

HPLC STANOVENÍ OBSAHU VITAMINU E V KRMNÝCH SUROVINÁCH, KRMIVECH A POTRAVINÁCH

ROMANA HOSMANOVÁ^a a MICHAL DOUŠA^b

^a Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno,
Národní referenční laboratoř Plzeň, Slovanská alej 20,
317 60 Plzeň, ^b Zentiva, a.s. Praha, U Kabelovny 130,
102 37 Praha
michal.dousa@hplc.cz

Došlo 19.4.05, přepracováno 2.6.06, přijato 31.8.06.

Klíčová slova: HPLC, vitamin E, krmiva, potraviny

Úvod

Vitamin E společně s vitaminy A, D a K se historicky zařazuje mezi vitaminy rozpustné v tucích (tzv. lipofilní vitaminy). Je to významný antioxidant, chrání lipidy buněčných membrán před poškozením volnými radikály a pravděpodobně se na struktuře membrán přímo podílí. Uplatňuje se také při ochraně lipoproteinů přítomných v plazmě. Strukturálním základem, který je společný všem sloučeninám vykazujícím aktivitu vitaminu E (tzv. vitagenům E), jsou tokol (2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecylchroman-6-ol) a tokotrienol (2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltrideka-3,7,11-trien-1-ylchroman-6-ol), které obsahují chromanový kruh s nasyceným (tokoferoly) nebo nenasyceným (tokotrienoly) isoprenoidním postranním řetězcem¹. Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší polohou a počtem methylových skupin v chromanovém kruhu. K obecným zdrojům vitaminu E patří rostlinné oleje, pšeničné klíčky, sója a v menší míře i obiloviny. V přírodě se nacházejí pouze (+)-tokoferoly, synteticky připravené jsou vždy racemické (±). (+)-Tokoferoly (T) a (+)-tokotrienoly (TT) se liší svou biologickou účinností, přičemž poměry účinnosti jednotlivých sloučenin jsou následující²: α -T: β -T: γ -T: δ -T: α -TT: β -TT = 100 : 25–40 : 5–8 : 1 : 29 : 5. Podle NRC (National Research Council, USA) se definuje aktivita vitaminů E v potravinách jako ekvivalent α -tokoferolu (α -TE). Jeho hodnota se vypočítá tak, že k obsahu (+)- α -tokoferolu (mg) jsou přičteny hodnoty obsahů (mg) ostatních tokoferolů a tokotrienolů přepočtené pomocí následujících koeficientů: pro (+)- β -tokoferol: mg x 0,5; pro (+)- γ -tokoferol: mg x 0,1; pro (+)- δ -tokoferol: mg x 0,01; pro (+)- α -tokotrienol: mg x 0,3 a pro (+)- β -tokotrienol: mg x 0,05. Mezinárodní jednotka vitaminu E (m.j.) je definována jako 1 mg (±)- α -tokoferol-acetátu. Pro přepočet m.j. mezi jednotlivými formami vita-

minu E platí: (+)- α -tokoferol : (±)- α -tokoferol : (+)- α -tokoferol-acetát : (±)- α -tokoferol-acetát : (+)- α -tokoferol-sukcinát = 0,92 : 0,68 : 1,36 : 1,00 : 1,31.

Potřeba vitaminu E v lidské výživě je dostatečně pokryta denním příjmem pestré stravy. Ve výživě hospodářských i domácích zvířat je v současné době potřeba vitaminu E zajištěna jeho dávkováním do krmiv, nejčastěji ve formě acetátu α -tokoferolu.

