



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Alen Martinko

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE VITAMINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD	7
§ 2. EKSTRAKCIJSKE TEHNIKE	8
2.1. Uvod.....	8
2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi.....	8
2.3. Ekstrakcija tekuće-tekuće	8
2.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	9
§ 3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA.....	10
§ 4. SPEKTROSKOPSKE METODE	12
§ 5. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	14
§ 6. ANALIZA VITAMINA TOPLJIVIH U VODI.....	16
6.1. Vitamin C (askorbinska kiselina)	16
6.2. Vitamini skupine B.....	18
§ 7. ANALIZA VITAMINA TOPLJIVIH U MASTIMA.....	22
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	25

§ Sažetak

Iako su u ljudskom organizmu prisutni u tragovima, vitamini predstavljaju jednu od najvažnijih skupina spojeva u prehrani i farmaciji. Osim prirodnih izvora vitamina, brojni prehrambeni proizvodi danas su obogaćeni sintetskim vitaminima. Vrlo je važno kontrolirati količinu pojedinih vitamina u takvim proizvodima jer prekomjerni unos može biti štetan.

S obzirom na njihovu strukturnu raznolikost, postoji velik broj metoda analize vitamina. Najčešće korištene analitičke metode su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), spektroskopske metode i u novije vrijeme kapilarna elektroforeza. Osim navedenih metoda, u literaturi se spominju i razni mikrobiološki testovi koji se danas sve manje koriste jer se zamjenjuju bržim, jednostavnijim i točnijim testovima. Svrha ovog rada je opisati najčešće korištene metode analize vitamina i usporedba prednosti i nedostataka svake od njih. Izbor analitičke metode ovisit će o uzorku koji se analizira, prije svega o njegovoj složenosti za analizu i prisutnoj koncentraciji i vrsti vitamina.

§ 1. UVOD

Vitamini su raznolika skupina organskih spojeva koja se u tragovima pojavljuje u biološkim sustavima. Međusobno se razlikuju po strukturi, biološkoj aktivnosti i fizikalno-kemijskim svojstima i prema tome obavljaju različite uloge. Neki vitamini (npr. vitamin E) su antioksidansi, neki imaju regulatornu ulogu u metabolizmu (npr. vitamin D), a velik broj vitamina su prekursori za brojne koenzime (npr. pantotenska kiselina je prekursor biološki važnog koenzima A, a iz folata se u stanicama može sintetizirati tetrahidrofolat).¹ Dije se na vitamine topljive u vodi (vitamini skupine B i vitamin C) i one topljive u mastima (vitamini A, D, E i K).

Konzumacija vitamina neophodna je za pravilno funkcioniranje stanica i održavanje zdravlja. Nedostatak vitamina u prehrani dovodi do raznih bolesti i poremećaja. Međutim, pretjerana konzumacija vitamina može također djelovati toksično na organizam, stoga je potrebno kontrolirati unos hrane bogate vitaminima.

Vitamini su sveprisutni u svakodnevnom životu, dodaju se u brojne prehrambene proizvode (mlijeko, energetska pića itd.), a mogu se naći i u lijekovima, multivitaminским tabletama te kozmetici. Uzorci za analizu vitamina kao što su biljke, meso i životinjski proizvodi se značajno razlikuju po svojem sastavu i zahtijevaju zaseban analitički postupak.

Usavršen je velik broj tehnika odvajanja, pročišćavanja i kvantifikacije vitamina, a analitičke metode koje se najčešće primjenjuju za analizu vitamina su:

- I. Tekućinska kromatografija
- II. Spektroskopske metode (UV/VIS, fluorimetrija)
- III. Kapilarna elektroforeza

Izbor analitičke metode ovisit će o matrici uzorka i o vitaminima koji se određuju.

§ 2. EKSTRAKCIJSKE TEHNIKE

2.1. Uvod

Vitamini su skupina organskih spojeva koja se u tragovima, uz veliki broj drugih različitih biomolekula, nalazi u realnim uzorcima kao što su biološki uzorci te hrana (voće, povrće, meso i sl.). Međusobno se razlikuju po strukturi, biološkoj aktivnosti i fizikalno-kemijskim svojstima te funkciji.

Odvajanje analita iz uzorka jedan je od najvažnijih koraka u analitičkom postupku. Za određivanje sadržaja vitamina u realnom uzorku potrebno je njihovo učinkovito odvajanje za što se koristi velik broj ekstrakcijskih tehnika. Ekstrakcija je metoda pripreme uzorka koja se temelji na selektivnom odvajanju analita između dviju faza koje se ne miješaju. Postoje razne ekstrakcijske tehnike, ovisno o vrsti faza koje se koriste za odvajanje analita. U analizi vitamina najvažnije su: ekstrakcija na čvrstoj fazi, ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ili mikrovalovima.

Neprestano se razvijaju nove ekstrakcijske metode, kombiniraju i poboljšavaju već postojeće tehnike, koje su brže, jeftinije i troše manje otapala, s naglaskom na tehnike koje nisu štetne za okoliš i dio su zelene kemije.

2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Metoda u kojoj se analit iz tekućeg ili plinovitog uzorka može odvojiti njegovim vezanjem na čvrsti sorbens naziva se ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE). Nakon vezanja, analit se prikladnim otapalom ili smjesom otapala eluira sa sorbena. Postoji veliki broj sorbena različitih polarnosti i veličina čestica. Kod složenih bioloških uzorka metoda SPE je najučinkovitija. Ukoliko je uzorak vitamina koji se analizira već u tekućem stanju (npr. energetska pića), moguća je direktna ekstrakcija nanošenjem uzorka na sorbens. Čvrsti uzorci se obično prethodno otape u nekom organskom otapalu (npr. acetonitril). Za vitamine topljive u vodi koriste se C₁₈ kolone, dok se u analizi vitamina topljivih u mastima često koristi neko hidrofilno punilo, primjerice silika-aminopropil.²

2.3. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće je najjednostavnija metoda ekstrakcije koja se temelji na odvajanju analita između dviju tekućina koje se ne miješaju. U lijevak za odjeljivanje ulije se smjesa koja sadrži uzorak i otapalo, a zatim se doda otapalo suprotne polarnosti koje se ne miješa

s prvim otapalom i promućka te se slojevi otapala odvoje. U realnim uzorcima, vitamini topljivi u vodi, najčešće se odvajaju od preostalih komponenti pomoću smjese etanola i metanola uz dodatak *n*-heksana. Pri analizi vitamina topljivih u mastima cilj je prevesti što više analita u organski sloj. Nakon odvajanja organskog sloja od vodenog, organsko otapalo se upari i suhi ostatak se ponovno otopi u pogodnom otapalu za daljnju analizu (npr. etanolu).³ Giorgi et al.⁴ su za odvajanje vitamina iz krvnog seruma i urina uz ekstrakciju tekuće-tekuće koristili i centrifugiranje kako bi što više smanjili utjecaj interferirajućih spojeva iz matrice uzorka.

