

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИТАМИН А И ВИТАМИН Е  
ЧРЕЗ ВИСОКО-ЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ  
В РИБА КАЯ (*Neogobius fluviatilis*)  
ОТ БЪЛГАРСКОТО ЧЕРНОМОРСКО КРАЙБРЕЖИЕ**

*Станчева М., Добрева Д. А., Мерджанова А., Галунска Б.  
Медицински Университет – Варна, ул. Марин Дринов № 55, 9000 Варна  
diana@ту-varna.bg*

**ABSTRACT**

This study presents simultaneous determination of Vitamin A (all-trans retinol) and Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) in tissue samples from Bulgarian Black Sea Coast fish species by high-performance liquid chromatography method.

The method was applied to samples of Black Sea goby fish (*Neogobius fluviatilis*) and includes two stages: extraction of tocopherol and retinol from the fish tissue and subsequent quantitative HPLC determination. Quantitative determination of the fat soluble vitamins in the hexane extracts has been done by HPLC with UV-detection on RP-column Nucleosil (25 cm x 0,46 cm). The elution of tocopherol and retinol from the chromatographic column was done by mobile phase composed of 100% methanol at flow rate 0.9 ml/min. Tocopherol was detected at wavelength 295 nm and retinol at 325 nm.

Mean concentration in fresh material were 47.93  $\mu$ g/100g for Vitamin A and 0.5 mg/100 g for Vitamin E. Our results are in good agreement with the data from the literature for other fish species.

*Keywords: retinol,  $\alpha$ -tocopherol, blacksee fish species, HPLC*

**ВЪВЕДЕНИЕ**

Рибата е ценен хранителен продукт – източник на белтъци, калций и фосфор. В нейните липиди се съдържат и голямо количество есенциални полиненаситени висши мастни киселини ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 ПНВМК). Други ценни компоненти в рибната тъкан са също важните за човешния организъм мастно- и водо-разтворими витамини А, Е, Д, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>, ниацин.

Витамин А (all-trans-ретинол) изпълнява важни функции в организма. Той е необходим за поддържане на нормалното зрение, тъй като е важна съставка на

зрителния пигмент на ретината на очите. Абсолютно е необходим за поддържането на структурите и функциите на епителните тъкани в организма, които включват кожата, мембраните, покриващи кръвоносните съдове, стомашно-чревния тракт, дихателните пътища, роговицата. Витамин А присъства в храни от животински произход, като в най-големи количества е в черния дроб, яйцата и млечните продукти. Предшествениците на витамин А – каротеноидите (провитамин А) се съдържат в много от плодовете и зеленчуците.

Витамин Е ( $\alpha$ -токоферол) е антиоксидант, който предпазва полиненаситените мастни киселини, включени в структурата на клетъчните мембрани и други важни клетъчни структури, от вредното действие на свободните радикали и други продукти с окислително действие в организма. По-значителни количества от него се съдържат в зародишите на житните растения, листните зеленчуци, ядкови плодове, нерафинираните растителни масла.

В литературата са описани различни методи за количествено определяне на мастно-разтворими витамини. За анализиране съдържанието на витамин А и витамин Е най-често се използва HPLC система с UV-Vis и/или флуоресцентна детекция [1-9]. Витамините са компонент на липидната фракция, която се извлича след осапунването на тъканната проба. Възможно е както индивидуално, така и съвместно определяне на двата витамина. Систематични изследвания за съдържанието им в наши черноморски риби не сме открили.

Целта на настоящата работа е съвместното определяне съдържанието на витамин А и витамин Е в черноморска Кая (*Neogobius fluviatilis*). Тя е една от най-масово консумираните риби в черноморския регион.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### ***Обработка на пробата***

Рибата е закупена от Варненската рибна борса през пролетта на 2008 г и веднага е пристъпено към анализирането ѝ. За количественото определяне на двата витамина е приложен и адаптиран метод, описан от D.I. Sanchez-Machado, J.Lopez-Cervantes и др. [1,2]. Направена е биометрична характеристика на рибните образци и е приготвена средна проба от ядивната тъкан. Тя е добре хомогенизирана и от нея са претеглени проби от по 0,2 g с точност до четвъртия знак, в градуирани стъклени епруветки (25 cm<sup>3</sup> с шлиф). Към всяка от пробите веднага е добавен антиоксидант – 1% метанолов разтвор на ВНТ (2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol, Sigma-Aldrich). Осапунването на рибната тъкан се извършва като към всички проби се прибавя по 3,0 cm<sup>3</sup> 0,5 М разтвор на калиева основа в метилов алкохол. Приготвените проби се разбъркват на Вортекс (Genius 3, IKA-Werke GmbH&CoKG, Germany) и се нагриват на водна баня при 80 °C за 15 min, като на всеки 5 min разбъркването се повтаря. На десетата минута се прибавят още 2,0 cm<sup>3</sup> от 0,5 М КОН в метанол.

