

VYUŽITÍ MODERNÍ SEPARAČNÍ TECHNIKY UPLC KE STANOVENÍ VITAMINU E V ZRNU JEČMENE

KAROLÍNA BENEŠOVÁ^a, HELENA PLUHÁČKOVÁ^b, SYLVIE BĚLÁKOVÁ^a, KATEŘINA VACULOVÁ^c, RENATA MIKULÍKOVÁ^a, JAROSLAVA EHRENBARGEROVÁ^b a NATÁLIE BŘEZINOVÁ BELCREDI^b

^a Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, ^b Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, ^c Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž
benesova@beerresearch.cz

Došlo 21.3.11, přepracováno 21.9.11, přijato 27.10.11.

Klíčová slova: UPLC, vitamin E, ječmen jarní, tokoferoly, tokotrienoly

Úvod

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) je relativně novou separační technikou v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie¹. Krátké chromatografické kolony (100 mm) se zmenšeným vnitřním průměrem (2,1 mm) jsou plněny sorbenty o malém průměru (1,7 µm) připravenými patentovanou technologií „bridged hybrid particle“², které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností, proto může separační proces probíhat za velmi vysokých tlaků (až 15 000 psi, více než 1000 barů). UPLC přináší řadu předností oproti klasické HPLC: zvýšení separační účinnosti, snížení meze detekce, zvýšení citlivosti, zkrácení doby analýzy a celkové snížení nákladů vzhledem k menší spotřebě rozpouštědel. Jde o techniku vhodnou zejména pro rutinní analýzy v laboratořích zpracovávajících velká množství vzorků. UPLC našla velké uplatnění v řadě aplikací zejména ve farmaceutických oborech³ nebo v analýze antioxidantů⁴ či mykotoxinů^{5,6} v obilovinách a dalších potravinových matricích. V neposlední řadě je UPLC využívána ve spojení s moderními citlivými hmotnostními spektrometry pro analýzu širokého spektra kontaminantů ve stopových koncentracích, např. reziduí pesticidů⁷ nebo léčiv⁸ vyskytujících se v potravinách nebo v životním prostředí⁹.

Vitamin E je jedním z nejdůležitějších přírodních antioxidantů¹⁰. Je velmi dobře rozpustný v tucích. V organismu působí jako ochrana proti poškození nenasycených

lipidů biologických membrán agresivními kyslíkovými radikály a pravděpodobně se podílí přímo na membránové struktuře¹¹. Nejvíce se vyskytuje v membránách buněk vystavených působení kyslíku, v dýchacím systému, v membránách červených krvinek a v plasmě. Působí preventivně proti vzniku kardiovaskulárních chorob a rakoviny. Nachází se především v potravinách rostlinného původu, např. v oleji z pšeničných klíčků, burských oříškách, sóji, salátu, obilovinách a rostlinných olejích, dále potom v másle, mléce a v menší míře i v živočišných tucích. Vitamin E se vyskytuje ve formě osmi isomerů, čtyř tokoferolů a čtyř tokotrienolů. Jsou to deriváty 6-hydroxychromanu s nasyceným (α -, β -, γ -, δ -tokoferol) nebo nenasyceným (α -, β -, γ -, δ -tokotrienol) isoprenoidním postranním řetězcem. Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší polohou a počtem methylových skupin v chromanovém kruhu. Všechny isomery vitaminu E vykazují biologickou aktivitu. Ječmen je jediná z běžných obilovin, v jejíž obilce je obsaženo všech osm isomerů vitaminu E (cit.¹²). Obilku ječmene chrání také během skladování a klíčení, což je důležité pro výrobu sladu.

