

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

## DIPLOMSKO DELO

Mina Nikolić

Ljubljana, 2020



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM 1. STOPNJE  
KEMIJA

**Pregled metod za določevanje vitaminov v prehranskih  
dopolnilih**

DIPLOMSKO DELO

Mina Nikolić

MENTOR: izr. prof. dr. Drago Kočar

Ljubljana, 2020



# IZJAVA O AVTORSTVU

## diplomskega dela

Spodaj podpisana *Mina Nikolić* sem avtorica diplomskega dela z naslovom: *Pregled metod za določevanje vitaminov v prehranskih dopolnilih*.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je diplomsko delo rezultat mojega raziskovalnega dela pod mentorstvom *izr. prof. dr. Draga Kočarja*;
- sem poskrbela, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem diplomskem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili;
- se zavedam, da je plagiatorstvo, v katerem so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorski in sorodnih pravicah – uradno prečiščeno besedilo (ZASP-UPB3) (Ur. list RS, št. 16/2007));
- sem poskrbela za slovnično in oblikovno korektnost diplomskega dela;
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela.

V Ljubljani, *17.08.2020*

Podpis avtorice:



## **Pregled metod za določevanje vitaminov v prehranskih dopolnilih**

**Povzetek:** Vitamini so ključnega pomena za človeško zdravje, saj nezadosten vnos le teh lahko povzroči razne bolezni. Kadar ni možno zagotoviti zadostnega vnosa vitaminov skozi prehrano, uporabljajo ljudje prehranska dopolnila. Uporaba prehranskih dopolnil mora biti strogo kontrolirana, saj je tudi prekomeren vnos vitaminov lahko škodljiv. Iz tega razloga je zelo pomembno ujemanje vsebnosti vitaminov napisane na deklaraciji prehranskega dopolnila z dejansko vsebnostjo. Za kontrolo tega ujemanja potrebujemo natančne, zanesljive in hitre analizne metode. Ene najbolj pogosto uporabljenih so tekočinska kromatografija, kapilarna elektroforeza, voltometrija, spektrofotometrija in superkritična tekočinska kromatografija. To diplomsko delo vsebuje kratke teoretične osnove vsake izmed omenjenih metod, opis optimalnih pogojev pri njihovi uporabi za določitev vsebnosti vitaminov v različnih oblikah prehranskih dopolnil in najbolj pogoste načine priprave takšnih vzorcev za analizo.

**Ključne besede:** vitamini, prehranska dopolnila, separacijske tehnike, voltometrija, spektrofotometrija

## **Review of methods for determination of vitamins in dietary supplements**

**Abstract:** Vitamins are of crucial importance for human health because insufficient intake can cause different diseases. When it's impossible to ensure a sufficient intake of vitamins through the diet, people use dietary supplements. Usage of dietary supplements must be strictly controlled because the excessive intake of vitamins can also be harmful. For that reason, it's important that the amount of vitamins stated on the label of dietary supplement matches the actual amount. To control whether that's true, we need accurate, reliable and fast analytical methods. Some of the most used ones are liquid chromatography, capillary electrophoresis, voltammetry, spectrofluorimetry and supercritical fluid chromatography. This thesis contains short theoretical background for each of these methods, optimal conditions when using them for determination of vitamins in different types of dietary supplements and the most common ways of preparing such samples for the analysis.