Iako je ekstrakcija tekuće-tekuće vrlo jednostavna i jeftina metoda, njezin glavni nedostatak je što se koriste veliki volumeni organskih otapala.

2.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Za odvajanje analita iz različitih uzorka često se koristi ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *Ultrasonic Assisted Extraction*, UAE). Metoda je brza, reproducibilna, ne koristi se puno otapala, a analit je obično čist i bez interferencija. Uzorak se podvrgne djelovanju ultrazvučnih valova frekvencije veće od 20 kHz pri čemu dolazi do fizikalnih i kemijskih promjena uzorka uz često slabo povećanje temperature ($t < 50$ °C) što pozitivno utječe na učinkovitost ekstrakcije. Najčešće se u laboratorijima koriste ultrazvučna kupelj i ultrazvučna sonda. Metoda je prikladna za ekstrakciju bilo koje vrste vitamina, a najviše se koristi za njihovo odvajanje iz čvrstih uzoraka. Ekstrakte je nakon ekstrakcije u većini slučajeva potrebno filtrirati ili centrifugirati.

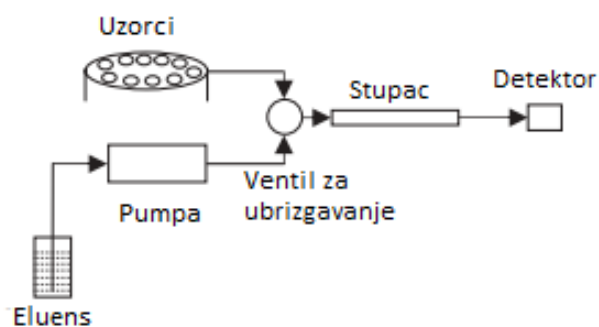
§ 3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je analitička metoda odvajanja, identifikacije i kvantifikacije komponenti smjese koja ima široku primjenu u analizi različitih uzoraka zbog svoje učinkovitosti i jednostavnosti. Sve kromatografske tehnike sadrže stacionarnu i mobilnu fazu. Općenita podjela kromatografskih metoda je prema izvedbi na kromatografiju u stupcu i plošnu kromatografiju, ovisno tome nalazi li se stacionarna faza u stupcu ili je nanosena na ravnu površinu. Mobilna faza (otapalo, inertni plin ili fluid) prolazi kroz stacionarnu fazu ili prelazi preko njezine površine. Odvajanje komponenti smjese ovisi o brzini kojom svaka komponenta prolazi s mobilnom fazom kroz stacionarnu fazu. Kromatografija u stupcu dodatno se dijeli na tekućinsku (eng. *Liquid Chromatography, LC*), plinsku (eng. *Gas Chromatography, GC*) i kromatografiju sa superkritičnim fluidom (eng. *Supercritical Fluid Chromatography, SFC*). Prema literaturnim podacima za odvajanje vitamina većinom se koristi kromatografija u stupcu.

U tekućinskoj kromatografiji mobilna faza je tekućina, a stacionarna faza može biti neka druga tekućina, krutina, organske smole (ionski izmjenjivač) ili gel, smješteni u uskoj cijevi. Najviše se primjenjuje razdjelna kromatografija pri kojoj je stacionarna faza organski spoj, vezan kemijskim vezama za punilo stupca. Molekule analita vežu se nekovalentnim interakcijama s tvari stacionarne faze te ovisno o svojstvima analita i spoja u stupcu dolazi do razdvajanja komponenti smjese. Klasična tekućinska kromatografija je u nekim slučajevima vrlo spora metoda slabe razlučivosti pa se uglavnom primjenjuje u preparativne svrhe, a ne analitičke. Međutim, ukoliko se tekućina u stupcu nalazi pod dovoljno velikim pritiskom, moguće je postići znatno bolje razlučivanje, a protok tvari je brži. Kromatografija u kojoj se kao stacionarna faza koriste vrlo sitne čestice (3-5 μm), a mobilna faza se propušta pod velikim ulaznim tlakom naziva se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*). Uređaj za HPLC je složeniji od uređaja za klasičnu tekućinsku kromatografiju, a sam postupak odvajanja analita je automatiziran (Slika 1). Detektori u komercijalno dostupnim instrumentima HPLC obično mjere apsorbanciju u UV/VIS dijelu spektra, ali koriste se i brojni drugi detektori kao što su primjerice infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (FTIR) i spektrometar masa. Noviji uređaji kao punilo koriste čestice manje od 2 μm koje dodatno povećavaju razlučivost i osjetljivost metode,

pa se navedena tehnika kromatografije naziva tekućinska kromatografija izrazito velike djelotvornosti (eng. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC).

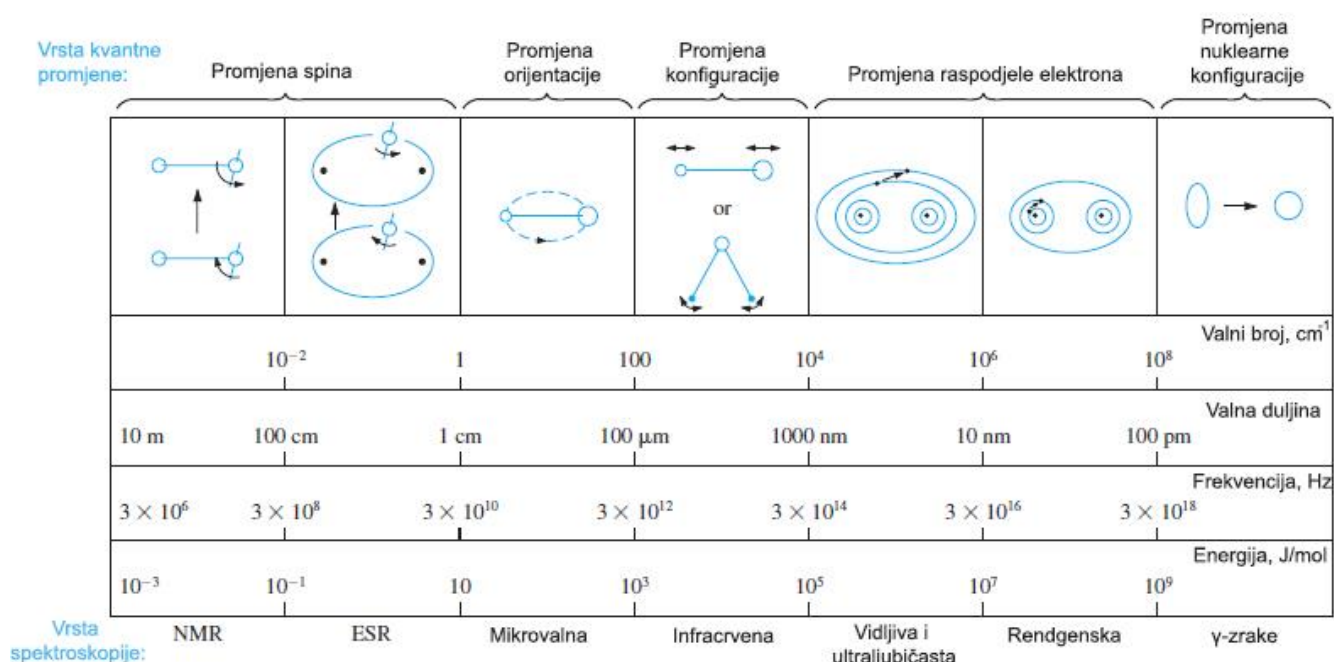
Za analizu vitamina najčešće se koristi HPLC obratnih faza kod koje je stacionarna faza nepolarna. Stupac se obično puni silikagelom s lancima od osam ili osamnaest ugljikovih atoma, pa se takve kolone skraćeno nazivaju C₁₈ ili C₈ kolonama.