Stanovení vitaminu E v potravinových matricích včetně obilovin zahrnuje přípravu a zmýdelnění vzorku, extrakci nezmýdelnitelného podílu nepolárním rozpouštědlem a vlastní stanovení kapalinovou chromatografií na normální nebo na reverzní fázi¹³. Při analýze na normální fázi se rozdělí všech 8 tokoferolů a tokotrienolů v isokratickém módu¹⁴. V případě analýzy na reverzní fázi dochází ke koeluci γ - a β - tokoferolu a γ - a β -tokotrienolu. Rozpouštědla používaná k chromatografii na normální fázi (hexan, cyklohexan, ethylacetát, tetrahydrofuran) jsou však velmi citlivá na vlhkost, toxická, silně se odpařují a nízký tlak v systému může způsobovat problémy s reprodukovatelností výsledků, proto v naší laboratoři pro dlouhodobá sledování používáme stanovení vitaminu E metodou HPLC na reverzní fázi^{15,16}. V posledních letech jsme z důvodu časové a ekonomické úspory zavedli chromatografickou techniku UPLC.

Experimentální část

Vzorky

K analýze byly vybrány vzorky zrna osmi odrůd ječmene, vypěstované v pokusné stanici školního zemědělského podniku v Žabčicích Mendelu v Brně. Šlo o dvě pluchaté sladovnické odrůdy (Annabel a Xanadu) a šest bezpluchých (Abyssinian, Nudimelanocriton, Wanubet, AF Lucius a linie KM 1057 a KM 2283). Vzorky pocházely z pokusů sklizených v letech 2009 a 2010.

Standards, chemikálie a příprava roztoků

Ke stanovení byly použity jednotlivé standardy α -, β -, γ -, δ -tokoferolu a α -, β -, γ -, δ -tokotrienolu a methanol pro HPLC, (Sigma-Aldrich, Německo), dále nedenaturovaný

ethanol čistoty 99,8%, dusík čistoty 5,5 ECD, bezvodý síran sodný, stabilizovaný diethylether, kyselina askorbová p. a. a hydroxid draselný p. a. (Lach-Ner, Česká republika). Standardy α -, β -, γ -, δ -tokoferolu byly rozpuštěny v methanolu o přibližné koncentraci $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ a jejich přesná koncentrace byla stanovena spektrofotometricky dle ČSN EN 12822 (cit.¹⁷). Standardy α -, β -, γ -, δ -tokotrienolů byly rozpuštěny v methanolu o přesných koncentracích 1,25–4,0 mg ml^{-1} . Z uvedených roztoků byl připraven zásobní roztok směsného standardu, ze kterého byla postupným ředěním připravena 5bodová kalibrační křivka. Koncentrace jednotlivých isomerů byly voleny tak, aby jejich odezvy odpovídaly předpokládané koncentraci ve vzorcích. 50% roztok hydroxidu draselného byl připraven rozpuštěním 100 g tuhého KOH ve 100 ml deionizované vody.

Příprava vzorků

Vzorek zrna ječmene byl zhomogenizován na sladovém mlýnku. Byly odváženy 2 g vzorku, dále bylo přidáno 100 mg kyseliny askorbové a 50 ml ethanolu. Poté byl vzorek třepán na třepače 1 min a 10 min stál ve tmě. Po 10 min bylo přidáno 10 ml 50% vodného roztoku KOH. Nakonec byl vzorek vyfoukán dusíkem z tlakové láhve, zazátkován a ponechán v inertní atmosféře při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 24 hodin.

Zmýdelněné vzorky byly poté extrahovány $2 \times 50 \text{ ml}$ diethyletheru. Spojené etherové extrakty byly promyty deionizovanou vodou, po oddělení vodné fáze byly vysušeny přefiltrováním přes vrstvu bezvodého síranu sodného a zbytek rozpouštědla byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparky byly rozpuštěny ve 4 ml methanolu a po

přefiltrování byly přímo analyzovány. Každý vzorek byl připravován ve dvou opakováních.