**Keywords:** vitamins, dietary supplements, separation techniques, voltammetry, spectrofluorimetry





# Kazalo

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Uvod</b> .....                                 | <b>1</b>  |
| 1.1      | Vitamini topni v vodi.....                        | 1         |
| 1.2      | Vitamini topni v maščobah.....                    | 3         |
| <b>2</b> | <b>Namen dela</b> .....                           | <b>5</b>  |
| <b>3</b> | <b>Materiali in metode</b> .....                  | <b>7</b>  |
| 3.1      | Priprava vzorca .....                             | 7         |
| 3.1.1    | Ekstrakcija tekoče-tekoče.....                    | 7         |
| 3.1.2    | Disperzivna mikro-ekstrakcija tekoče-tekoče ..... | 7         |
| 3.1.3    | Ekstrakcija na trdno fazo .....                   | 9         |
| 3.1.4    | Superkritična tekočinska ekstrakcija .....        | 9         |
| 3.2      | Metode.....                                       | 10        |
| 3.2.1    | Mikrobiološka analiza .....                       | 10        |
| 3.2.2    | Kapilarna elektroforeza .....                     | 10        |
| 3.2.3    | Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti..... | 16        |
| 3.2.4    | Superkritična tekočinska kromatografija.....      | 20        |
| 3.2.5    | Voltometrija .....                                | 20        |
| 3.2.6    | Spektrofluorimetrija .....                        | 23        |
| <b>4</b> | <b>Zaključek</b> .....                            | <b>27</b> |
| <b>5</b> | <b>Literatura</b> .....                           | <b>29</b> |

## Seznam uporabljenih kratic in simbolov

|              |  |
|--------------|--|
| <b>CE</b>    | kapilarna elektroforeza ( <i>angl.</i> Capillary Electrophoresis)  |
| <b>CZE</b>   | kapilarna conska elektroforeza ( <i>angl.</i> Capillary Zone Electrophoresis)                                |
| <b>DLLME</b> | disperzivna mikro-ekstrakcija tekoče-tekoče ( <i>angl.</i> Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction)        |
| <b>ESI</b>   | ionizacija z rasprševanjem v elekričnem polju ( <i>angl.</i> ElectroSpray Ionization)                        |
| <b>FA</b>    | folna kislina ( <i>angl.</i> Folic Acid)   |
| <b>FID</b>   | plamensko ionizacijski detektor ( <i>angl.</i> Flame Ionization Detector)                                    |
| <b>HPLC</b>  | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <i>angl.</i> High-Performance Liquid Chromatography)          |
| <b>LLE</b>   | ekstrakcija tekoče-tekoče ( <i>angl.</i> Liquid-Liquid Extraction)   |
| <b>MEEKC</b> | mikroemulzijska elektrokinetična kromatografija ( <i>angl.</i> MicroEmulsion ElectroKinetic Chromatrography) |
| <b>MEKC</b>  | micelna elektrokinetična kromatografija ( <i>angl.</i> Micellar ElectroKinetic Chromatography)               |
| <b>MS</b>    | masna spektrometrija ( <i>angl.</i> Mass Spectrometry)   |
| <b>RFI</b>   | relativna intenziteta fluorescencence ( <i>angl.</i> Relative Fluorescence Intensity)                        |
| <b>SFC</b>   | superkritična tekočinska kromatografija ( <i>angl.</i> Supercritical Fluid Chromatography)                   |
| <b>SFE</b>   | superkritična tekočinska ekstrakcija ( <i>angl.</i> Supercritical Fluid Extraction)                          |
| <b>SPE</b>   | ekstrakcija na trdno fazo ( <i>angl.</i> Solid Phase Extraction)   |