Slika 1. Moderna aparatura za HPLC⁵

§ 4. SPEKTROSKOPSKE METODE

Proučavanjem interakcije atoma i molekula s elektromagnetskim zračenjem može se doći do informacija o vrstama prisutnim u analitu. Ovisno o valnoj duljini zračenja dolazi do različitih promjena u atomu ili molekuli na kvantnoj razini (Slika 2). Najveću primjenu u analizi pronalaze radiovalovi, ultraljubičasto (UV) zračenje, vidljivi dio spektra (VIS), infracrveno zračenje (IR) i rendgensko zračenje (X-zrake).



Slika 2. Kvantne promjene pri interakciji elektromagnetskog zračenja s analitom⁶

Spektrometrija je jedna od češće korištenih analitičkih metoda i pronalazi široku primjenu u kemiji, forenzici, poljoprivedi itd. U analitičke svrhe najviše se koristi apsorpcijska spektroskopija koja mjeri ovisnost količine apsorbiranog zračenja o valnoj duljini za pojedinu tvar. Može se koristiti u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. U kvantitativnoj analizi koristi se Beer-Lambertov zakon (1) koji izravno povezuje apsorbanciju analita s njegovom koncentracijom.

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

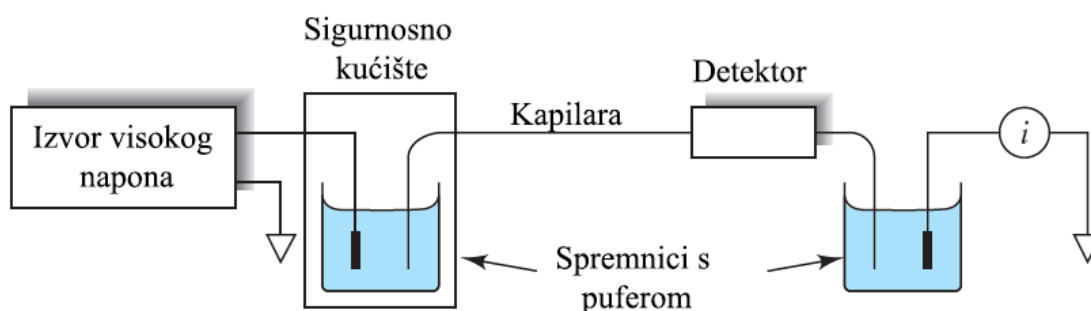
Kod emisijske spektroskopije najvažnija je fluorescencija do koje dolazi kad neka kemijska vrsta pređe u pobuđeno stanje, a zatim se pri prelasku natrag u osnovno stanje oslobađa energija otpuštanjem fotona veće valne duljine od upadnog zračenja. Fluorescencija

je svojstvo malog broja molekula i obično su njihove strukture rigidne. S obzirom na analit, razlikujemo atomsku i molekulsku spektroskopiju. Pod molekulskom spektroskopijom obično se podrazumijeva UV/VIS spektroskopija pri kojoj apsorpcijom zračenja dolazi do promjene raspodjele elektrona, odnosno prijelaza vanjskih elektrona. Značajne apsorpcijske vrpce u spektru pokazuju molekule koje posjeduju kromofore – nezasićene organske funkcionalne skupine koje apsorbiraju zračenje u UV ili vidljivom dijelu spektra. U kvalitativnoj analizi, navedeno svojstvo može se koristiti za određivanje kromofora prisutnih u analitu. Ipak, glavna primjena molekulske spektroskopije je u kvantitativnoj analizi zbog svoje osjetljivosti i jednostavnosti. Uređaj koji mjeri apsorbanciju je spektrofotometar, a sastoji se od izvora zračenja (lampa ili žarulja), filtera (monokromatora), kivete s uzorkom, detektora i računala.

Spektrofotometrija i fluorimetrija primijenjuju se za analizu vitamina koji značajno apsorbiraju u UV/VIS području elektromagnetskog spektra. Kod uzoraka s relativno velikim koncentracijama vitamina (npr. multivitaminske tablete) spektrofotometrija je dovoljno osjetljiva i pouzdana metoda za kvantitativnu analizu. Ukoliko se radi o biološkim uzorcima, primjerice urin, krv ili hrana, kod kojih je koncentracija vitamina manja, spektrofotometrija je u nekim slučajevima nedovoljno osjetljiva. Pod uvjetom da analit fluorescira, kao alternativa metoda može se primijeniti fluorimetrija, koja je dovoljno osjetljivija za određivanje vitamina u tragovima.

§ 5. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Elektroforeza je analitička metoda odvajanja nabijenih komponenata smjese na temelju njihovih brzina kretanja kroz medij uz primijenjeno vanjsko električno polje. Brzina kretanja kroz polje ovisi o masi molekule – što je veća masa, to će molekula sporije prolaziti kroz medij. Zbog svoje izrazito dobre razlučivosti, metoda je vrlo značajna u analizi organskih makromolekula (osobito proteina i nukleinskih kiselina). Medij na koji se nanose uzorci i kroz koji se kreću molekule je neka vrsta gela, a najčešći se koriste agarozni i poliakrilamidni. Najveći nedostatak klasične elektroforeze je njezino dugo trajanje, a potrebno je i svladati vještinu pripreve gela i nanošenja uzorka. Zbog navedenih razloga, razvijena je kapilarna elektroforeza – metoda u kojoj se uzorci nanose u kapilaru ispunjenu kvarcnim staklom i otopinom elektrolita. Aparatura za kapilarnu elektroforezu sastoji se od kapilare dugačke 40-100 cm i promjera 10-100 μm koja se nalazi između dva spremnika s puferima, u koje su uronjene je elektrode od platine spojene na izvor visokog napona (Slika 3).



