

# Analiza sadržaja tokoferola u jestivom ulju pre i posle termičkog tretmana

Zorica Basić<sup>1</sup>  
Slavica Ražić<sup>2\*</sup>

1. Institut za higijenu VMA, Beograd,  
2. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu,  
Katedra za analitičku hemiju, Beograd

**Kratak sadržaj:** Biljna ulja karakteriše visok sadržaj vitamina E. U zavisnosti od načina proizvodnje, obrade i upotrebe ta količina može biti očuvana ili umanjena. Na našem tržištu postoji sve raznovrsnija ponuda jestivih biljnih ulja. Pravilnom upotrebom ove namirnice moguće je u znatnoj meri zadovoljiti dnevne potrebe za vitaminom E. Cilj ovog rada bio je da primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije (HPLC) odredimo sadržaj tokoferola u jestivom biljnom ulju suncokreta i masline, pre i posle termičkog tretmana. Analizirana su jestiva biljna ulja iz maloprodaje, različitog porekla i načina proizvodnje (ukupno 16), pre i nakon izlaganja temperaturi ključanja u trajanju od 20 minuta. Za tačno i pouzdano određivanje sadržaja vitamina E u namirnicama složenog sastava neophodno je višestruko prečišćavanje uzorka, dok se za određivanje u biljnom ulju preporučuje tečno/tečna ekstrakcija. Primijenjena je ekstrakcija n-heksanom, nakon alkalne hidrolize, uparavanje ekstrakta i rekonstituisanje u metanolu uz membransku filtraciju. Razdvajanje je urađeno RP-HPLC metodom uz fluorescentni detektor sa promenljivim talasnim dužinama. Za detekciju tokoferola primenjen je 95%-ni metanol kao mobilna faza, sa protokom od 1,0 mL/min i talasnim dužinama: 295 nm za ekscitaciju i 330 nm za emisiju. Selektivnost i osetljivost fluorescentnog detektora omogućila je detekciju  $\alpha$ ,  $\beta+\gamma$  i  $\delta$  tokoferola u analiziranim uzorcima ulja. Određen sadržaj tokoferola u uljima pre tretmana je odgovarao zahtevu regulative, uz značajne međusobne razlike u zavisnosti od porekla i deklarisanog načina proizvodnje. Termički tretman uzoraka značajno je uticao na smanjenje početnog sadržaja vitamina E.

**Ključne reči:** biljno ulje, tokoferoli, HPLC.

## UVOD

Vitamin E je zajedničko ime za osam različitih jedinjenja sličnih hemijskih struktura: alfa, beta, gama i delta-tokoferol i alfa, beta, gama i delta-tokotrienol. Vitamin E ima izuzetno značajnu ulogu u ishrani. Evans i Bishop su još davne 1923. godine otkrili njegovu ulogu kao antisterilitetnog faktora, na osnovu studija na modelu pacova, što kasnijim ispitivanjima nije potvrđeno kod čoveka. Za čoveka je najznačajnije svakako antioksidantno dejstvo vitamina E, pri čemu bi njegova ukupna aktivnost trebalo da se izrazi kao ekvivalent  $\alpha$ -tokoferola ( $\alpha$ -TE). U daljim istraživanjima, koja su obuhvatala antioksidantne vitamine (vitamine E i C), oni su opisani kao "redoks modulatori", zato što oba vitamina mogu delovati kao prooksidansi i kao antioksidansi. Imajući to u vidu, jasna je uloga, posebno vitamina E, kao zaštitnog *nutrimenta* kod mnogih degenerativnih oboljenja. Antioksidantno dejstvo se manifestuje uklanjanjem reaktivnih slobodnih radikala koji mogu da nastanu metaboličkim procesima u organizmu ili da se unesu iz spoljne sredine [1]. Pored toga, važno je i kontroverzno pitanje kolike su koncentracije vitamina E potrebne kako ne bi došlo do deficita, s jedne, odnosno suficita, s druge strane. Potrebne količine za osobe različite starosne dobi i načina života neprekidno se koriguju, kao i procena da li se dovoljno unose hranom ili je potrebno da se dodatno unose u doziranim, farmaceutskim oblicima. Svaka-

ko, pre uvođenja suplemenata u ishranu racionalno je proceniti da li je to opravdano [2].