# 1 Uvod

Vitamini so organske spojine, ki so bistvenega pomena za človeško zdravje. Delimo jih lahko v dve skupini in sicer na vitamine topne v vodi in vitamine topne v maščobah. Vitamini topni v vodi so vitamini B kompleksa in vitamin C, medtem ko so v maščobah topni vitamini A, D, E in K <sup>[1]</sup>. Človeški organizem lahko določene vitamine sintetizira v majhnih količinah, drugih pa sploh ne more. Zaradi tega je nujen vnos vitaminov skozi prehrano. Priporočene dnevne vnose vitaminov določa in redno posodablja Nacionalni inštitut za javno zdravje Republike Slovenije <sup>[2]</sup>. Prekomerni vnos vitaminov topnih v vodi je zelo redko škodljiv, saj se odvečne količine vitaminov topijo v vodi in se iz telesa hitro izločijo. Po drugi strani, prekomerni vnos vitaminov topnih v maščobah lahko povzroči hujše težave, saj se odvečne količine vitaminov skladiščijo v jetrih in maščobnih tkivih in se iz telesa izločajo bolj počasi <sup>[1]</sup>. Hude težave lahko nastanejo tudi v primeru pomanjkanja določenega vitamina. Vzrok pomanjkanja je lahko nezadosten vnos vitamina, kar je v razvitih državah vse bolj redko, ali določena bolezen, ki preprečuje učinkovito absorpcijo le tega. V primerih, kadar ni mogoče zagotoviti vnosa zadostnih količin vitaminov skozi prehrano, uporabljajo ljudje prehranska dopolnila. Glede na potencialne posledice zapuščanja območja priporočenih količin vnosa vitaminov je zelo pomembno, da imajo ljudje pri uporabi prehranskih dopolnil natančne informacije o vsebnosti različnih vitaminov. Zato je potrebno imeti čim bolj natančne in zanesljive analizne metode za določitev vitaminov v prehranskih dopolnilih <sup>[3]</sup>.

## 1.1 Vitamini topni v vodi

Funkcije in posledice pomanjkanja vitaminov topnih v vodi so prikazani v Tabeli 1 <sup>[4]</sup>.

Tabela 1: Funkcije in posledice pomanjkanja vitaminov topnih v vodi

| <i>Naziv vitamina</i> | <i>Funkcija vitamina</i>   | <i>Pomanjkanje</i>          |
|-----------------------|--|-----------------------------|
| <i>B1 (tiamin)</i>    | Tiamin tvori koencim tiamin pirofosfat (TPP), ki sodeluje v metaboličnih poteh in je pomemben v regulaciji funkcij živčnega sistema in srca. | Povzroča bolezen beri-beri. |

|   |  |  |
|---|--|--|
| <i>B2<br/>(riboflavin)</i>              | Riboflavin tvori koencima flavin adenin dinukleotid (FAD) in flavin adenin mononukleotid (FAM), ki sodelujeta v tvorbi energije in je pomemben za kožo.  | Pomanjkanje tega vitamina je redko. Lahko povzroči težave s kožo.  |
| <i>B3 (niacin)</i>                      | Niacin tvori koencima nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) in fosfat nikotinamid adenin dinukleotid (NADP), ki sodelujeta v tvorbi energije in je pomemben za presnovo hrane, živčni sistem in kožo. | Povzroča bolezen pelagra.  |
| <i>B5<br/>(pantotenska<br/>kislina)</i> | Pantotenska kislina tvori koencim A (CoA) in acil prenašalni protein (ACP). Sodeluje v reakcijah sinteze lipidov, steroidnih hormonov in hemoglobina.  | Pomanjkanje tega vitamina je redko. Simptomi vključujejo utrujenost, slabost in depresijo.   |
| <i>B6<br/>(pirodoksin)</i>              | Aktivna oblika pirodoksina je pirodoksal fosfat, ki je del encimov, ki sodelujejo v metabolizmu aminokislin. Igra vlogo v tvorbi eritrocitov.  | Pomanjkanje je redko, saj se za razliko od ostalih vitaminov topnih v vodi, določena količina pirodoksina hrani v mišičnih tkivih. |
| <i>B9 (folna<br/>kislina)</i>           | Folna kislina je donor metilnih skupin in sodeluje v sintezi DNA. Aktivna oblika folne kisline je tetrahidrofolna kislina.   | Povzroča megaloblastno anemijo.  |
| <i>B12<br/>(kobalamin)</i>              | Kobalamin pomaga pri sintezi novih celic in znižuje ravni homocisteina.  | Povzroča megaloblastno anemijo.  |
| <i>C<br/>(askorbinska<br/>kislina)</i>  | Askorbinska kislina je antioksidant. Pomaga pri absorpciji železa. Pomembna je tudi za imunski sistem in sintezo kolagena.   | Povzroča skorbut.  |

## 1.2 Vitamini topni v maščobah

Funkcije in posledice pomanjkanja vitaminov topnih v maščobah so prikazani v Tabeli 2 [4].