Slika 3. Jednostavna shema aparature za kapilarnu elektroforezu.⁷

Za potrebe kapilarne elektroforeze koristi se napon od 5-30 kV. Na jednom kraju kapilare se uvodi uzorak, a na drugom kraju je spojen detektor. Za detekciju se može koristiti spektrometrija (UV-VIS, Raman itd.), spektrometrija masa, potenciometrija i konduktometrija. Uzorak se može unijeti u kapilaru na dva načina: ubrizgavanjem pod tlakom ili elektrokinetički. Uzorak se unosi pod tlakom tako da se kraj kapilare uroni u otopinu uzorka, a zatim uvuče pomoću vakuuma spojenog na drugi kraj kapilare ili hidrodinamički – podizanjem spremnika s uzorkom. Elektrokinetičko unošenje uzorka započinje uranjanjem jednog kraja kapilare u spremnik s uzorkom u koji je uronjena elektroda od platine. Zatim se uključi izvor visokog napona i uzorak počinje ulaziti u kapilaru kao posljedica gibanja iona i elektroosmotskog toka.

Elektroosmotski tok je gibanje molekula otapala u kapilari prema katodi pod visokim naponom. S obzirom da je brzina elektroosmotskog toka veća od brzine prolaska pojedinačnih iona, može se reći da on djeluje kao pumpa za mobilnu fazu. Otapalo sa sobom nosi neutralne, pozitivno i negativno nabijene čestice (iako njihovo kretanje prema negativno nabijenoj katodi nije elektrostatski povoljno). Kad čestice prođu kroz detektor dobije se elektroferogram koji slični kromatogramu, ali ima izraženije vrpce.

Klasična kapilarna elektroforeza može se primijeniti samo za određivanje nabijenih čestica. Međutim, ako se puferu doda površinski aktivna tvar kao što je natrijev dodecilsulfat (SDS) u koncentraciji pri kojoj dolazi do stvaranja micela, moguća je analiza i nepolarnih tvari. Kapilarna elektroforeza koja se izvodi uz korištenje micela naziva se micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (MEKC). U polarnom mediju, SDS stvara micide s negativno nabijenim skupinama okrenutim prema otapalu i hidrofobnom ugljikovodičnom dijelu unutar micide. Metoda se temelji na hidrofobnim interakcijama nepolarnog analita i SDS-a te prenosu nastalog kompleksa kroz kapilaru zbog negativnih naboja na vanjskoj strani micide. Osobito se koristi za određivanje manjih molekula koje je nemoguće odvojiti klasičnom kapilarnom elektroforezom.

§ 6. ANALIZA VITAMINA TOPLJIVIH U VODI

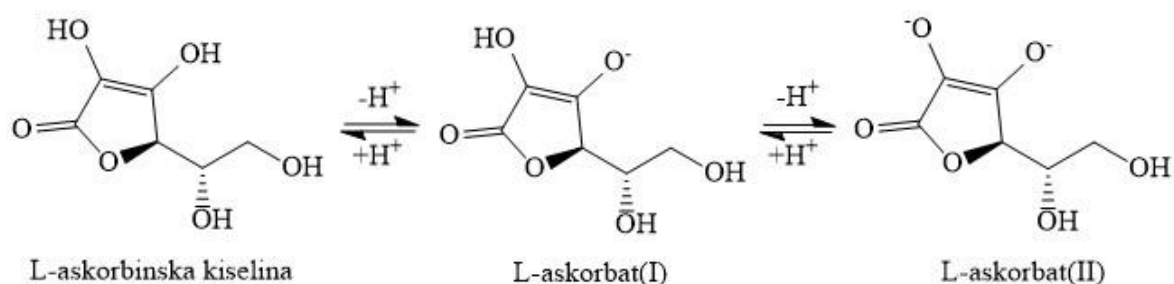
6.1. Vitamin C (askorbinska kiselina)

Za određivanje askorbinske kiseline postoji vrlo velik broj znanstvenih radova koji ukazuju na učinkovitost metode HPLC obratnih faza. Askorbinsku kiselinu moguće je odvojiti i ionskim izmjenjivačima, ali se vrlo rijetko koriste. Gotovo uvijek se koriste C₁₈ kolone. Ova metoda korisna je u analizi hrane i multivitaminskih pripravaka jer se njome mogu odvojiti askorbinska kiselina i njezin stereoizomer eritorbična kiselina⁸.

Lloyd et al.⁹ kao dobro punilo spominju i polistiren-divinilbenzen (PS/DVB) koji ima nešto veći promjer pora od punila na osnovu silike. Najbolje razdvajanje askorbinske i eritorbične kiseline postigli su izokratnim eluiranjem vodenom otopinom NaH₂PO₄ (*c* = 0,2 mol dm⁻³) pri pH otopine 2,14.

Za analizu vitamina C u biljkama koristi se širok raspon organskih otapala za eluiranje sa C₁₈ kolone (kloroform, acetonitril itd.) nakon odvajanja metodom HPLC. Zbog apsorpcijskog maksimuma pri $\lambda \approx 245$ nm (ovisno o pH) vrlo često se za detekciju askorbinske kiseline koristi UV spektrometrija koja je dovoljno osjetljiva kod uzoraka s relativno visokom koncentracijom vitamina C (npr. multivitaminske tablete i voćni sokovi). Ukoliko se analiziraju uzorci koji zahtijevaju veću osjetljivost, koristi se elektrokemijska detekcija.

Za spektrofotometrijsko određivanje vitamina C postoji velik broj radova u kojima se koriste različiti reagensi. Zbog disocijacije vitamina C (Slika 4) potrebno je kontrolirati pH otopine.



Slika 2. Disocijacija L-askorbinske kiseline u vodenoj otopini

U otopinama s vrijednosti pH većih od 5,0 vitamin C postoji pretežno u obliku L-askorbatnog(I) aniona s apsorpcijskim maksimumom pri valnoj duljini $\lambda = 265$ nm. Nedisocirani oblik, prisutan u kiselijim otopinama, ima maksimum u rasponu $\lambda = 245-255$ nm. Potpuno disocirani oblik, s maksimumom apsorpcije pri $\lambda = 300$ nm, prisutan je u jako lužnatim otopinama (pH > 12).