Stanovení vitaminu E zahrnuje následující kroky: přípravu vzorku, alkalickou hydrolyzu, extrakci vitaminu E a vlastní analytické stanovení metodou HPLC. K separaci tokoferolů a tokotrienolů se může použít jak rozdělení v normálním módu (obvykle na silikagelové stacionární fázi), tak rozdělení v reverzním módu (obvykle na stacionární fázi C18). Při analýze s normálními fázemi může být separováno až 8 tokoferolů a tokotrienolů v isokratickém módu s mobilní fází hexan-tetrahydrofuran (99,5:0,5) (cit.^{3,4}) nebo hexan-diethylether (95:5) (cit.⁵). Jako oficiální metoda EU stanovení vitaminu E v krmivech je doporučena metoda HPLC, která vychází z původních metod stanovení vitaminu E v krmivech a premixech^{6,7}. K separaci vitaminu E dochází na silikagelu za použití mobilní fáze o složení hexan–1,4-dioxan (97:3) s fluorescenční detekcí⁸. V současné době se při stanovení celkového obsahu α -tokoferolu v krmivech a potravinách dává přednost reverzní fázi⁹ i když, jak již bylo řečeno, ke stanovení všech forem tokoferolů je nezbytné použití silikagelové stacionární fáze¹⁰. V české krmivářské legislativě je silikagelová fáze doporučena jako alternativa k reverzní fázi za použití mobilní fáze cyklohexan–ethanol (98,5:1,5) (cit.¹¹). Oproti ostatním publikovaným mobilním fázím^{3–5} je eluční schopnost této mobilní fáze zvýšena kvůli stanovení α -tokoferolu, čímž se dosáhne i snížení doby analýzy. Dále se podle platné české legislativy^{12,13} do obsahu vitaminu E vůbec nezapočítává příspěvek dalších tokoferolů a tokotrienolů, přestože mají významný vliv na celkový obsah vitaminu E (vyjádřený jako ekvivalent α -tokoferolu).

Protože správné a přesné vyjádření obsahu vitaminu E v krmivech a potravinách je poměrně složité, je cílem předkládané práce porovnat obsah vitaminu E vyjádřený jako α -tokoferol oproti obsahu vyjádřenému na základě ekvivalentu α -tokoferolu, porovnat analytické metody (stanovení na reverzní fázi a na silikagelu), analyzovat reálné vzorky a stanovit v nich koncentraci vitaminu E podle současně platné legislativy. Součástí práce je také rozbor mezilaboratorní porovnávací zkoušky stanovení vitaminu E.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Alkalická hydrolyza byla provedena na rotační třepačce RT01 (BMF, Česká republika). Hexanový extrakt byl odpařen na rotační vakuové odparce RVO A400

(Ingos, Česká republika). K zkoncentrování extraktů se používal koncentrátor vzorků Termovap (Ecom, Česká republika). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Hermle Z 230 MR (Hermle, SRN). Všechna měření byla uskutečněna na kapalinovém chromatografu (Waters, USA), který se skládal z vysokotlakého čerpadla W515, fluorimetrického detektoru W487 a datastanice PC Compaq. Byly použity kolony NovaPak C18, 4 μm , 3,9 \times 150 mm a NovaPak Silica 4 μm , 2,1 \times 150 mm (Waters, USA).