Tabela 2: Funkcije in posledice pomanjkanja vitaminov topnih v maščobah

| <i>Naziv vitamina</i> | <i>Funkcija vitamina</i>   | <i>Pomanjkanje</i>  |
|-----------------------|--|---|
| <i>A</i>              | Pojavlja se v oblikah retinola (v živilih živalskega izvora) in karotenoidov (v živilih rastlinskega izvora). Zelo pomemben je za vid, spodbuja rast kosti in ima vlogo antioksidanta.   | Povzroči lahko nočno ali popolno slepoto.   |
| <i>D</i>              | Pojavlja se v dveh oblikah, kot holekalciferol in ergokalciferol. Aktivna oblika vitamina D je hormon kalcitriol, ki se lahko sintetizira iz holesterola pri zadostni izpostavljenosti UV svetlobi. Igra pomembno vlogo pri homeostazi kalcija in fosforja s čemer vpliva na jakost kosti. | Pri otrocih povzroči rahitis, pri odraslih pa osteomalacijo.  |
| <i>E</i>              | Vitamin E je glavni antioksidant topen v maščobah v telesu. Nahaja se v bioloških membranah, kjer ščiti polinenasičene maščobne kisline pred oksidativno degradacijo s prostimi radikali.  | Povzroči lahko malabsorpcijo maščob in hemolizo eritrocitov zaradi oksidacije polinenasičenih maščobnih kislin.   |
| <i>K (filokinon)</i>  | Vitamin K je nujen za aktivacijo proteinov, ki sodelujejo v strjevanju krvi. Igra vlogo tudi pri sintezi proteinov, ki sodelujejo v formaciji kosti.   | Pomanjkanje tega vitamina je redko. Povzročijo ga lahko določene snovi, kot so antibiotiki in antikoagulantni. Glavni simptom je krvavitev, ki lahko povzroči hudo anemijo. |



## **2 Namen dela**

Namen tega diplomskega dela je podati podroben pregled sodobnih in učinkovitih metod analize prehranskih dopolnil v namen določanja vsebnosti vitaminov.





## 3 Materiali in metode

### 3.1 Priprava vzorca

Ekstrakcija in čiščenje vzorca sta ključnega pomena za vsako analizno metodo. S pripravo vzorcev lahko različne snovi ločimo s čemer lahko izboljšamo performance (selektivnost, občutljivost, natančnost) analiznih metod. Soxhlet ekstrakcija in segrevanje pod refluksom sta dolgo časa bili najbolj uporabljeni metodi za pripravo vzorca za določanje vitaminov. Metodi sta časovno zahtevni in zahtevata uporabo večje količine organskih topil. V zadnjih časih se je pojavilo nekaj bolj učinkovitih in zelenih metod, zaradi česar se omenjeni metodi vse bolj opuščata <sup>[5]</sup>. V nadaljevanju je opisano nekaj trenutno najbolj uporabljenih načinov priprave vzorca.

#### 3.1.1 Ekstrakcija tekoče-tekoče

Ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE) je najbolj tipična in znana metoda. Uporabljeno topilo mora biti takšno, da se slabo meša z vzorcem. To pomeni, da se trdni vzorci v topilu ne smejo raztapljati, tekoči se pa ne smejo z njim mešati. Učinkovitost ekstrakcije lahko povečamo, če zmanjšamo topnost analitov v vzorcu (npr. s spremembo pH) <sup>[6]</sup>.