Brze i jednostavne metode kvantifikacije često se temelje na oksidacijsko-redukcijskim svojstvima vitamina C. U reakciji vitamina C s nekim oksidansom (npr. kalijev peroksimonosulfat¹⁰) dolazi do pretvorbe L-askorbinske kiseline u dehidro-L-askorbinsku kiselinu. Pri rasponu pH = 5-6 najprije se izmjeri apsorbanacija čiste L-askorbinske kiseline, a zatim se nakon dodatka oksidansa izmjeri apsorbanacija nastale smjese. Razlika apsorbanacije tih dviju otopina proporcionalna je koncentraciji L-askorbinske kiseline u uzorku. S obzirom da je reakcija oksidacije L-askorbinske kiseline često spora, kao katalizator se mogu koristiti ioni bakra (II).

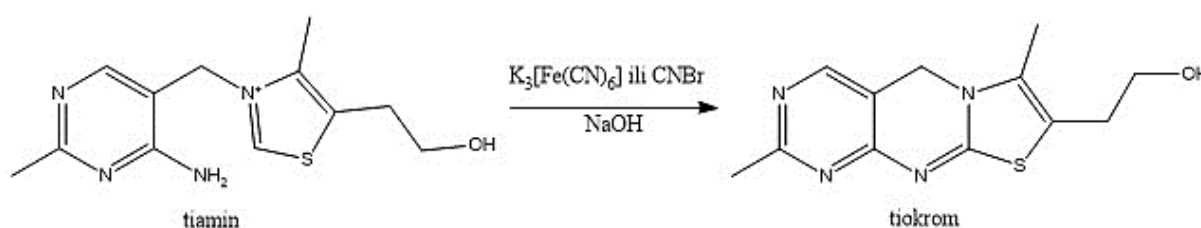
U analizi voća često se u spektru pojavljuju interferencije kao posljedica prisutnosti drugih karboksilnih kiselina (npr. oksalna, limunska i vinska kiselina). Stoga je prije snimanja spektra potrebno odvojiti interferirajuće komponente. HPLC obratnih faza uz 20 mM fosfornu kiselinu spominje se u literaturi kao dobra metoda odvajanja askorbinske kiseline od ostalih karboksilnih kiselina prisutnih u voću.¹¹

Vitamin C se zbog svojeg antioksidativnog svojstva često dodaje mesu kako bi se usporila oksidacija lipida koja dovodi stvaranja neugodnog mirisa i okusa mesa. Realini et al.¹² određivali su lipidni sastav i pratili boju goveđeg mesa pri 4 °C tijekom 8 dana. Uzorci za analizu bili su meso goveda hranjenog travom (GRASS) i meso goveda hranjenog žitaricama (GRAIN). Za određivanje masnih kiselina koristili su blisko zračenje infracrveno (eng. *Near Infrared*, NIR) i usporedili su spektre različitih uzoraka. Utvrđeno je da dodatak askorbinske kiseline usporava oksidaciju kod GRAIN uzoraka mesa, dok kod GRASS uzorka nije uočena značajna promjena lipidnog sastava mesa. U oba uzorka dodatak askorbinske kiseline doveo je do očuvanja boje u odnosu na meso bez dodane askorbinske kiseline.

6.2. Vitamini skupine B

Vitamini B skupine su strukturno vrlo raznoliki i svaki od njih nalazimo u više oblika, ali svi se mogu odvojiti HPLC-om na C₁₈ koloni.

Tiamin (vitamin B₁), koji postoji u obliku monofosfata (TMP), trifosfata (TTP) i pirofosfata (TPP), vrlo se dobro može odvojiti na C₁₈ koloni metodom HPLC obratnih faza uz izokratno eluiranje. Nešto rjeđe se koriste i kolone s PS/DVB-om. U kvantitativnoj analizi tiamina koristi se oksidacijsko-redukcijska reakcija s cijanidom. Kao izvor cijanida češće je u upotrebi kalijev heksacijanoferat(III), ali je moguće koristiti i cijanogen-bromid. Reakcija (Slika 5) se zasniva na oksidaciji tiamina i njegovih fosfatnih estera do tiokroma koji fluorescira (valna duljina pobude $\lambda_{ex} = 365$ nm, valna duljina emisije $\lambda_{em} = 435$ nm), a intenzitet fluorescencije tiokroma proporcionalan je njegovoj koncentraciji u uzorku što omogućuje određivanje količine tiamina.



Slika 5. Oksidacija tiamina kalijevim heksacijanoferatom ili cijanogen-bromidom u lužnatim uvjetima

Navedena metoda se vrlo često koristi za analizu velikog broja različitih bioloških uzoraka, hrane i lijekova. Pri kromatografskom određivanju tiamina moguća su dva pristupa - oksidacija tiamina prije nanošenja na kolonu ili nakon propuštanja kroz kolonu. Oksidacija u predstupcu smatra se pogodnom metodom jer se dobivaju jasni kromatogrami i dobra razlučivost, aparatura je jednostavnija i jeftinija. Međutim, kako se tiokrom ne bi ponovo reducirao do tiamina mobilna faza mora biti izrazito jaka lužina ($pH > 12$), a uz to, pri tako visokoj pH vrijednosti, može i punilo kolone reagirati s eluensom. Glavna prednost oksidacije tiamina nakon propuštanja kroz kolonu jest korištenje eluensa nižih pH vrijednosti ($pH > 8$) što osigurava stabilnost stacionarne faze. To je posebno važno ukoliko se kao punilo koristi C₁₈. Glavni nedostatak ove izvedbe je potreba za dodatnom opremom.¹³

Za analizu multivitaminskih pripravaka kao metoda detekcije može se koristiti UV-zračenje ($\lambda = 254$ nm). Od vitamina B skupine snažno apsorbiraju riboflavin, vitamin B₆ i vitamin B₁₂ te se oni mogu lako odrediti spektrofotometrijski. U vodenim otopinama riboflavin pokazuje čak četiri apsorpcijska maksimuma pri 223, 266,5, 373,50 i 446,50 nm.¹⁴

Vitamin B₆ u kiselim vodenim otopinama snažno apsorbira UV zračenje pri valnoj duljini 290 nm, a u neutralnim vodenim otopinama pokazuje apsorpcijski maksimum pri $\lambda = 390$ nm.¹⁵ Osim, toga, vitamin B₆ i fluorescira pa se za osjetljivija mjerenja može primijeniti i fluorimetrija. Valna duljina pobude obično je 290 nm, a valna duljina emisije 395 nm. Navedene valne duljine odgovaraju fluorescenciji piridoksala i njegovih fosfata te piridoksamina.