Chemikálie a vzorky

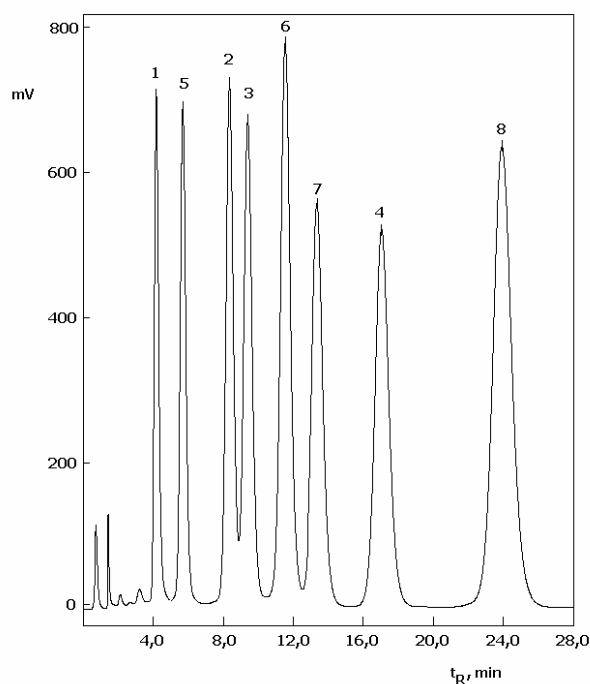
Byly použity methanol, tetrahydrofuran a cyklohexan, čistoty HPLC grade (J. T. Baker, USA) a absolutní ethanol pro UV (Merck, SRN). Ostatní chemikálie byly čistoty p.a. (Lach-Ner, Česká republika). Základní roztoky tokoferolů a tokotrienolů o přibližné koncentraci 500 mg l^{-1} byly připraveny rozpuštěním α -, β -, γ -, δ -tokoferolu a α -, β -, γ -, δ -tokotrienolu (Calbiochem Chemicals, Francie) s deklarovaným obsahem v hexanu. Přesná koncentrace základních roztoků byla stanovena spektrofotometricky. Byla použita 1 cm kyveta a měření probíhalo v absorpčních maximech jednotlivých tokoferolů a tokotrienolů. Kalibrační roztoky o koncentraci 1,0 až 10,0 mg l^{-1} α -, β -, γ -, δ -tokoferolu a α -, β -, γ -, δ -tokotrienolu byly připraveny postupným ředěním základního roztoku methanolem resp. cyklohexanem. Mobilní fáze byly připraveny tyto: mobilní fáze A: cyklohexan–tetrahydrofuran (99,6:0,4), mobilní fáze B: cyklohexan–ethanol (98,5:1,5) a mobilní fáze C: methanol–voda (98:2). K hydrolyze vzorku se používal 60% roztok hydroxidu draselného v roztoku ethanol–voda (1:2). Byly analyzovány suroviny pro výrobu krmiv a krmné směsi odebrané v rámci státního odborného dozoru (zákon o krmivech §16 a §17)¹² a dále komerčně dostupné potraviny (oleje, obiloviny, sušené mléko a další produkty).

Pracovní postup

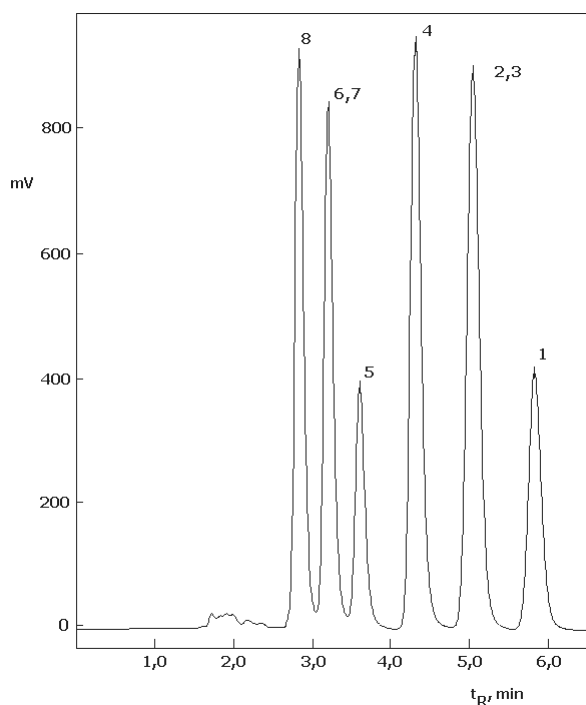
Všechny tuhé vzorky byly upraveny homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm. Mletí bylo provedeno tak, aby se vzorek nezahřival. K 80 g tuhého zkušební vzorku (nebo 2 g oleje) se přidalo 320 ml roztoku ethanol–voda (1:2), 90 ml 60% roztoku KOH, 750 mg kyseliny L-askorbové, 500 mg hydrochinonu a 500 mg EDTA. Směs se hydrolyzovala v 1000 ml kónické baňce na rotační laboratorní třepačce za laboratorní teploty přes noc. Po extrakci se odpipetovalo 50 ml hydrolyzátu, který se extrahoval 4 krát 80 ml hexanu. Spojený hexanový extrakt se vysušil přefiltrováním přes vrstvu bezvodého síranu sodného a odpařil na rotační vakuové odparce při 50 °C na objem 10 ml, který byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn hexanem. Tento extrakt se použil přímo k měření s normální fází. V případě měření s reverzní fází se z tohoto extraktu odpipetoval objem 5 ml, který se odpařil pod proudem dusíku při 45 °C