Mnoge razvijene zemlje ustanovile su nutricion standardde za očuvanje zdravlja populacije. Ovi standardi slični su u mnogim zemljama [3]. U manje razvijenim državama primenjuju se standardi koje daje Organizacija za hranu i poljoprivredu – FAO<sup>‡</sup> i Svetska zdravstvena organizacija - WHO<sup>§</sup>[4]. U SAD standardi se baziraju na vrednostima datim u tzv. RDA<sup>\*\*</sup> i DRI<sup>††</sup> tabelama [5, 6]. Veliki broj publikovanih radova o vitaminima rezultat je neiscrpnih pitanja o mehanizmima njihovog dejstva, potrebnim količinama za čoveka različite starosne dobi i načina života, o tome kako se unose, da li su bolji u hrani ili doziranim oblicima [7].

U našoj zemlji vrednost preporučenog dnevnog unosa vitamina E za odrasle osobe (u tokoferol ekvivalentima) iznosi 12 mg [8]. Imajući u vidu raspoloživa saznanja, potrebno je prvenstveno proveravati sadržaj vitamina u namirnicama u osnovnom obliku, ali i nakon pripreme za upotrebu. Pojedine namirnice sadrže dodatke tokoferole ili kao antioksidantne aditive ili u cilju obogaćivanja vitaminske vrednosti proizvoda. U određene vrste maslinovog ulja, na primer, može se dodavati  $\alpha$ -tokoferol kao antioksidans, što je predviđeno zakonskom regulativom [9]. U dijetetskim proizvodima, odnosno namirnicama kojima se dodaje vitamin E, upotrebljavaju se  $\alpha$ -oblik ovog vitamina. Namirnice, pak, sadrže smese različitih hemijskih oblika vitamina E. Studije

\* Autor za korespondenciju: Slavica Ražić, Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Tel/Faks: +381 11 3951208, e-mail: slavica.razic@pharmacy.bg.ac.rs

pokazuju da i  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferol inhibiraju agregaciju trombocita, odlažući formiranje tromba u arterijama, uz smanjenje oksidacije LDL holesterola i smanjenje stvaranja slobodnih radikala. Istraživanja su pokazala da je preparat koji sadrži smesu tokoferola čak efikasniji u zaštiti lipida eritrocita od oksidativnog oštećenja nego sam  $\alpha$ -tokoferol. Stoga je balansirana ishrana bolji izbor nego suplementi [10]. Osim toga, prema literaturnim podacima, visoke doze  $\alpha$ -tokoferola smanjuju resorpciju  $\gamma$ -oblika i umanjuju pozitivne efekte tokotrienola. Sve ovo ukazuje na činjenicu da različiti oblici vitamina E imaju jedinstvenu ulogu u metabolizmu humanog organizma [11].

Biljna ulja su vekovima prisutna u ishrani kao energetska namirnica, koja je prvenstveno podloga za pripremu obroka, ili dodatak svežem ili kuvanom povrću. U poslednje vreme sve više pažnje poklanja se njihovom kvalitetu i sastavu. Na tržištu se deklariraju kao prirodan izvor vitamina E, jer sadrže više od 10 mg/20 g ulja, što odgovara preporučenom dnevnom unosu za većinu populacije. Pravilnik o kvalitetu jestivih biljnih ulja na našem tržištu propisuje zahtev u pogledu sadržaja tokoferola koji moraju da ispunjavaju [12].

Za kvantitativnu analizu tokoferola, kao i za razdvajanje pojedinih tokoferola primenjuju se gasna i tečna hromatografija [13, 14]. U prirodnom materijalu uz vitamin E nalaze se i druge supstancije koje ometaju njegovo određivanje i mogu se ukloniti na više načina. Saponifikacijom se odstranjuju gliceridi, peroksidi i donekle pigmenti, a u neosapunjenom delu se nalaze pored vitamina E i drugi liposolubilni vitamini, steroli i karotenoidi. Za određivanje slobodnih tokoferola u biljnom ulju dovoljno je primeniti tečno/tečnu ekstrakciju uz membransku filtraciju [15]].

Imajući ova saznanja u vidu, definisan je cilj ovog rada da se primenom visokoeftikasne tečne hromatografije (HPLC) odredi sadržaj tokoferola u jestivom biljnom ulju suncokreta i masline, pre i posle termičkog tretmana.

