baby- voeding, margarine en plant. oliën	ja	18

* Extraktiecoden:

- I extraktie zonder verzeping
- II extraktie voor de verzeping
- III extraktie na de verzeping

Toevoeging A, er wordt niet ingedampt

Geraadpleegde literatuur

1. C.H. McMurray, W.J. BlancFlower, D.A. Rice: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63 (6), (1980), 1258.
2. S.S.O. Hung, Y.C. Cho, S.J. Slinger: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63 (4), (1980), 889.
3. H. Ruckemann, K. Ranft: Z. Lebensm. Unters. Forsch., 166, (1978), 151.
4. H. Cohen, M.R. Lapointe: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63 (6), (1980), 1254.
5. W.M. Cort, T.S. Vicente, E.H. Waysek, B.D. Williams: J. Agric. Food Chem., 31, (1980), 1330.
6. A.P. Carpenter: J. Am. Oil Chem. Soc., 56, (1979), 668.
7. S.A. Barnett, L.W. Frick: Anal. Chem., 51 (6), (1979), 641.
8. W.A. Widicus, J.R. Kirk: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62 (3), (1979), 637.
9. H. Cohen, M.R. Lapointe: J. Agric. Food Chem., 25 (5), (1978), 1210.
10. R.C. Williams, J.A. Schmit, R.A. Henry: J. Chromatogr. Sci., 10, (1972), 494.
11. S.A. Barnett, L.W. Frick, H.M. Baine: Anal. Chem., 52 (4), (1980), 610.
12. S. Eriksen: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63 (5), (1980), 1154.
13. B. Nilsson, B. Johansson, L. Jansson, L. Holmberg: J. Chromatogr., 145, (1978), 169.
14. B. Shaikh, H.S. Haang, W.L. Zielinski jr.: Journal of the A.O.A.C., 60 (1), (1977), 137.
15. R.K.D. Tiebach, M. Schramm: Chromatographia, 13 (7), (1980), 403.
16. C.C. Tangney, J.A. Driskell, H.M. McNair: J. Chromatogr., 172, (1979), 513.
17. W.O. Landen jr.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65 (4), (1982), 810.
18. Dr A. Mankel: Dtsch Lebensm Rundsch., 75 (3), (1979), 77.
19. D.T. Barns, C. Mackay: J. Chromatogr., 200, (1980), 300.
20. J.N. Thompson, Q. Hatina: J. Liq. Chromatogr., 2, (1979), 327.