След петнадесетата минута епруветките се охлаждат при 0-4 °C и във всяка се добавя по 1 ml дестилирана вода и 3 ml n-хексан (99% HPLC-grade,

Scharlau Chemie). Екстрахирането на мастноразтворимите витамини А и Е във фазата на хексана се провежда чрез енергично разбъркване на Вортекс, при 2500 rpm, за 1 min. За по-доброто разделяне на двете фази епруветките се центрофугират за 2 min при 425 rpm. Органичният слой се прехвърля количествено в градуирана епруветка от 10 мл с шлиф и се изпарява до сухо под азот. Сухият остатък се разтваря в 400  $\mu$ l 100 % MeOH, (HPLC-grade, Scharlau Chemie) и след филтруване през тefлонов филтър се подлага на хроматографски анализ.

### **Хроматографски анализ**

Хроматографският анализ се извършва на система за високо-ефективна течна хроматография (Thermo Scientific модел Spectra SYSTEM) с UV-детекция (UV-Vis детектор модел UV2000, Thermo Scientific). За хроматографското разделяне е използвана колона с обърнати фази Hypersil ODS2 250x4,6mm 5 $\mu$ m (Thermo Scientific). Количественият и качественият анализ е извършен с помощта на хроматографски софтуер ChromQuest. Хроматографирането е извършено при температурен режим на колоната 25 °C (поддържана с модул за термостатиране на колони модел Hot Pocket, Thermo Scientific), скорост на потока 0,9 ml/min и подвижна фаза 100 % MeOH. Определянето на витамин А е извършено при дължина на вълната на детектора 325 nm, а на витамин Е при 295 nm.

Получените резултати от хроматографския анализ са обработени статистически чрез програмата Microsoft Excel.

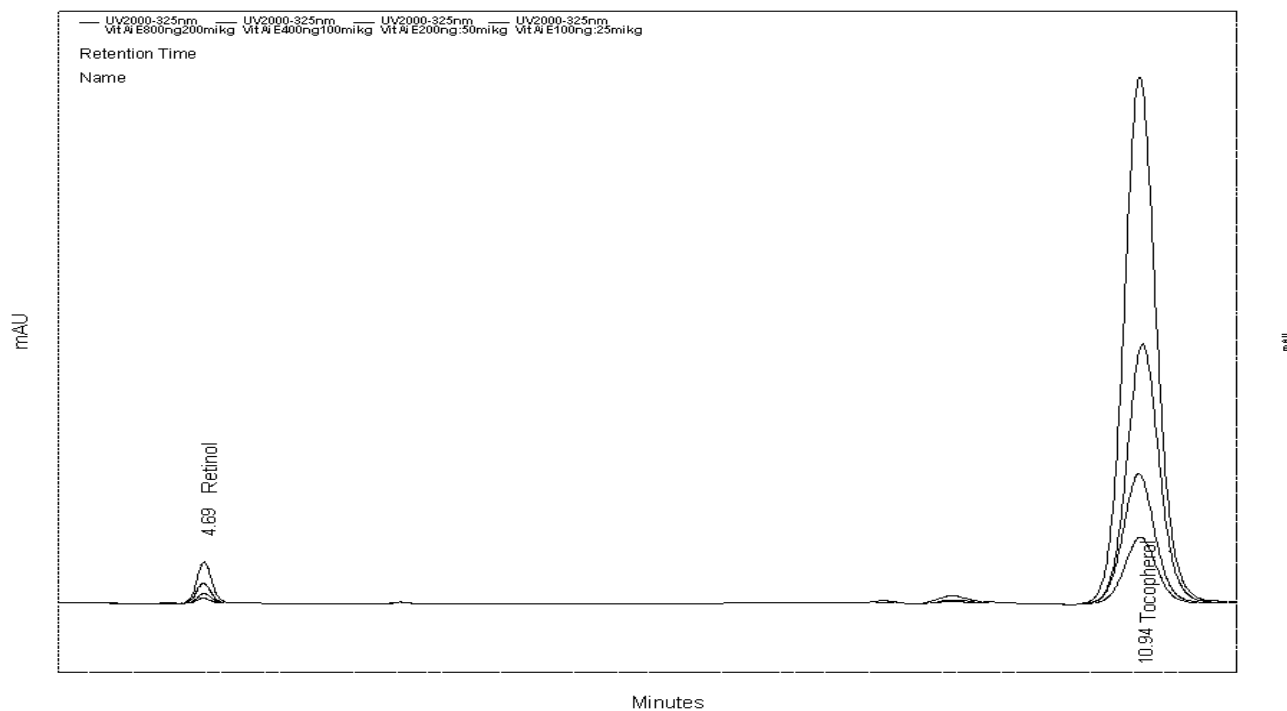
Съвместното количествено определяне на ретинола и  $\alpha$ -токоферола в изследваните проби е извършено с външна калибровка по метода на стандартната права. За приготвяне на стандартните разтвори са използвани концентриран разтвор на ретинол в n-хексан 500 $\mu$ g/2 ml (Retinol solution, Fluka) и чиста субстанция токоферол (DL-alpha Tocopherol, Supelco).