Momenbeik in sodelavci <sup>[7]</sup> opisujejo najbolj tipičen način uporabe LLE. Metodo so uporabili za pripravo vzorca sirupa za namen analize vitaminov topnih v maščobah. V epruveto so dali 5 mL multivitaminskega sirupa, nato so dodali 0,25 g askorbinske kisline, 2 mL dimetilsulfoksida in 3 mL raztopine n-heksana in dietil etra (9:1 v/v) ter jo postavili v vortex stresalnik za 5 min in centrifugirali za 5 min na 3000 rpm. Po celotnem postopku so zbrali zgornjo organsko plast v 25 mL bučko. Po petkratni ekstrakciji so organske faze združili, posušili na 30 °C in ponovno raztopili v etanolu.

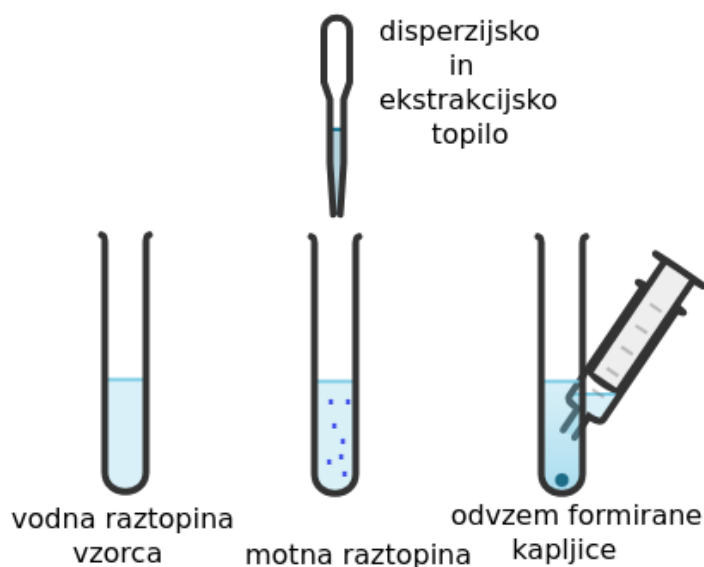
Zgornja metoda je bila razvita za tekočinsko kromatografijo.

LLE je bolj uporabljena pri ekstrakciji vitaminov topnih v maščobah. Največja pomanjkljivost te metode je potreba po uporabi topil, ki so toksična in hlapna <sup>[5]</sup>.

#### 3.1.2 Disperzivna mikro-ekstrakcija tekoče-tekoče

Disperzivna mikro-ekstrakcija tekoče-tekoče (DLLME) je ena izmed mnogih mikroekstrakcijskih metod. Izvedba metode vključuje hitro injiciranje mešanice ekstrakcijskega in disperzijskega topila v vodno raztopino vzorca. Iz tega nastane

motna raztopina, ki jo formirajo kapljice ekstrakcijskega topila dispergirane v vodni raztopini. Nastajanje motne raztopine omogoča hiter prehod analita iz vodne v ekstrakcijsko fazo. To se lahko zgodi zaradi velike površine ogromnega števila kapljic. Motno raztopino nato centrifugiramo. Na dnu konične epruvete se sedimentira ekstrakcijsko topilo, ki ga nato lahko zberemo z brizgo <sup>[8]</sup>. Princip delovanja je prikazan na Sliki 1.



Slika 1: princip delovanja DLLME

Za uspešno izvedbo metode mora biti izpolnjeno nekaj pogojev. Ekstrakcijsko topilo se ne sme mešati z vodo, se mora mešati z disperzijskim topilom in mora imeti visoko afiniteto do analita. Običajno se uporabljajo ekstrakcijska topila z gostoto višjo od gostote vode, saj se s tem doseže formiranje sedimenta na dnu konične epruvete. Disperzijsko topilo se mora mešati tako z ekstrakcijskim topilom kot z vodo. Priporočljivo je, da je izbrano ekstrakcijsko topilo kompatibilno z analizno metodo, ki bo uporabljena. V nasprotnem primeru bo potrebno po izvedbi DLLME ekstrakcijsko topilo izpareti in analit ponovno raztopiti v primernem topilu <sup>[8]</sup>.