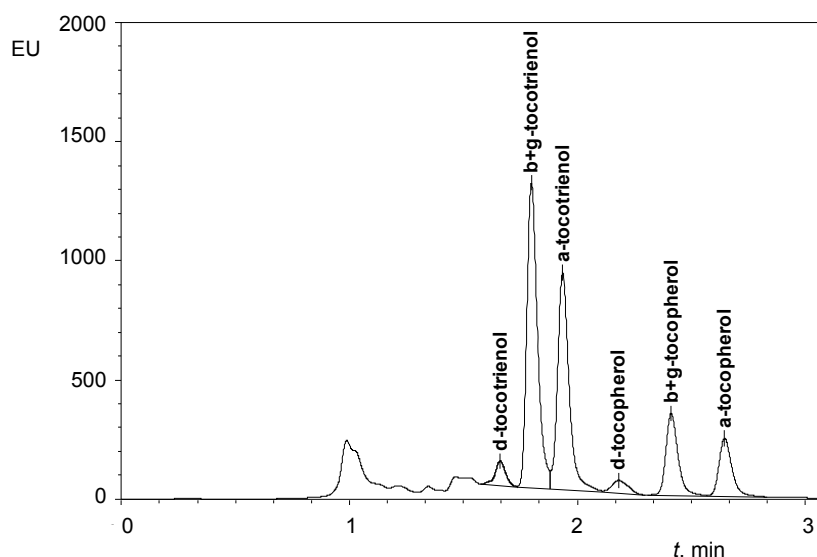
Přístroje a chromatografická analýza

K mletí a homogenizaci vzorků byl použit sladový mlýnek Super Jolly SJ 500, Mezos, ČR. Odpaření diethyletheru ze vzorků bylo provedeno vakuovou odparkou Stuart RE 300. Standardy i vzorky byly analyzovány na chromatografickém systému Acquity UPLC (Waters, USA). Systém je vybaven binárním vysokotlakým gradientovým čerpadlem s degasserem, autosamplerem s nástřikovým blokem Rheodyne, termostatem kolon a programovatelným fluorescenčním detektorem. Je ovládán počítačem se softwarem Empower. K chromatografické analýze byla použita kolona ACQUITY BEH C18 (Waters) o rozměrech $2,1 \times 100 \text{ mm}$ a velikosti částic $1,7 \mu\text{m}$, chráněná předkolonou C18. Mobilní fáze byla směs methanol:voda v poměru 98:2, isokratická eluce. Průtok mobilní fáze byl $0,250 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony byla 40°C , nástřik vzorku $2 \mu\text{l}$. Analýza trvala celkem 3 min. Byla použita fluorescenční detekce následujícími vlnovými délkami: $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$.

Výsledky a diskuse

Chromatografické stanovení

Chromatografická metoda byla převedena z HPLC na UPLC (cit.¹). Po zohlednění velikosti kolony byl upraven průtok mobilní fáze, objem nástřiku vzorku a doba analýzy. Oproti dříve používané HPLC metodě^{15,16} byla do mobilní fáze přidána 2 % H_2O , protože takto systém lépe dr-



Obr. 1. UPLC chromatogram vzorku ječmene jarního

Tabulka I
Porovnání vybraných parametrů UPLC a HPLC metody

Parametr	HPLC	UPLC
Kolona	Nucelosil C18, 250×4 mm, 5 μm (Watrex)	ACQUITY BEH C18 2,1×100 mm, 1,7 μm (Waters)
Průtok mobilní fáze	1,0 ml min ⁻¹	0,250 ml min ⁻¹
Teplota kolony	30 °C	40 °C
Objem nástriku	20 μl	2 μl
Mez detekce (LOD)	0,04–0,29 mg kg ⁻¹	0,02–0,06 mg kg ⁻¹
Mez stanovi- telnosti (LOQ)	0,15–0,90 mg kg ⁻¹	0,07–0,20 mg kg ⁻¹

žel tlak, než se 100 % methanolu. Nedošlo ke změně v pořadí eluce jednotlivých isomerů, stejně jako v HPLC se separovaly v pořadí δ-tokotrienol, γ- + β-tokotrienol, α-tokotrienol, δ-tokoferol, γ- + β-tokoferol a α-tokoferol (obr. 1).