### **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ**

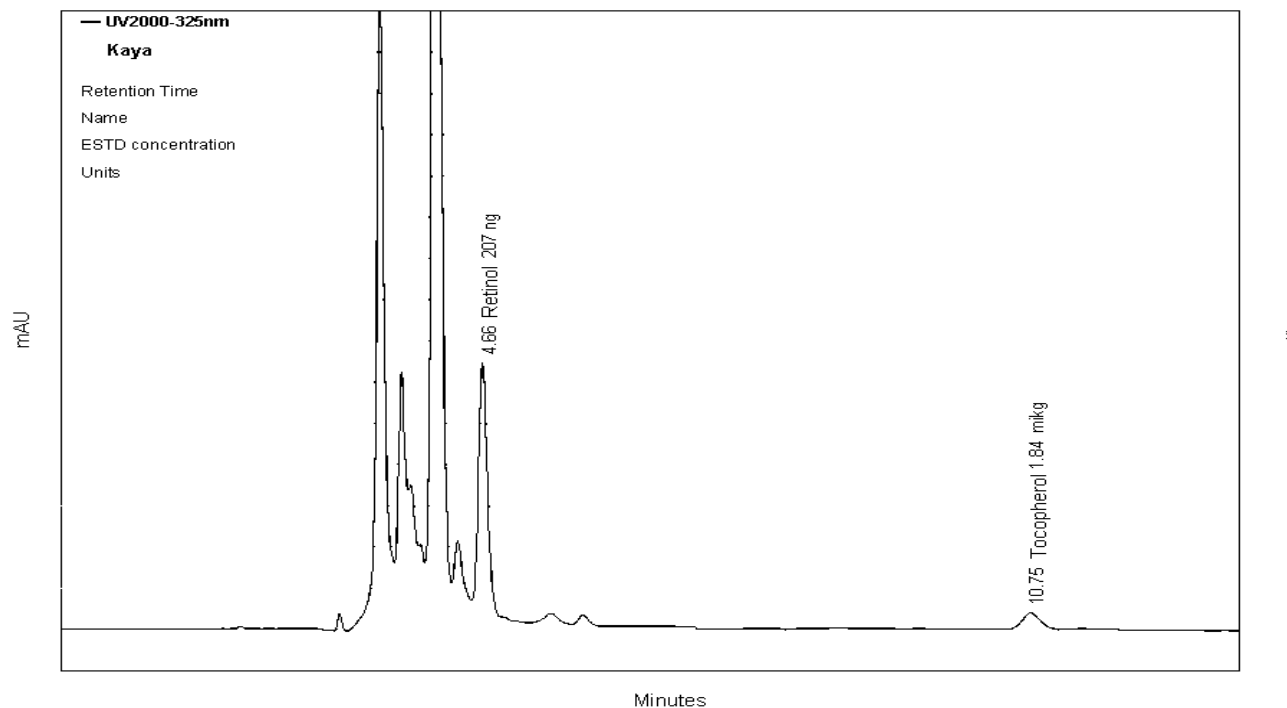
Пригответни са шест комбинирани стандартни разтвора на двата витамина в метанол: 10-800 ng витамин А и 2,5-200  $\mu$ g витамин Е. Всеки един от тях е анализиран хроматографски четирикратно. Количественият анализ е извършен по площта на съответните хроматографски пикове. На фигура 1 са представени насложени хроматограми на стандартни разтвори. Пикът на витамин А се открива при време на задържане  $4,65 \pm 0,8$  min, а на витамин Е съответно при  $10,84 \pm 1,0$  min, което е установено на базата на 24 инжектирания. И за двете стандартни прави е установена много добра линейност на метода –  $r^2$  съответно са 0,998790 за ретинол и 0,999971  $\alpha$ -токоферол.