Tabulka I
HPLC podmínky pro stanovení vitamínu E

Parametr	Normální systém	Reverzní systém
Kolona	Silica NovaPak, 150 \times 2,1 mm, 4 μm	NovaPak C18, 150 \times 3,9 mm, 4 μm
Průtok mobilní fáze	0,9 ml min^{-1}	1,0 ml min^{-1}
Mobilní fáze	cyklohexan–tetrahydrofuran (99,6 : 0,4)	methanol–voda (98 : 2)
Teplota kolony	40 °C	30 °C
Objem nástřiku	40 μl	10 μl
Vlnová délka při fluorescenční detekci		excitační: 292 nm; emisní: 330 nm



Obr. 1. Chromatografická separace tokoferolů na normální fází (Silikagel); 1: α -tokoferol; 2: β -tokoferol; 3: γ -tokoferol; 4: δ -tokoferol; 5: α -tokotrienol; 6: β -tokotrienol; 7: γ -tokotrienol; 8: δ -tokotrienol. Směsný kalibrační standard 4 mg l^{-1} . Kolona: Silica NovaPak, 150 \times 2,1 mm, 4 μm , mobilní fáze: cyklohexan–tetrahydrofuran (99,6 : 0,4), 0,9 ml min^{-1} , vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 292 nm, emisní: 330 nm



Obr. 2. Chromatografická separace tokoferolů na reverzní fázi (C18); 1: α -tokoferol; 2: β -tokoferol; 3: γ -tokoferol; 4: δ -tokoferol; 5: α -tokotrienol; 6: β -tokotrienol; 7: γ -tokotrienol; 8: δ -tokotrienol. Směsný kalibrační standard 4 mg l^{-1} . Kolona: Nova-Pak C18, $150 \times 3,9 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, mobilní fáze: methanol–voda (98 : 2), 1 ml min^{-1} , vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 292 nm, emisní: 330 nm

k suchu a odparek se rozpustil v 5 ml methanolu. Takto připravený extrakt se použil přímo k měření s reverzní fázi. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tab. I.

Výsledky a diskuse

V normálním systému, na koloně silikagel, se rozdělily všechny tokoferoly a tokotrienoly. Pořadí analytů bylo následující α -T, α -TT, β -T, γ -T, β -TT, γ -TT, δ -T a δ -TT (obr. 1), kritickým bodem analýzy bylo rozdělení β - a γ -tokoferolu, kde bylo nakonec dosaženo rozlišení $R_{2,3}=1,29$. V reverzním systému, na koloně C18 se nepodařilo za použitých experimentálních podmínek rozdělit γ - a β -tokoferol a γ - a β -tokotrienol. Analyty se separovaly v pořadí: δ -TT, $(\gamma+\beta)$ -TT, α -TT, δ -T, $(\gamma+\beta)$ -T a α -T (obr. 2) Získané obsahy vitaminů E v surovinách (ze dvou odebraných vzorků a dvou paralelních stanovení), krmných směsích (z jednoho odebraného vzorku a dvou paralelních stanovení) a potravinách (z jednoho vzorku a dvou paralelních stanovení) jsou uvedeny v tab. II–IV. Meze stanovitelnosti pro všechny vitaminy E byly vypočteny

jako desetinásobek šumu základní linie a ležely v intervalu od 0,15 do $0,32 \text{ mg kg}^{-1}$. Pro účely této studie bylo rozhodnuto zařazovat do vyhodnocení výsledky od $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ pro všechny vitaminy E.