Vodene otopine vitamina B₁₂, u obliku cianokobalamina, pokazuju tri apsorpcijska maksimuma pri valnim duljinama 278, 361 i 550 nm, od kojih je onaj pri 361 nm najjačeg intenziteta. Pokazalo se da za analizu cijanokobalamina u složenijim uzorcima spektrofotometrija nije primjerena jer nije dovoljno osjetljiva. Stoga se cianokobalamin (u obliku kobalta) vrlo često u biološkim uzorcima određuje metodom plamene atomske apsorpcijske spektroskopije (FAAS) jer je dovoljno osjetljiva (granica detekcije 4 ng cm⁻³).¹⁶ Uzorak cianokobalamina oksidira se smjesom perklorne, dušične i sumporne kiseline, ispire s 1-nitro-2-naftolom i ekstrahira s kloroformom. Nakon atomizacije, apsorpcija se mjeri pri 241 nm.¹⁷

Vitamin B₂ (riboflavin) se u biološkim sustavima može pronaći u obliku flavin adenin dinukleotida (FAD), flavin mononukleotida (FMN) i riboflavina koji pokazuju jaku fluorescenciju zbog čega se najčešće određuju fluorimetrijski ($\lambda_{\text{ex}} = 440\text{-}500$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 520\text{-}530$ nm). Metoda je dovoljno osjetljiva kako za analizu lijekova, tako i za analizu bioloških uzoraka.

Tekućinska kromatografija se koristi za analizu ukupne količine riboflavina (FAD, FMN i riboflavin) ili pojedinačnu analizu flavina. Za određivanje ukupne količine riboflavina najčešće se koriste C₁₈ kolone uz smjesu acetonitrila ili metanola (povremeno uz dodatak pufera) kao standardne eluense. Ukoliko je potrebno pojedinačno kvantificirati riboflavin, FAD i/ili FMN, koriste se punila polimernih struktura kao npr. PS/DVB. Potrebno je osigurati dovoljno kisele uvjete (pH < 2) pri kojima su i FAD i FMN stabilni. Punila na bazi silike (C₁₈) pri navedenim kiselim uvjetima često reagiraju, pa se u tom slučaju ne koriste. U uzorcima velike koncentracije riboflavina, za detekciju se može koristiti UV-zračenje pri 254 nm. Češće se ipak, za analizu realnih uzoraka, primjenjuje fluorimetrija (valna duljina pobude $\lambda_{\text{ex}} = 440\text{-}450$ nm, valna duljina emisije $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm), a na temelju intenziteta može se odrediti koncentracija ukupnog riboflavina u uzorku. Zbog sličnih kromatografskih postupaka i detekcije, često se tiamin i riboflavin određuju istovremeno u istom uzorku.¹⁸

Vitamin B₃ (niacin) kemijski je najstabilniji od svih vitamina topljivih u vodi. Unatoč svojoj stabilnosti, potreban je pažljiv odabir punila kromatografske kolone zbog brojnih nečistoća prisutnih u biološkim uzorcima koje mogu smetati prilikom UV-detekcije vitamina. Zbog toga se vrlo često za odjeljivanje kombiniraju kromatografija obratnih faza na C₁₈ koloni i ionski izmjenjivači. Izbor mobilne faze ovisi o uzorku i koncentraciji niacina, a najčešće se koriste metanol, octena kiselina, mravlja kiselina i fosfatni pufer. U posljednje vrijeme određivanje niacina znatno je olakšano razvojem masene spektrometrije koja se gotovo uvijek koristi kao detektor metodi HPLC.

Kromatografsko određivanje vitamina B₆ koristi se uglavnom pri analizi tjelesnih tekućina i tkiva, ali se može primijeniti i na prehrambene proizvode. S obzirom da se nalazi u velikom broju oblika, najčešće se koristi metoda HPLC s ionskim izmjenjivačem. Zbog slabije razlučivosti, dosad je uspješno primijenjena samo za određivanje vitamina B₆ u farmaceuticima. Pri analizi vitamina B₆ u hrani i biološkim uzorcima koristi se metoda HPLC obratnih faza na C₁₈ koloni. Mobilna faza obično je otopina jake kiseline u fosfatnom puferu. Primjerice, Tsuge¹⁹ spominje 1%-tnu otopinu acetonitrila i perklorne kiseline ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatnom puferu ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) kao optimalnu mobilnu fazu u analizi vitamina B₆ u biološkim uzorcima. Kao detektor za sve oblika vitamina B₆ koristi se fluorimetrija, a valne duljine pobude i emisije treba podesiti ovisno o vrsti koja se određuje.

Folna kiselina i folati (vitamin B₉) danas se najbolje određuju metodom HPLC-MS koja omogućuje kvantifikaciju svih folata i folne kiseline prisutnih u nekom uzorku. Punilo je i u ovom slučaju oktadecilsilika, a kao mobilna faza se koristi otopina acetonitrila ili metanola u vodi uz dodatak hlapljive tvari kao što je octena kiselina. Jeftinija metoda određivanja koja se može koristiti je HPLC obratnih faza na C₁₈ koloni uz ionsko vezanje. Mobilna faza i u tom slučaju obično se sastoji od otopine acetonitrila ili metanola u vodi. Za detekciju kod ovog pristupa može se koristiti UV zračenje ($\lambda = 280\text{-}290 \text{ nm}$) ili fluorescencija ($\lambda_{\text{ex}} = 280\text{-}360 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 340\text{-}415 \text{ nm}$, ovisno o vrsti koja se određuje; pH = 2,3).

Metoda HPLC obratnih faza na C₁₈ koloni pogodna je metoda za određivanje vitamina B₁₂. Najčešće korišteni eluensi su otopine metanola ili acetonitrila u vodi. Za detekciju uzoraka koji ne zahtijevaju veliku osjetljivost koriste se UV detektor ($\lambda = 361 \text{ nm}$ za cijanokobalamin) ili VID detektor ($\lambda = 550 \text{ nm}$). Ukoliko je potrebna veća osjetljivost (u ng), što je uglavnom slučaj pri analize hrane, koristi se metoda spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS).

Biotin se u multivitaminskim tabletama, s dovoljnom osjetljivošću, može odrediti metodom HPLC obratnih faza na C₁₈ koloni uz otopinu metanola ili acetonitrila u vodi kao eluensom uz UV detektor pri rasponu valnih duljina $\lambda = 200\text{-}220$ nm. Osjetljivija metoda je i fluorimetrija uz derivatizaciju biotina prije ili nakon nanošenja na kolonu uz dodatak fluorescirajućeg reagensa. Primjerice, Lahély et al.²⁰ koristili su avidin-fluorescein 5-izotiocijanat s valnom duljinom pobude $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm i valnom duljinom emisije $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm.

Uz navedene metode za određivanje biotina u različitim realnim uzorcima koristi se i tekućinska kromatografija sa spektrometrom masa kao detektorom (LC-MS) koja je bolje osjetljivosti ali je analitički postupak nešto skuplji.