## METOD RADA

Analizirano je jedanaest uzoraka suncokretovog i pet uzoraka maslinovog ulja. Proizvodi su uzorkovani iz maloprodaje metodom slučajnog izbora, a potiču od različitih proizvođača i različitih su datuma proizvodnje, kao i deklariranih tehnoloških postupaka. Određivanje vitamina E obavljeno je pre i nakon izlaganja temperaturi ključanja u trajanju od 20 minuta.

## Rastvori i reagensi

Za analizu su korišćeni analitički standardi  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola (proizvođač Sigma Co, St Louis, MO, USA), od kojih su pripremani rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije (serija rastvora od 0,01 do 0,5  $\mu$ g/ml), kao i rastvori za kalibracionu krivu (1,0, 2,5, 5,0, 10,0 i 20,0  $\mu$ g/ml). Korišćen je metanol (HPLC čistoće, proizvođač Merck, Nemačka), heksan (HPLC čistoće, proizvođač Merck, Nemačka), voda HPLC čistoće (sistemski dobijena demineralizovana voda prečišćena na komercijalnom „Millipore Milli-Q“ sistemu), a ostale hemikalije čistoće za analizu (p.a.).

Operativni uslovi rada HPLC sistema prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Operativni uslovi HPLC sistema

Pumpa:	Waters M600 E, izokratsko eluiranje
Injektor:	Rheodyne 7125, petlja 20 $\mu$ l
Analitička kolona:	RP-HPLC C8, promera 5 $\mu$ m,
Detektor:	RF-535 Shimadzu, Fluorescence HPLC
Mobilna faza:	95% CH <sub>3</sub> OH
Protok	1,0 ml/min
Temperatura kolone	~20 °C
Talasne dužine:	$\lambda_{ex}$ = 295 $\mu$ m, $\lambda_{em}$ = 330 $\mu$ m
Aktivacija/obrada podataka:	Clarity chromatography station for Windows

## Priprema uzoraka za analizu tokoferola

Za razdvajanje i određivanje tokoferola primenjena je reverzno-fazna tečna hromatografija (RP-HPLC), a za njihovo prečišćavanje i izolovanje alkalna hidroliza i tečno-tečna ekstrakcija. Tačno 0,5 ml uzorka ulja odmereno je u balonu od 100 ml sa šlifom, dodato je 20 ml 96% etanola, 0,12 g pirogalola i 3 ml vodenog rastvora KOH (1+2). Ovako pripremljena proba grejana je 30 minuta na 60 °C uz povratno hlađenje i mešanje. Kada je saponifikacija završena, sadržaj balona je ohlađen i prenesen u odmerni sud od 50 ml. Uz ispiranje balona, sud je dopunjen do oznake 96%-nim etanolom. Pet ml ovog rastvora preneseno je u epruvetu sa brušenim čepom, dodato 5 ml ledene dejonizovane vode, 5 ml heksana i smesa mučkana tri minuta na vortex-u. Odvojeno je 4 ml heksanskog rastvora i upareno do suva u struji azota. Svi ostatak je potom rastvoren u 4 ml metanola i nakon filtriranja kroz membranski špic-filtar dobijeni rastvor injiciran u HPLC sistem.

## Validacija metode

Ukupno vreme hromatografske analize je iznosilo 15 minuta. Obrada signala je rađena „Clarify“ softverom, a na osnovu uporedne analize pikova standarda i uzoraka izračunat je sadržaj tokoferola.

Određeni su limit detekcije i limit kvantifikacije, specifičnost metode zbog moguće interferencije, linearnost odnosa površine pika i koncentracije za standardne rastvore tokoferola u rasponu 1,0 - 20  $\mu$ g/ml, ispitana je preciznost za koncentraciju od 5,0  $\mu$ g/ml, kao i analitički prinos metoda. Nakon validacije metode određivanje sadržaja tokoferola urađeno je metodom standardne krive.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Određen je limit kvantifikacije metode koji iznosi 0,1  $\mu$ g/ml za  $\alpha$ -tokoferol, a za ostale tokoferole 0,05  $\mu$ g/ml. Utvrđena je linearnost odnosa koncentracija standardnih rastvora od 2 do 20  $\mu$ g/ml i površina odgovarajućih pikova. Kalibracione krive su dobijene kao rezultat četiri injiciranja za svaki koncentracioni nivo i određeni su koeficijent korelacije:  $r = 0,9995$  za  $\alpha$ -tokoferol,  $r = 0,9992$  za  $\beta$ + $\gamma$ -tokoferol, odnosno  $r = 0,9991$  za  $\delta$ -tokoferol. Tačnost metode je ispitana određivanjem procenta prinosa na standardne rastvore koncentracije 10  $\mu$ g/ml (RSD = 98,2% za  $\alpha$ -tokoferol, 97,5% za  $\beta$ + $\gamma$ -tokoferol, odnosno 98,1% za  $\delta$ -tokoferol). Postupkom pripreme uzorak je preveden u stanje pogodno za određivanje tokoferola u