Zeeb in sodelavci <sup>[9]</sup> so razvili metodo za pripravo vzorca za spektrofluorimetrično analizo vitamina B1 v tabletah. V konično epruveto so dali 10 mL raztopine vzorca (pH 13). Dodali so 1 mL raztopine ferocianida (0,01 M) in dobro premešali. V raztopino so hitro vstavili 0,5 mL acetona (disperzijsko topilo), ki mu je dodano 122  $\mu$ L kloroforma

(ekstrakcijsko topilo). Nastala je motna raztopina, ki so jo centrifugirali za 2 min na 4000 rpm. Dispergirane kapljice kloroforma so po tem postopku bile sedimentirane na dnu epruvete. Sediment so zbrali in dali v analizator. Dobljeni izkoristek je bil 69,2 %.

Prednost te metode je predvsem v tem, da je okolju prijazna in ne potrebuje uporabe dragih topil. DLLME je v primerjavi z LLE bolj hitra, vendar je izkoristek običajno nižji [5].

### **3.1.3 Ekstrakcija na trdno fazo**

Ekstrakcija na trdno fazo (SPE) je danes ena najbolj uporabljenih metod priprave vzorcev vitaminov. Tekoče vzorce lahko pri ekstrakciji začnemo uporabljati takoj, vendar moramo pri trdnih vzorcih analite najprej ekstrahirati iz matrice vzorca z uporabo organskih topil, nato pa lahko uporabimo SPE [5].

V postopku SPE uporabljamo za ekstrakcijo trdne faze, ki jih običajno naneseemo v ekstrakcijske kolone. Pred uporabo moramo kolone kondicionirati, nato na njih naneseemo vzorec. Pri prehodu vzorca skozi kolono, ostanejo analiti na trdni fazi. Kolono speremo, s čemer iz trdne faze odstranimo neželene komponente oz. nečistoče, nato analit eluiramo, pri čemer mora imeti analit večjo afiniteto do eluenta kot do trdne faze. Eluat uporabimo za nadaljnjo analizo [10].

Rudenko in soavtorji [11] so opisali metodo priprave vzorca za določitev vitaminov topnih v vodi (B in C) s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Najboljši izkoristek so dobili z uporabo C<sub>18</sub> adsorbenta, ki so ga sprali s 5 mL metanola in 5 mL destilirane vode. Na kolono so nanegli 3 mL vzorca. Adsorbent so potem sprali z 1 mL destilirane vode. Vitamine so desorbirali s 3 mL metanola. Dobljeni eluat so po nekaj ponovitvah analizirali.

SPE ima v primerjavi z drugimi metodami nekaj prednosti kot je popolna ločitev faz, visok izkoristek in majhna poraba organskih topil. SPE je lahko včasih komplicirana za izvedbo, vendar je prednost v tem da lahko hkrati pripravljamo več vzorcev, kar nam lahko prihrani dosti časa [5].

### **3.1.4 Superkritična tekočinska ekstrakcija**

Pri superkritični tekočinski ekstrakciji (SFE) se kot ekstrakcijski medij uporablja superkritična tekočina. To je substanca, ki obstaja nad kritično temperaturo in tlakom. Superkritična tekočina ima fizične lastnosti tako tekočine kot plina, kar pomeni da ima gostoto tekočine, hkrati pa visoko difuzivnost in nizko viskoznost plina. Med

superkritičnimi tekočinami se najbolj pogosto uporablja CO<sub>2</sub>. Razlog za to je v tem, da je kritične pogoje CO<sub>2</sub> relativno enostavno doseči (kritična temperatura je 31,1 °C, kritični tlak pa 73,9 bar). Poleg tega, CO<sub>2</sub> ni toksičen in vnetljiv ter se smatra za varnega za uporabo v prehranski industriji. Zaradi naštetih lastnosti CO<sub>2</sub> in zaradi nepotrebnosti uporabe topil, se smatra SFE za zeleno ekstrakcijsko metodo [12].