V případě analýzy na reverzní fázi nelze rozdělit isomery γ- a β-tokoferol a γ- a β-tokotrienol, proto byl stanoven pouze celkový součet těchto isomerů. Aktivita vitamínu E byla potom vyjádřena v mg α-tokoferol-ekvivalentu dle McLaughlina a Weihrauch¹⁸, což představuje součet jednotlivých isomerů se zohledněním jejich biologické aktivity. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) a další parametry metody jsou shrnuty v tab. I. Můžeme říci, že analýza metodou UPLC má nižší meze detekce i meze stanovitelnosti a je více než třikrát rychlejší a spotřeba použité mobilní fáze více než 12,5krát nižší než u původní metody HPLC.

Kalibrační křivka každého isomeru byla vynesena jako závislost plochy píku na koncentraci standardu. Identifikace isomerů vitamínu E ve vzorcích byla provedena porovnáním jejich retenčních časů s certifikovanými standardy, jejich kvantifikace byla provedena metodou externích standardů s využitím kalibračních křivek. V případě tokotrienolů byly ještě výsledky přepočteny na čistotu standardů, která se pohybovala od 65 do 80 %. Výsledky jsou uváděny v mg kg⁻¹ sušiny¹⁹.

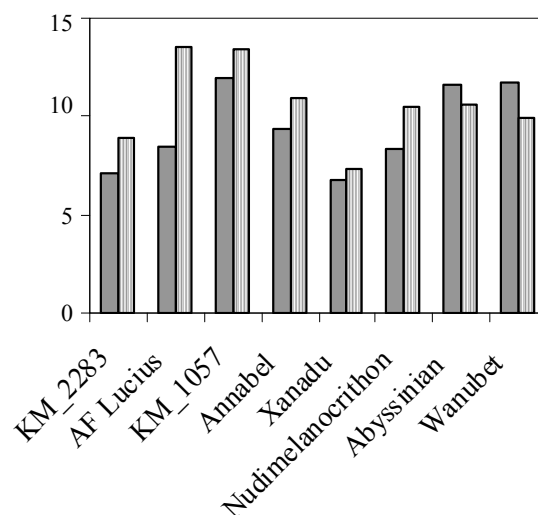
Metoda pro stanovení vitamínu E byla validována²⁰. Pro validaci byl použit vzorek kontrolního sladu z roku 2009. Kontrolní slad je charakteristický pro každou sezónu, je vybírán s ohledem na průměrné hodnoty sladovnických parametrů a slouží během analýz jako kontrolní vzorek. Validované parametry byly vyhodnoceny softwarovým programem Effi Validation 3.0. Pro jednotlivé isomery vitamínu E a pro jeho celkovou aktivitu byly vypočteny rozšířené nejistoty. Uvedené nejistoty měření jsou součinem standardních nejistot měření a koeficientu rozšíření k=2, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí 95 %. Nejistoty jsou vyjádřeny v relativních

procentech vůči naměřené hodnotě. Hodnoty byly vypočteny z 10 extrakcí a 20 analýz vzorku kontrolního sladu a byly následující: pro δ-tokotrienol 30,17 %, pro γ- + β-tokotrienol 28,23 %, pro α-tokotrienol 28,78 %, pro δ-tokoferol 60,08 %, pro γ- + β-tokoferol 22,62 %, pro α-tokoferol 20,28 % a pro celkovou aktivitu vitamínu E 23,74 %. Vysoká hodnota rozšířené nejistoty pro δ-tokoferol je pravděpodobně způsobena jeho malou koncentrací ve vzorcích a nízkou odezvou.

Stanovení tokolů v ječmeni

Metoda byla aplikována na vybrané vzorky zrna ječmene jarního. Celková aktivita vitamínu E se pohybovala v rozmezí 6,78–11,94 mg kg⁻¹ v roce 2009 a 7,29–13,58 mg kg⁻¹ v roce 2010. V roce 2010 byl obsah vitamínu E celkově vyšší u všech odrůd s výjimkou odrůd Abyssinian a Wanubet, kde byl nalezen nepatrně vyšší obsah v roce 2009 (obr. 2).