Porovnání obsahu α -tokoferolu a α -TE

Nalezené obsahy vitaminu E byly přepočteny podle doporučení NRC na α -TE a ty byly porovnány s hodnotami α -tokoferolu získanými podle platných předpisů České republiky¹². Z obsahů vitaminu E v potravinách a krmných surovinách je zřejmé, že v celkové biologické účinnosti vitaminu E hraje významnou úlohu obsah všech tokoferolů a tokotrienolů. K tomu přispívá zejména obsah α -tokotrienolu (pšeničné a žitné otruby, ječmen v krmných surovinách, ječné a žitné vločky v potravinách), jinde naopak obsah γ -tokoferolu (hrách, peluška v krmných surovinách, lněné semínko, pohanka, fazole, čočka a vlašské ořechy v potravinách). Příspěvek ostatních tokoferolů a tokotrienolů k účinnosti α -TE je zanedbatelný. Podle očekávání je pak nejmenší příspěvek tokoferolů a tokotrienolů k účinnosti α -TE u krmných směsí. Je to způsobeno přidávkem α -tokoferolu (ve formě premixu) v takovém nadbytku, že přepočet na α -TE je nevýznamný. Proto je také vyjádření obsahu vitaminu E (jako α -tokoferolu) podle právních předpisů v krmných směsích dostatečné. Výjimku tvoří krmné směsi s převážujícím podílem pšenice (40 %) nebo ječmene (30–45 %). Tyto plodiny mají vysoký obsah α -tokotrienolu a pak se v celkovém obsahu vitaminu E tento příspěvek α -tokotrienolu projeví (krmná směs pro výkrm prasat A1 a krmná směs pro předvýkrm prasat CDP). U ostatních krmných směsí se ječmen nevyskytuje vůbec nebo jen ve velmi nízkém zastoupení.

Porovnání stacionárních fází

Byly porovnány obsahy tokoferolů a tokotrienolů získané na jednotlivých stacionárních fázích (u kritických tokoferolů a tokotrienolů jako jejich suma – $(\gamma+\beta)$ -tokoferol a $(\gamma+\beta)$ -tokotrienol). Při srovnání obsahu α -tokoferolu a α -tokotrienolu jsou výsledky na obou stacionárních fázích srovnatelné, výrazné rozdíly byly nalezeny v obsahu $(\gamma+\beta)$ -tokoferolu a $(\gamma+\beta)$ -tokotrienolu u některých krmných surovin a potravin. Jednalo se o plodiny z čeledi *Fabaceae* (bob, čočka, hrách, peluška) a o produkty z pšenice (celé zrn, mouka, vločky, klíčky). S největší pravděpodobností dochází na silikagelu ke koe-luci neznámé interferující látky obsažené právě v těchto komoditách. Tato látka však nebyla identifikována.

Mezilaboratorní porovnávací zkouška

Mezilaboratorní porovnávací zkoušku stanovení vitaminu E (jako α -tokoferolu) organizoval Ústřední kontrolní a zkušební ústav se sídlem v Brně. Jako vzorky byly analyzovány premix doplňkových látek pro nosnice a krmná