Kromatografsko određivanje pantotenske kiseline (vitamin B₅) najmanje je istraženo. Može se odijeliti metodom HPLC obratnih faza na koloni C₁₈. Glavni problem kod analize pantotenske kiseline je detekcija s obzirom da ne sadrži kromofore koji apsorbiraju u UV dijelu spektra, a fluorimetrija se ne može primijeniti jer derivatizacijom ne nastaju spojevi s zadovoljavajućim intenzitetima fluorescencije. U novijim istraživanjima pokušava se optimizirati detekcija korištenjem spektrometra mase kao detektora.^{21,22}

Vitamini koji pokazuju kiselinsko-bazna svojstva, tj. u vodenim otopinama disociraju na nabijene ionske vrste, idealni su za analizu kapilarnom elektroforezom. Uzorci za analizu mogu biti lijekovi, multivitaminske tablete, voće, povrće, meso itd. Kapilarna elektroforeza omogućava istovremeno određivanje više vitamina topljivih u vodi u istom uzorku.

Fotsing et al.²³ uspješno su odvojili smjesu vitamina (tiamin, riboflavin, nikotinamid, askorbinsku kiselinu, piridoksin i pantotensku kiselinu) u multivitaminskim tabletama. Najbolju razlučivost dobili su korištenjem otopine natrijeva tetraborata pri pH otopine 8,5. Koristili su hidrodinamičko unošenje uzorka, a kapilara je bila termostatirana na 25 °C uz primijenjen napon od 25 kV. UV-detektor podešen je na valnu duljinu $\lambda = 215$ nm za detekciju pantotenske kiseline i piridoksina te $\lambda = 225$ nm za preostale vitamine. Metoda micelarne elektrokinetičke kapilarne kromatografije obično se koristi za analizu smjese vitamina topljivih u vodi, najčešće u hrani i biološkim uzorcima. Osim analize ukupne smjese vitamina, moguće je i kvantificirati pojedinačne vitamine topljive u vodi. Najčešće korišteni puferi su fosfatni i boratni (pH = 7,5-9,5). Za detekciju velike koncentracije vitamina koristi se UV detektor ili fluorimetrija (kod vitamina koji fluoresciraju) ukoliko je potrebna veća osjetljivost. Odabir valne duljine zračenja ovisi o spektroskopskim svojstvima vitamina koji se analizira.

§ 7. ANALIZA VITAMINA TOPLJIVIH U MASTIMA

Vitamin A i karotenoidi mogu se odrediti pomoću različitih analitičkih metoda. U kliničkim laboratorijima postupak određivanja vitamina A u krvnom serumu sastoji se od propuštanja prethodno pripremljenog uzorka kroz kolonu C₁₈ na kojoj je vezan neki alkan (ovisno o proizvođaču) i izokratnog ispiranja metanolom (obično se koristi 80 – 100%-tni metanol). Za detekciju se zbog svoje jednostavnosti koriste UV/VIS detektori ($\lambda = 325$ nm). Kao dobra i osjetljiva metoda karakterizacije različitih karotenoida kod analize biljaka pokazala se i spektrometrija masa.²⁴

Tode i Sugiura²⁵ uspješno su za određivanje karotenoida u hrani primijenili vezani sustav HPLC-NMR pri čemu su za odvajanje anlita iz uzorka koristili tekućinsku kromatografiju obratnih faza na koloni C₁₈, a kao eluens smjesu deuteriranog kloroforma i acetonitrila pri različitim omjerima izokratnog ili gradijentnog eluiranja. Koristili su detektor s nizom fotodioda, a svaku odvojenu frakciju su analizirali pomoću metode NMR. Na temelju spektra 1-D i 2-D (COSY) odredili su strukture prisutnih karotenoida. Cijeli analitički postupak određivanje karotenoida u hrani pokazao se vrlo brzim i jednostavnim.

Vitamin D (u obliku D₂ i D₃) može se odrediti kromatografijom na koloni s normalnim ili obratnim fazama u većini prehrambenih, bioloških i farmaceutskih uzoraka. Ako se kao punilo koristi nepolarna tvar (silika), najčešći izbori eluensa su *n*-heksan i izopropanol. U kromatografiji obratnih faza, vitamin D se većinom izokratno eluira otopinom metanola ili acetonitrila u vodi. Kod većine matrica koristi se dektor UV/VIS ($\lambda = 265$ nm) koji je dovoljno osjetljiv za analizu vitamina D u hrani i farmaceutskim uzorcima. U analizi krvnog seruma potrebna je veća osjetljivost i zato se većinom koristi spektrometrija masa.

Vitamin E pripada tokoferolima, skupini spojeva na koje se mogu vezati različite skupine te ovisno o vezanoj skupini na molekulu tokoferola razlikuju se tokoferoli i tokotrienoli. Najpoznatiji i najrašireniji oblik tokoferola je α -tokoferol.

Vitamin E može se brzo i lako odrediti metodom HPLC obratnih faza na C₁₈ koloni. Gimeno et al.²⁶ koristili su 96%-tni metanol kao mobilnu fazu za analizu vitamina E u biljnim uljima. Osim ove metode, za kvantifikaciju tokoferola i tokotrienola u hrani, može se koristiti i metoda HPLC s normalnim fazama pri čemu se kolona tada obično puni silika-punilom promjera 5 μ m, a optimalna mobilna faza je smjesa heksana i izopropanola (99:1 v/v). Za

detekciju većih koncentracija vitamina E koristi se UV detektor ($\lambda = 292\text{-}296\text{ nm}$), a ukoliko je potrebna veća osjetljivost, može se koristiti fluorescencijski detektor ($\lambda_{\text{ex}} = 295\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330\text{ nm}$), koji se većinom koristi za analizu vitamina E u hrani i biološkim uzorcima. Osim najčešće korištenih kromatografskih metoda, za određivanje vitamina E nakon ekstrakcije koriste se razne kolorimetrijske i spektrofotometrijske metode s UV-ili fluorescencijskim detektorom, radioimunokemijsko određivanje, elektroforeza te se Ramanova i IR spektroskopija. Kombinacijom Ramanove spektroskopije i optičke mikroskopije moguće je vrlo uspješno razlikovati tokoferole u biološkim uzorcima (Beattie et al.).²⁷

Vitamin K i njegovi derivati odvajaju se tekućinskom izokratnom kromatografijom obratnih faza na C_{18} koloni. Kod rutinskih analiza, primjerice kliničkih uzoraka, zbog svoje jednostavnosti i dovoljno velike osjetljivosti primjenjuje se fluorescencijski detektor. Iako kinon u vitaminu K ne fluorescira, može se prolaskom kroz kolonu reducirati do hidrokinona koji jako fluorescira ($\lambda_{\text{ex}} = 320\text{ nm}$ za metakinon-4 i $\lambda_{\text{ex}} = 240\text{ nm}$ za ostale vrste, $\lambda_{\text{em}} = 430\text{ nm}$). Kinon se reducira prolaskom kroz redukcijску kolonu koja sadrži neki metal (obično cink ili platinu) koja se postavlja prije fluorescencijskog detektora. Kao metoda detekcije koristi se i spektrometrija masa, međutim za analizu hrane i kliničke svrhe samo fluorescencijski detektor koji se pokazao dovoljno osjetljivim i točnim.

