

DOZAREA VITAMINEI E ÎN LAPTE PRIN METODA COLORIMETRICĂ

Principiul metodei. La cald și în prezența acidului azotic concentrat, tocoferolii se oxidează cu formarea unui compus colorat ce se poate colorimetra.

Reactivi.

- 1) Soluție apoasă de hidroxid de potasiu 60%
- 2) Etanol absolut 96%
- 3) Eter etilic anhidru
- 4) Sulfat de sodiu anhidru
- 5) Acid azotic concentrat
- 6) α -tocoferol pur, forma liberă, pentru soluția etalon

Modul de lucru. Într-un balon ce poate fi adaptat la un refrigerent ascendent, se toarnă 100 ml lapte, 25 ml soluție de KOH 60% și 20 ml etanol 96%. Se fixează refrigerentul și se menține pe baia de apă la fierbere timp de 2 ore. Hidrolizatului obținut se răcește, se diluează cu 20 ml apă distilată și se trece cantitativ într-o pâlnie de separare.

Extracția tocoferolilor se face cu eter etilic care se introduce în pâlnie în trei reprize: prima extracție cu 50 ml, iar următoarele două cu câte 25 ml eter. Extractele eterice se reunesc și se spală de 3-5 ori cu apă distilată (până la dispariția reacției alcaline după fenolftaleină). Extractul eteric se deshidratează apoi cu 5-7 grame de sulfat de sodiu anhidru, până la limpezire completă. Se filtrează apoi într-un balon de 100 ml, iar precipitatul de pe filtru se spală cu volume mici de eter.

Eterul se evaporă pe baia de apă la fierbere, iar reziduu uscat obținut se dizolvă în 5 ml etanol absolut. Peste soluția etanolică se pipetează 1 ml acid azotic concentrat. Se cuplează balonul la un refrigerent ascendent și se încălzește timp de 3 minute pentru oxidarea tocoferolilor.

În calitate de control, se utilizează 5 ml etanol absolut peste care se pipetează 1 ml HNO_3 concentrat și se încălzește timp de 3 minute ca și proba de analizat, pe baia de apă la fierbere.

Mediile de reacție din probă și control se transvazează apoi în baloane cotate de 25 ml. Ambele baloane se răcesc apoi și se mențin timp de 15 minute la întuneric pentru dezvoltarea culorii după care se aduc volumele la semn cu etanol absolut și se citește extincția probei față de control la 470 nm.

Calculul rezultatelor. Pentru trasarea curbei de etalonare se prepară soluții de α -tocoferol în etanol absolut de concentrații succesive (cuprinse între 0,5 și 10 $\mu\text{g/ml}$). Se pipetează apoi câte 5 ml din fiecare soluție astfel obținută în baloane curate și perfect uscate după care se adaugă câte 1 ml acid azotic concentrat. Operațiunile ulterioare sunt identice cu cele descrise pentru proba de analizat. Calcularea concentrației de tocoferoli se face folosind următoarea formulă:

$c = \frac{a \times V \times d}{b \times 1000}$; unde: c – conținutul de vitamină E din materialul analizat (mg tocoferoli/1 gram de material biologic); a – cantitatea de vitamină E din proba calculată pe curba de etalonare ($\mu\text{g/ml}$); V – volumul materialului biologic luat în lucru (ml); D – densitatea materialului biologic (g/ml); 1000 – coeficient de trecere de la μg la mg tocoferoli.