Tabulka II
Obsah tokoferolů (T) a tokotrienolů (TT) v krmných surovinách

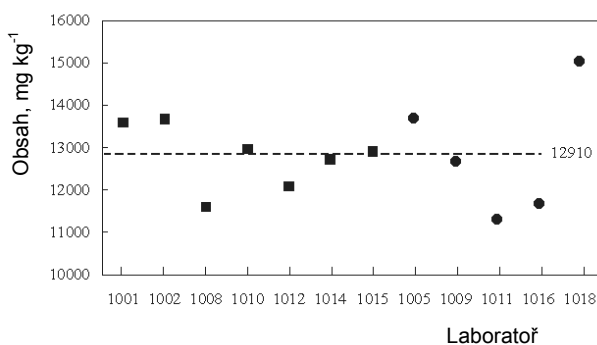
Krmná surovina	Obsah [mg kg ⁻¹]								
	α-T	β-T	γ-T	δ-T	α-TT	β-TT	γ-TT	δ-TT	α-TE
Kukuřice	12,0	0,6	34,1	1,0	11,3	1,5	23,3	0,8	19,2
Pšeničné klíčky mačkané	186,5	61,6	1,2	< 0,3	5,9	27,8	< 0,3	< 0,3	220,5
Žitné otruby	8,3	2,7	< 0,3	< 0,3	60,0	38,8	< 0,3	< 0,3	29,6
Pšeničné otruby	27,7	12,5	0,6	< 0,3	28,4	81,8	< 0,3	< 0,3	71,8
Sladový květ	16,1	1,0	5,2	< 0,3	10,3	3,2	4,9	< 0,3	20,3
Slunečnicový šrot	10,8	0,7	0,4	< 0,3	0,8	1,7	< 0,3	< 0,3	11,6
Pšenice	10,0	4,4	0,2	< 0,3	6,0	27,6	< 0,3	< 0,3	15,4
Ječmen	8,2	0,3	2,3	< 0,3	42,1	5,5	12,5	< 0,3	21,5
Žito	11,5	2,5	0,4	< 0,3	19,4	13,5	4,0	< 0,3	19,2
Řepkový šrot	16,1	0,6	7,9	< 0,3	< 0,3	13,7	< 0,3	< 0,3	17,8
Řepkové výlisky	60,1	0,6	41,7	< 0,3	< 0,3	28,3	< 0,3	< 0,3	66,0
Sojový extrahovaný šrot	3,2	0,2	8,0	2,3	< 0,3	0,7	< 0,3	< 0,3	4,2
Vojtěšková moučka	50,0	0,8	1,8	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	50,6
Ovesné vločky	9,8	0,9	0,4	< 0,3	33,1	3,4	< 0,3	< 0,3	20,3
Hrách	1,0	< 0,3	56,3	1,1	< 0,3	1,6	2,1	< 0,3	6,7
Bob koňský	11,7	< 0,3	40,1	1,0	< 0,3	1,9	3,0	< 0,3	15,8
Peluška	1,1	< 0,3	55,8	1,2	< 0,3	2,7	2,0	< 0,3	6,9

Tabulka III
Obsah tokoferolů (T) a tokotrienolů (TT) v krmných směsích (KS)

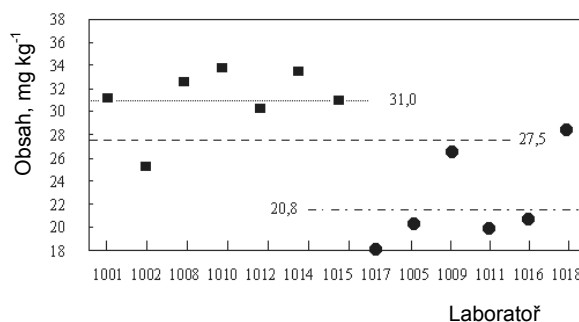
Krmná směs	Obsah [mg kg ⁻¹]								
	α-T	β-T	γ-T	δ-T	α-TT	β-TT	γ-TT	δ-TT	α-TE
Pro výkrm prasat A1	10,7	2,4	3,8	< 0,3	14,3	19,7	4,2	< 0,3	17,6
Pro kojící prasnice	47,6	1,9	4,2	0,8	9,6	10,1	4,2	< 0,3	52,3
Pro předvýkrm prasat CDP	22,6	1,9	3,9	0,5	17,4	11,8	6,1	< 0,3	29,8
Doplňková pro koně	86,8	1,6	5,9	0,9	12,8	13,0	5,6	0,8	92,7
Mléčná TELASAN	64,2	0,5	0,8	< 0,3	14,7	2,4	33,8	1,9	69,0
Mléčná MILSAN	92,4	0,6	6,1	< 0,3	22,1	8,0	33,9	1,8	100,4
KS BR1	49,5	2,2	9,6	1,7	6,4	12,8	3,5	< 0,3	54,1
KS BR2	53,6	1,6	9,2	0,6	13,2	10,3	4,7	< 0,3	57,9
Pro březí prasnice	54,1	2,7	8,2	0,6	17,8	13,3	7,1	< 0,3	62,3
Doplňková pro výkrm býků	47,2	2,0	18,9	0,8	15,7	18,6	4,5	< 0,3	55,7