U jednotlivých odrůd ječmene byla určena procenta jednotlivých isomerů z celkového obsahu tokolů. V zrnech ječmene byly nejméně zastoupeny δ-tokotrienol (1,01 až 3,13 %) a δ-tokoferol (1,52–6,58 %), následují γ- a β-tokoferol (3,42–15,70 %) a γ- a β-tokotrienol (6,92–28,29 %), α-tokoferol (12,63–25,83 %) a nejvíce byl zastoupen α-tokotrienol (35,91–59,03 %). Nejvyšší obsah α-tokotrienolu měly pluchaté odrůdy Annabel a Xanadu a bezpluchá odrůda Wanubet v roce 2009, nejvyšší obsah α-tokoferolu, isomeru s nejvyšší biologickou aktivitou, měly linie KM 1057 a odrůdy Annabel a AF Lucius v roce 2010. U odrůdy AF Lucius byl nalezen nejvyšší rozdíl v obsahu α-tokoferolu mezi ročníky (4,10 mg kg⁻¹ v roce 2009 a 7,43 mg kg⁻¹ v roce 2010). Nejnížší obsah všech



Obr. 2. Celkový obsah vitamínu E v mg kg⁻¹ v zrnech vybraných odrůd ječmene, ■ 2009, ■ 2010

Tabulka II

Obsah isomerů vitaminu E ve vybraných odrůdách ječmene jarního

Rok	Odrůda	δ -tokotrienol	β + γ -tokotrienol	α -tokotrienol	δ -tokoferol	β + γ -tokoferol	α -tokoferol	Celkový obsah tokolů
		[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]
2009	KM 2283	0,50	3,94	13,10	0,97	0,76	2,92	22,19
	AF Lucius	0,41	3,83	13,35	0,48	1,45	4,10	23,62
	Annabel	0,34	4,34	18,12	1,35	2,37	6,01	32,54
	Xanadu	0,80	5,57	16,41	1,13	1,95	3,99	29,85
	Nudimelanocrithon	0,20	1,18	8,69	1,12	2,01	3,83	17,03
	Abyssinian	0,36	3,37	12,94	1,11	2,53	4,01	24,33
	KM 1057	0,95	5,47	13,01	1,64	2,25	7,24	30,57
2010	Wanubet	0,58	5,67	20,53	1,81	2,52	5,05	36,16
	KM 2283	0,68	8,02	13,41	0,43	1,38	4,43	28,35
	AF Lucius	0,69	7,62	17,89	0,93	3,72	7,43	38,27
	Annabel	0,41	8,38	19,33	0,74	4,95	6,60	40,40
	Xanadu	0,77	10,16	16,46	0,69	4,35	5,10	37,54
	Nudimelanocrithon	0,22	1,93	7,79	0,37	2,63	4,51	17,46
	Abyssinian	0,40	5,56	14,01	0,61	4,84	5,39	30,82
	KM 1057	0,92	7,39	10,54	0,59	3,16	6,75	29,35
	Wanubet	0,60	8,53	16,65	0,52	2,88	4,22	33,40

isomerů s výjimkou α -tokoferolu byl nalezen v odrůdě s černým typem zrna Nudimelanocrithon, nejnižší obsah α -tokoferolu byl nalezen v odrůdě KM 2283 v roce 2009. Je zajímavé, že celkově měly odrůdy v roce 2010 v průměru vyšší obsah β - a γ -tokotrienolů a β - a γ -tokoferolů oproti roku 2009. Také celkový obsah tokolů byl vyšší v roce 2010. Výsledky jsou shrnuty v tabulce II.