Prednost metode je v tem, da lahko ekstrakcijsko moč superkritične tekočine spreminjamo z modificiranjem temperature in tlaka. Pomanjkljivost uporabe CO<sub>2</sub> je v tem, da je nepolaren in je zato njegova sposobnost da raztopi in ekstrahira polarne spojine omejena. To pomanjkljivost lahko delno odpravimo z dodajanjem polarne topila kot so alkoholi, diklorometan in acetonitril [12].

Salvador in soavtorji [13] so opisali metodo za ekstrakcijo vitamina E iz prehranskih dopolnil v obliki tablet. Zmlet in homogeniziran vzorec (0,5-1,0 g) so ekstrahirali s SFE z uporabo CO<sub>2</sub> s konstantnim pretokom (2 mL/min). Postopek je trajal 30 min. Tlak je bil 400 atm, temperatura pa 60 °C.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Mikrobiološka analiza

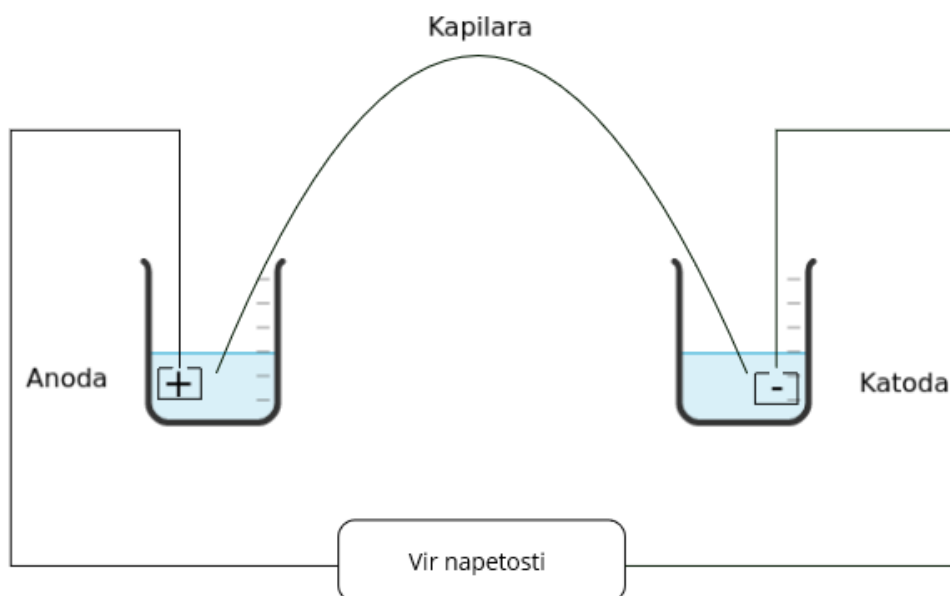
Mikrobiološka analiza temelji na dejstvu, da obstajajo mikroorganizmi, ki za rast potrebujejo določene vitamine. Če mikroorganizmu v ustreznem mediju dodamo vzorec z vitaminom, bo le ta rasel, dokler ne potroši celotne zaloge vitamina. To rast lahko izmerimo in na ta način določimo količino vitamina v vzorcu. Rast lahko izmerimo tako, da s spektrofotometrom izmerimo motnost ali titiramo z NaOH [14].

Prednost metode je v tem, da je selektivna. Pomanjkljivost je predvsem v časovni zahtevnosti, saj inkubacija traja 24-48 ur.

### 3.2.2 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (CE) je analizna tehnika, ki temelji na uporabi električne napetosti za separacijo ionov glede na njihovo elektroforezno mobilnost. Navadno aparaturo CE sestavlja vir visoke napetosti, sistem za vstavljanje vzorca, kapilara, detektor in izhodna naprava. Določeni instrumenti imajo tudi napravo za kontrolo temperature, ki zagotavlja boljšo ponovljivost. Obe strani vira napetosti sta povezani na elektrodo. Kapilara je narejena iz kvarčnega stekla in prevlečena s polimidom. Vsaka elektroda se nahaja v čaši z elektrolitom. Vsak konec kapilare je potopljen v eno izmed

čaj. Pred nanosom vzorca mora biti kapilara sprana z elektrolitom. Najbolj pogosto se uporablja UV-Vis detektor. Tik pred koncem strani kjer je potopljena v čašo s katodo, ima kapilara majhno okno, kar dovoli prehod UV-Vis svetlobe skozi analit in merjenje absorbanca [15]. Shema aparature je prikazana na Sliki 2.