směs pro kojící prasnice. Do statistického zpracování byly použity vždy průměry ze dvou stanovení. Mezilaboratorní porovnávací zkoušky se zúčastnilo 14 laboratoří a součástí vyhodnocení bylo i sledování analytické techniky (stacionární fáze a způsob detekce). V reverzním systému byla použita mobilní fáze C (cit.¹¹), v normálním systému mobilní fáze B (cit.¹¹). Protože jedna laboratoř použítý chromatografický systém neuvedla, nebyla do následující-

ho hodnocení zařazena. Výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky jsou zobrazeny na obr. 3 a 4. U obsahů vitamínu E v premixu nebyly pozorovány žádné trendy a výsledky jsou rovnoměrně rozloženy kolem mediánu pro obě stacionární fáze (obr. 3). Naopak výrazné trendy byly pozorovány u obsahů vitamínu E pro krmnou směs. Výsledky získané na normální fázi se pohybují okolo mediánu 31,0 mg kg⁻¹, výsledky získané na reverzní fázi okolo



Obr. 3. Mezilaboratorní porovnávací zkouška stanovení obsahu vitamínu E v premixu doplňkových látek pro nosnice; ■ normální mód, ● reverzní mód, --- medián souboru



Obr. 4. Mezilaboratorní porovnávací zkouška stanovení obsahu vitamínu E v krmné směsi pro kojící prasnice; ■ normální mód, ● reverzní mód, --- medián souboru, medián hodnot získaných v normálním módu, -.-.- medián hodnot získaných v reverzním módu

Tabulka IV
Obsah tokoferolů (T) a tokotrienolů (TT) v potravinách

Potravina	Obsah [mg kg^{-1}]								
	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -TT	β -TT	γ -TT	δ -TT	α -TE
Pšeničná mouka	2,8	2,4	< 0,3	< 0,3	2,7	14,0	< 0,3	< 0,3	5,5
Rýže obyčejná	2,5	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	6,8	< 0,3	2,5
Rýže hnědá	8,7	2,1	2,6	< 0,3	8,8	< 0,3	28,1	3,4	12,7
Rýže parboild	2,1	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,5	< 0,3	7,5	< 0,3	2,9
Fazole bílé	0,9	< 0,3	38,3	1,9	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	4,7
Čočka	9,0	< 0,3	41,4	1,0	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	13,2
Soja	14,7	1,7	90,1	15,2	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	24,7
Olej olivový	134	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	134
Olej řepkový	202	< 0,3	81,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	210
Olej sojový	144	15,2	196	18,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	171
Olej slunečnice	477	12,6	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	483
Jáhly proso	2,0	< 0,3	8,2	3,6	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,9
Pohanka	3,9	< 0,3	49,1	2,1	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	8,8
Vločky pšeničné	5,2	3,2	< 0,3	< 0,3	5,3	19,2	< 0,3	< 0,3	9,3
Vločky žitné	3,2	1,1	< 0,3	< 0,3	13,1	9,9	< 0,3	< 0,3	8,1
Vločky ječné	2,3	< 0,3	0,9	0,7	22,9	4,0	9,5	1,2	9,4
Sušené mléko plnotučné	4,1	< 0,3	0,6	< 0,3	0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	4,3
Sušené mléko odtučněné	0,8	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,8
Ořechy vlašské	8,3	< 0,3	58,2	3,1	< 0,3	< 0,3	1,0	< 0,3	14,2
Ořechy lískové	129	2,7	25,6	1,0	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	132,9
Mák	9,8	< 0,3	31,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	1,4	< 0,3	13,0
Lněné semínko	2,0	< 0,3	87,3	0,8	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	10,7

mediánu $20,8 \text{ mg kg}^{-1}$, přičemž medián všech výsledků je $27,5 \text{ mg kg}^{-1}$ a žádný z výsledků nebyl označen jako odlehlý (obr. 4). Ke zjištění příčiny rozdílu výsledků krmné směsi na normální a reverzní fázi byla tato směs opětovně analyzována. Hexanový extrakt směsi byl změřen jednak

na normální fázi s mobilní fází A a mobilní fází B a dále na reverzní fázi s mobilní fází C. Získané hodnoty jsou uvedeny v tab. V. Z porovnání vyplývá, že eluční schopnost mobilní fáze B je natolik velká, že se na silikagelu eluují spolu α -tokoferol a α -tokotrienol, což způsobuje