Lze říci, že obsah jednotlivých isomerů a celková aktivita vitaminu E v zrnech ječmene se pohybuje v širokém rozmezí²¹. Velmi závisí nejen na konkrétním genotypu, ale zejména na ročníku pěstování, počasí a povětrnostních podmínkách v dané pěstební lokalitě, což je v souladu se závěry předchozích studií^{15,16,21,22}.

Výsledků bylo dosaženo v rámci projektu NAZV QH 91053.

LITERATURA

1. <http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm>. Staženo 25. 2. 2011.
2. A Review of Waters Hybrid Particle technology“. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001159en.pdf>. Staženo 20. 9. 2011.
3. Nováková L., Matysová L., Solich P.: Talanta 68, 908 (2006).
4. Van Hung P., Hatcher D. W.: Food Chem. 125, 1510 (2011).
5. Běláková S., Benešová K., Mikulíková R., Svoboda Z.: Food Chem. 126, 321 (2011).
6. Zachariasova M., Cajka T., Godula M., Malachova A., Veprikova Z., Hajslova J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 24, 3357 (2010).
7. Kovalczuk T., Jech M., Poustka J., Hajšlová J.: Anal. Chim. Acta 577, 8 (2006).
8. Ortelli D., Congnard E., Jan P., Edder P.: J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 877, 2363 (2009).
9. Petrovic M., Gros M., Barcelo D.: J. Chromatogr., A 1124, 68 (2006).
10. Velíšek J.: Chemie potravin 2, str. 51. OSSIS, Ing. Václav Šedivý, Tábor 1999.
11. Atkinson J., Epan R. F., Epan R. M.: Free Radical Biol. Med. 44, 739 (2008).
12. Cavallero A., Gianinetti A., Finocchiaro F., Delogu G., Stanca A. M.: J. Cereal Sci. 39, 175 (2004).
13. Hosmanová R., Douša M.: Chem. Listy 101, 578 (2007).
14. Shin T. S., Godber J. S.: J. Am. Chem. Soc. 70, 1289 (1993).
15. Ehrenbergerová J., Belcrediová N., Prýma J., Newman C. W.: Plant Foods Hum. Nutr. 61, 145 (2006).

16. Prýma J., Ehrenbergerová J., Belcrediová N., Vaculová K.: *Acta Chim. Slov.* 54, 102 (2007).
17. ČSN EN 12822: Potraviny: Stanovení vitamínu E metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - Stanovení α -, β -, γ - a δ -tokoferolů. ČNI, Praha 2002.
18. McLaughlin P. J., Weihrauch J. L.: *J. Am. Diet. Assoc.* 75, 647 (1979).
19. Metodika zkoušení osiva a sadby č. 34349/04-17220, ministerstvo zemědělství ČR, 2004, str. 248.
20. Barek J., Jánoš P., Koruna I., Meloun M., Plzák Z., Skácel F., Suchánek M., Tichý J., Vilímc J., Vlášil F., Zima T.: *Chem. Listy* 7, 439 (1994).
21. Newman R. K., Newman C. W.: *Barley for Food and Health. Science, Technology and Products*, str. 76. Wiley, New York 2008.
22. Březinová-Belcredi N., Ehrenbergerová J., Benešová K., Vaculová K.: *Kvasny Prum.* 56, 88 (2010).

K. Benešová^a, H. Pluháčková^b, S. Běláková^a, K. Vaculová^c, R. Mikulíková^a, J. Ehrenbergerová^b, and N. Březinová Belcredi^b (^aMalting Institute Brno, ^bMendel University Brno, Czech Republic, ^cAgricultural Research Institute, Kroměříž, Czech Republic): **Utilization of Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – Modern Separation Technique for Determination of Vitamin E in Barley Cereals**

A new UPLC method for the determination of vitamin E in barley cereals is proposed. The method shows higher sensitivity and lower limits of detection and quantification than the previous HPLC methods. The method was applied to various spring barley varieties. Although it was not possible to separate all vitamin E isomers due to the reverse phase used, the rapid and inexpensive method is suitable for a long-term monitoring of vitamin E in barley and other cereals.