biljnom ulju uz specifičnu fluorescentnu detekciju.

Urađena je analiza sadržaja tokoferola u jedanaest rafiniranih i nerafiniranih suncokretovih ulja, kao i u pet maslinovih ulja. Sadržaj tokoferola u suncokretovom ulju varirao je u zavisnosti od proizvođača, naznačenog načina proizvodnje, odnosno krajnjeg roka upotrebe i bio je uočljivo viši od sadržaja u uzorcima maslinovog ulja. U uzorcima je značajno najviše bio prisutan  $\alpha$ -tokoferol, zatim smesa  $\beta$  i  $\gamma$ -tokoferola, a najmanje  $\delta$ -tokoferola. Osim jednog, ispitani uzorci su ispunjavali uslov iz pravilnika o kvalitetu jestivih biljnih ulja o sadržaju tokoferola. Rezultati određivanja su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj tokoferola u jestivom biljnom ulju pre i nakon termičkog tretmana

Uzorak	termički tretman	Sadržaj tokoferola (mg/kg)			
		$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ + $\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol	Ukupan
1. rafinirano suncokretovo	pre	248,2	14,8	2,6	265,6
	nakon	199,3	12,9	1,8	214,0
2. rafinirano suncokretovo	pre	662,7	63,2	5,4	731,3
	nakon	392,4	38,1	2,9	433,4
3. rafinirano suncokretovo	pre	642,2	59,4	5,3	706,9
	nakon	378,7	38,8	2,7	420,2
4. rafinirano suncokretovo	pre	722,5	65,4	4,1	792,0
	nakon	356,7	40,4	3,1	400,2
5. rafinirano suncokretovo	pre	677,9	57,9	5,5	741,3
	nakon	365,2	38,0	2,8	406,0
6. rafinirano suncokretovo	pre	577,1	48,5	3,7	629,3
	nakon	342,2	33,7	2,6	378,5
7. rafinirano suncokretovo	pre	493,4	54,4	4,9	552,7
	nakon	312,1	33,5	2,1	347,7
8. rafinirano suncokretovo	pre	433,7	21,7	3,6	460,0
	nakon	278,9	13,1	2,2	294,2
9. fizički rafinirano suncokretovo	pre	743,6	59,9	6,2	809,7
	nakon	387,5	27,1	2,9	417,5
10. fizički rafinirano suncokretovo	pre	754,3	63,9	6,3	804,5
	nakon	377,3	28,1	3,2	408,6
11. nerafinirano suncokretovo	pre	843,6	69,9	7,2	920,7
	nakon	407,5	28,1	3,2	438,8
12. nedeklarirano maslinovo	pre	248,2	16,1	1,1	265,4
	nakon	205,8	15,8	1,1	222,7
13. nedeklarirano maslinovo	pre	431,0	20,5	2,6	454,1
	nakon	276,6	10,2	1,2	287,0
14. nedeklarirano maslinovo	pre	318,4	18,4	1,2	338,0
	nakon	233,2	14,6	1	248,8
15. devičansko maslinovo	pre	181,6	11,2	1,9	194,7
	nakon	122,8	10,5	1,7	135,0
16. rafinirano maslinovo	pre	341,4	11,3	1,9	354,6
	nakon				

Primenjen termički tretman smanjio je sadržaj tokoferola u proseku za 41,7% u suncokretovom, tj. za 27,8% u maslinovom ulju. Pored toga što je sadržaj značajno smanjen, ove namirnice su i dalje dobar izvor vitamina E.

## ZAKLJUČAK

Biljna ulja su sve više zastupljena u ishrani. Analiza sadržaja tokoferola u uzorcima suncokretovog i maslinovog ulja sa lokalnog tržišta potvrđuje da su ove namirnice dobar izvor vitamina E čak i nakon kratkotrajnog termičkog tretmana.