Od vitamina topljivih u mastima, spektrofotometrijski je moguće točno i precizno odrediti retinoide, karotenoide i vitamin K.

Karotenoidi i retinoidi vrlo jako apsorbiraju zračenje u UV-VIS dijelu spektra zbog visokog stupnja konjugiranosti. S povećanjem broja dvostrukih veza u molekuli raste molarni apsorpcijski koeficijent i valna duljina maksimalne apsorpcije. Apsorpcijski maksimum karotenoida nalazi se pri valnoj duljini od oko 450 nm, dok se kod retinoida može nalaziti između 325 i 380 nm. Ukoliko se želi odrediti samo retinol ili retinilni esteri, može se koristiti i fluorimetrija ($\lambda_{\text{ex}} = 324\text{-}328\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470\text{-}490\text{ nm}$) budući da retinoična kiselina i retinal ne fluoresciraju.²⁸

Pojedini oblici vitamina K sadrže 1,4-naftokinonski prsten koji apsorbira UV zračenje pri 243, 249, 260, 269 i 325 nm. Često se radi bolje specifičnosti koristi fluorimetrija. Prethodno je potrebno reducirati kinon u hidrokinon koji fluorescira ($\lambda_{\text{ex}} = 244\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 418\text{ nm}$).

Iako se spektroskopskim metodama mogu često zadovoljavajuće odrediti vitamini u raznim biološkim uzorcima, hrani i lijekovima, one se uglavnom koriste u sprezi s

kromatografskim metodama kako bi se odvojili od ostalih komponenata smjese što rezultira jasnijim spektrima i točnijim rezultatima.

Razvoj micelarne elektrokinetičke kapilarne kromatografije omogućio je određivanje nepolarnih i nenabijenih vrsta kao što su vitamini A, D, E i K.

Retinol u krvi ipak se može odrediti klasičnom kapilarnom elektroforezom, a kao metoda detekcije koristi se fluorescencija inducirana laserom. Najčešće korišteni puferi su fosfatni puferi pri $\text{pH} < 8$. Elektroferogrami u analizi vitamina topljivih u mastima često mogu biti slabo razlučivi. Liu et al.²⁹ su određivali smjesu vitamina D₂, α -tokoferola i retinol-palmitata uz prisutnost različitih površinski aktivnih tvari. Proučavali su kako različit unos uzoraka u kapilaru utječe na elektroferogram. Uočeno je da su najbolji rezultati dobiveni unosom pod utjecajem električnog polja uz primjenu pozitivnog tlaka (PA-FESI metoda) kako bi se spriječilo vraćanje uzorka u spremnik zbog povratnog elektroosmotskog efekta, koje je posljedica elektrostatskog privlačenja negativno nabijene micle i pozitivno nabijene anode u spremniku s uzorkom. Analiza vitamina topljivih u mastima kapilarnom elektroforezom još se uvijek istražuje i nastoji optimizirati, stoga trenutno nema široku primjenu.

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. U. D. L. Nelson, U. M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed. edition, W. H. Freeman, New York, NY : Houndmills, Basingstoke, 2017.
2. J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* **935** (2001) 3–11.
3. F. Momenbeik, M. Roosta, A. A. Nikoukar, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 3770–3773.
4. M. Grotzkyj Giorgi, K. Howland, C. Martin, A. B. Bonner, *Sci. World J.* **2012** (2012) 1–8.
5. T. D. Lee, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22** (2011) 196–196.
6. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Cengage Learning, 2013.
7. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 7., Cengage Learning, 2017.
8. W. A. Behrens, R. Madere, *J. Liq. Chromatogr.* **15** (1992) 753–765.
9. L. L. LLoyd, F. P. Warner, J. F. Kennedy, C. A. White, *Food Chem.* **28** (1988) 257–268.
10. M. Salkić, A. Selimović, *Croat. Chem. Acta* **88** (2015) 73–79.
11. M. D. Pundlik, *J. Indian Chem. Soc.* **81** (2004) 721–723.
12. C. E. Realini, S. K. Duckett, W. R. Windham, *Meat Sci.* **68** (2004) 35–43.
13. P. Lynch, I. Young, *J. Chromatogr. A* **881** (2000) 267–284.
14. P. Thakuri, R. Joshi, S. Basnet, S. Pandey, S. Taujale, N. Mishra, (n.d.) 4.
15. X.-Y. Zheng, E.-G. Pang, Y.-Q. Zhao, Y. Jiao, B.-S. Yang, *Supramol. Chem.* **20** (2008) 553–557.
16. O. Karmi, A. Zayed, S. Baragethi, M. Qadi, R. Ghanem, *IIOAB J.* **2** (n.d.) 23–32.
17. S. S. Kumar, R. S. Chouhan, M. S. Thakur, *Anal. Biochem.* **398** (2010) 139–149.
18. P. Finglas, R. Faulks, *Food Chem.* **15** (1984) 37–44.
19. H. Tsuge, *Determination of vitamin B6 vitamers and metabolites in a biological sample*, in *Methods Enzymol.*, Elsevier, 1997, 3–12.
20. S. Lahély, S. Ndaw, F. Arella, C. Hasselmann, *Food Chem.* **65** (1999) 253–258.
21. O. Heudi, P. Fontannaz, *J. Sep. Sci.* **28** (2005) 669–672.
22. A. Gentili, F. Caretti, G. D'Ascenzo, S. Marchese, D. Perret, D. Di Corcia, L. M. Rocca, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22** (2008) 2029–2043.
23. L. Fotsing, M. Fillet, I. Bechet, Ph. Hubert, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15** (1997) 1113–1123.
24. S. M. Rivera, P. Christou, R. Canela-Garayoa, *Mass Spectrom. Rev.* **33** (2014) 353–372.
25. C. Tode, M. Sugiura, *Chapter 15. LC-NMR for the Analysis of Carotenoids in Foods*, in V. R. Preedy (Ed.), *Food Nutr. Compon. Focus*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2012, 250–260.
26. E. Gimeno, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, M. C. de la Torre, M. C. López-Sabater, *J. Chromatogr. A* **881** (2000) 251–254.
27. J. R. Beattie, C. Maguire, S. Gilchrist, L. J. Barrett, C. E. Cross, F. Possmayer, M. Ennis, J. S. Elborn, W. J. Curry, J. J. McGarvey, B. C. Schock, *FASEB J.* **21** (2007) 766–776.
28. V. R. Preedy, ed., *Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2012.
29. Q. Liu, L. Jia, C. Hu, *Chromatographia* **72** (2010) 95–100.