Tabulka V

Obsahy α -tokoferolu a α -tokotrienolu v krmné směsi pro kojící prasnice získané v různých chromatografických systémech

Stacionární fáze/mobilní fáze	Obsah [mg kg ⁻¹]	
	α -tokoferol	α -tokotrienol
Silikagel/cyklohexan-tetrahydrofuran (99,6:0,4)	16,5	14,6
Silikagel/cyklohexan-ethanol (98,5:1,5)	29,8	–
C18/methanol-voda (98:2)	18,1	14,7

vyšší výsledky u krmné směsi na normální fázi v mezilaboratorní porovnávací zkoušce. U testovaného premixu tato situace nenastala, neboť analyzovaný vitamin E je zastoupen pouze α -tokoferolem.

Závěr

Z nalezených obsahů vitaminu E v surovinách vyplývá, že obsah všech tokoferolů a tokotrienolů hraje významnou roli v celkové biologické účinnosti vitaminu E (vyjádřená jako ekvivalent α -tokoferolu) v potravinách i krmných surovinách pro výrobu krmných směsí. Podle druhu suroviny pak na účinnost má největší vliv vysoký obsah α -tokotrienolu resp. γ -tokoferolu. Příspěvek ostatních tokoferolů a tokotrienolů k ekvivalentu α -tokoferolu je většinou zanedbatelný. U finálních krmiv je naopak příspěvek těchto tokoferolů a tokotrienolů zanedbatelný a největší roli hraje vysoký obsah přidaného α -tokoferolu. Při analýze vitaminu E na normální fázi je třeba použít mobilní fázi takové eluční schopnosti, aby nedocházelo ke koeluci α -tokoferolu s α -tokotrienolem, pokud je ve vzorku přítomen.

LITERATURA

1. Velišek J.: *Chemie potravin 2*, str. 51. OSSl, Tábor 1999.
2. Kijima S.: *Vitamin E*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1993.
3. Cavins J. F., Inglett G. E.: *Cereal Chem.* 51, 605 (1974).
4. Taylor P., Barnes P.: *Chem. Ind.* 20, 722 (1981).
5. Thompson J. N., Hatina G.: *J. Liquid Chromatogr.* 2, 237 (1979).
6. McMurray C. H., Blanchflower W. J.: *J. Chromatogr.* 176, 488 (1979).
7. Cohen H., Lapointe M. R.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 1254 (1980).
8. Analytical Methods Committee of the Royal Society of Chemistry: *Analyst* 116, 421 (1991).
9. VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten), *Methodenbuch Band III*, kapi-tola 13.5.4., 2. doplněk. Darmstadt Books, Darmstadt 1988.
10. ČSN 12822: *Potraviný – Stanovení vitaminu E metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – Stanovení α -, β -, γ - a δ -tokoferolů*. ČNI, Praha 2002.
11. Vyhláška č. 124/2001 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků podléhajících zkáze, ve znění vyhlášky č. 497/2004 Sb.
12. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech ve znění pozdějších předpisů.
13. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích ve znění pozdějších předpisů.

R. Hosmanová^a and M. Douša^b (^aCentral Institute for Supervising and Testing in Agriculture Brno, National Reference Laboratory, Plzeň, ^bZentiva, Co., Prague): **HPLC Determination of Vitamin E in Feed Materials, Compounded Feeds and Foods**

Vitamin E is a collective term for fat-soluble chroman-6-ol derivatives that exhibit biological activity of α -tocopherol. At present, eight such derivatives are included in the vitamin E family: α -, β -, γ - and δ -tocopherol and α -, β -, γ - and δ -tocotrienol. The vitamin E content in food and feeds is expressed as that of α -tocopherol. The aim of this paper was to monitor the content of tocopherols and tocotrienols in food and feed materials and their mixtures. The contents were recalculated as α -tocopherol equivalents (α -TE). The α -tocopherol contents and α -TEs were compared. The content of the other tocopherols and tocotrienols in food and compounded feeds does not significantly contribute to the α -TEs.