## BIBLIOGRAFIJA

1. Ball GFM, Vitamins Their Role in the Human Body. Consultant, London, UK, Blackwell Science, 2004; 235-52.
2. Sobajić S. Dodaci hrani – potreba ili moda. Hrana i ishrana 2007; 48(1-4): 36-41.
3. Orientation paper on the setting of maximum and minimum amounts for vitamins and minerals in foodstuffs, European Commission, Health and Consumer protection directorate-general, July 2007.
4. A model for Establishing Upper Levels of Intake for Nutrients and Related Substances, Report of a Joint FAO/WHO Technical Workshop on Nutrient Risk Assessment WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 2-6 May 2005, 2006.
5. Recommended Dietary Allowances, 10<sup>th</sup> Edition, Food and Nutrition Board, National Research Council, Washington, D.C., 1989.
6. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. National Academy Press, Washington, D. C. 2000.
7. Ekhard-E-Z, Filer L-J, Present Knowledge in Nutrition, Seventh Edition. ILSI Press Washington, DC, 1996.
8. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda Sl. glasnik RS, br. 45, 2010.
9. Pravilnik o kvalitetu za maslinovo ulje, Sl. list SCG, br. 5, 1999.
10. Sen CK, Khanna S, Roy S, Tocotrienols in health and disease: the other half of the nature vitamin E family, Mol Aspects Med. 2007; 28(5-6): 692-728.
11. Ball GFM, Vitamins in foods, Analysis, Bioavailability and Stability, Taylor & Francis USA, 2006; 423-6.
12. Pravilnik o kvalitetu jestivih biljnih ulja, Sl. list SCG, br. 20, 2000.
13. Delgado-Zamerreno MM, Bustamante-Rangel M, Sanchez-Perez A, Hernandez-Mendez J, Analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts with and without coupled hydrolysis by liquid chromatography and coulometric detection, J Chromatography A 2001; 23: 935(1-2):77-86.
14. Sanchez-Perez A, Delgado-Zamerreno MM, Bustamante-Rangel M, Mendez J, Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection. J Chromatography A 2000; 9: 881(1-2):229-41.
15. Blake CJ, Committee on Food Nutrition / Fat/ Soluble Vitamins, Journal of AOAC International 2007; 90(1): 18B-21B.

BIBLID: 0018-6872, 51 (2010) 3-4

## The analysis of tocopherol content in sunflower and olive oils before and after thermal treatment

Z. Basić<sup>1</sup>, 1. The Institute of Hygiene of Military Medical Academy, Belgrade,  
S. Ražić<sup>2\*</sup> 2. The Faculty of Pharmacy, Analytic Chemistry  
Department, University of Belgrade

**Summary:** Vegetable oils have high vitamin E content. Depending on their production and consumption vitamin E can be preserved or diminished. There is an increasing number of vegetable oils offered in domestic market declared with tocopherol content; daily requirements in vitamin E are easily met to the significant extent with oil consumption. The purpose of the study was to determine tocopherol content in sunflower and olive oil from our market before and after their thermal treatment, using HPLC method. Retailed vegetable sunflower and olive oils of various origins and the way of production (the total of 16) were analyzed before and after temperature treatment for 20 minutes. • For an accurate and reliable determination of vitamin E content in food of complex composition it is necessary to perform multiple sample purification, but for determination in vegetable oils a liquid/liquid extraction is recommended. The n-hexane extraction was applied after alkaline hydrolysis, extract vaporisation and reconstitution in methanol using membrane filtration. Separation was performed by using RP-HPLC method with fluorescent detector with changeable wavelengths. For tocopherol detection 95% ethanol was applied as mobile phase, with 1,2 ml/min of flow rate and measuring at  $\lambda = 295$  nm wavelength for excitation and  $\lambda = 330$  nm for emission. Fluorescence detector selectivity and sensitivity enabled detection of  $\alpha$ -,  $\beta+\gamma$  and  $\delta$ -tocopherols in analyzed oil samples. Tocopherol content determined in oil before the treatment corresponded to the values specified in legislative, with significant differences depending on origin and declared production modality. Thermal treatment of sample significantly affected vitamin E content.

**Key words:** vegetable oil, tocopherols, HPLC method.