На фигура 2 е представена хроматограма на липидния екстракт на рибната тъкан. От нея се вижда, че времената на задържане на ретинола и  $\alpha$ -токоферола попадат в интервалите, които сме установили при построяването на стандартните прави, а установените количества за двата витамина са в

границите на концентрационните интервали на използваните стандартни разтвори.



**Фигура 1.** Насложени HPLC хроматограми на комбинирани стандартни разтвори



**Фигура 2.** HPLC хроматограма на липидната фракция от изследваната рибна тъкан от кая

От получените хроматографски данни са изчислени средните стойности, стандартните отклонения и коефициентите на вариация. Резултатите са представени в таблица 1. Данните показват, че концентрациите на витамин А варират в по-широки граници (178-207 ng/ml), отколкото тези на витамин Е (1,84-2,18 µg/ml).

**Таблица 1** Концентрации, средни стойности, стандартно отклонение и коефициент на вариация на Вит. А и Вит. Е в анализираниите проби

№ проба	Конц. на компонента	
	Вит. А ng/ml	Вит. Е µg/ml
1	178	2.18
2	207	1.84
3	203	1.92
4	182	2.17
5	186	1.85
6	183	1.95
7	194	2.09
8	181	1.87
9	205	1.93
10	198	2.11
<b>Ср. стойност</b>	<b>191.70</b>	<b>1.99</b>
<b>Станд. откл.</b>	<b>11.00</b>	<b>0.16</b>
<b>Коеф. на вариация</b>	<b>15.13%</b>	<b>16.57%</b>

На базата на получените средни стойности е изчислено количеството на двата витамина, съдържащо се в сто грама сурова тъкан – 0.048 µg/100g за ретинол и 0,5 mg/100g за α-токоферол. Тези стойности за витамин А и витамин Е не се различават съществено от цитираните данни в литературата за други видове бяла риба (В риба тон –  $C_{\text{вит.А}} = 0,026 \mu\text{g}/100\text{g}$  и  $C_{\text{вит.Е}} = 0,5 \text{ mg}/100\text{g}$ ; в херинга –  $C_{\text{вит.А}} = 0,045 \mu\text{g}/100\text{g}$  и  $C_{\text{вит.Е}} = 0,76 \text{ mg}/100\text{g}$ ) [3].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определено е съдържанието на витамин А и витамин Е в черноморска кая.

Адаптиран и приложен е HPLC метод с UV-Vis детекция за съвместно определяне на двата витамина в липидната фракция от рибна тъкан. Резултатите показват, че методът е с добри аналитични характеристики, като стандартно отклонение и коефициент на вариация.

Изчислените количества на all-trans-ретинол (0.048 µg/100g) и α-токоферол (0,5 mg/100g) за сто грама сурова тъкан съответстват на такива данни в литературата за подобни видове риба.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. D.I. Sanchez-Machado, J. Lopez-Hernandez, P. Paseiro-Losada. *Journal of Chromatography A*, 976 (2002) 277-284
2. J.Lopez-Cervantes, D.I. Sanchez-Machado, N.J. Rios-Vazquez. *Journal of Chromatography A*, 1105 (2006) 135-139
3. Danish Food Composition Databank, Department of Nutrition, National Food Institute (2007) 0246, 0321, 0899
4. Фани Рибарова. *Храна и витамини*, София (2007)
5. Национален център по хигиена, медицинска екология и хранене, София, (1999)
6. Tan Qing-song, Fu Jie, He Rui-guo. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 19, 5, (1997)
7. Christopher J.Black. *Journal of AOAC International*, 90, 1, (2007)
8. Ji-Zeng Hou, Hans J Nelis., Patrick Lavens. *Analytical Biochemistr*, y 242 (1996) 123-128
9. A.Rodriguez-Bernaldo de Quiros, Julia Lopez-Hernandez, J.Simal-Lozano. *Eur. Food Res. Technology*, 212 (2001) 687-690