Slika 2: Shema aparature za kapilarno elektroforezo

Elektroforezna mobilnost je odvisna od naboja molekule, viskoznosti nosilnega elektrolita in radija molekule. Če sta dva iona enake velikosti, se skozi kapilaro hitreje premika tisti, ki ima večji naboj. Če imata dva iona isti naboj, se hitreje premika manjši ion, ker ima manjše trenje. Hitrost gibanja ionov je tudi sorazmerna z jakostjo električnega polja [15].

Obstaja več različnih vrst kapilarne elektroforeze. V analizi vitaminov v prehranskih dopolnilih sta najbolj uporabljeni kapilarna conska elektroforeza in micelna elektrokinetična kromatografija [15].

**Kapilarna conska elektroforeza (CZE)** je na splošno najbolj pogosto uporabljena metoda kapilarne elektroforeze. Separacija temelji na razlikah v elektroforezni mobilnosti. Če je pH elektrolita v kapilari več kot 3, SiOH skupine postanejo deprotonirane in preidejo v SiO<sup>-</sup> ione. Takrat postanejo stene kapilare negativno nabite

in začnejo privlačiti pozitivno nabite ione. To povzroči nastanek dveh plasti pozitivno nabitih ionov in sicer stacionarne plasti, kjer se ioni ne premikajo in difuzne plasti, kjer se ioni lahko premikajo. Med plastema pri eni in drugi steni se nahaja raztopina z enakim številom kationov in anionov. Po vklopitvi vira napetosti se začnejo ioni iz difuzne plasti premikati proti katodi, s čemer povzročijo t. i. elektroosmozni tok. Elektroosmozni tok povzroči, da se tudi raztopina v sredini začne premikati proti katodi. Proti katodi se začnejo premikati tudi anioni, čeprav jih sicer privlači anoda. Med potovanjem pride do separacije. Najprej se eluirajo kationi z večjimi razmerji naboja in radija, potem kationi z manjšimi razmerji, nato nevtralne zvrsti, potem anioni z manjšimi razmerji naboja in radija ter na koncu anioni z večjimi razmerji naboja in radija. Pri tej metodi lahko kontroliramo hitrost elektroosmoznega toka s spremembo pH, viskoznosti elektrolita, dielektrične konstante elektrolita, ionske moči elektrolita ali napetosti <sup>[15]</sup>.

**Micelna elektrokinetična kromatografija (MEKC)** je metoda s katero lahko dosežemo separacijo nevtralnih analitov, ki s tradicionalno kapilarno elektroforezo ni možna. Kadar raztopini, ki se nahaja znotraj kapilare dodamo surfaktant v koncentraciji, ki presega kritično micelno koncentracijo, se začnejo ustvarjati sferični agregati, ki se imenujejo miceli. Površina micelov je negativno nabita. Zaradi elektroosmoznega toka, tudi miceli potujejo proti katodi, vendar z manjšo hitrostjo. Hidrofobne komponente bodo med potovanjem proti katodi v micelih preživele več časa kot hidrofilne, s čemer se doseže separacija. Poleg že naštetih načinov, pri MEKC lahko na elektroosmozni tok vplivamo tudi s spremembo koncentracije surfaktanta <sup>[15]</sup>.

Razširitev te metode je **mikroemulzijska elektrokinetična kromatografija (MEEKC)**, kjer se separacija namesto z miceli doseže s kapljicami mikroemulzije.

V članku Ribeira in sodelavcev <sup>[16]</sup> je opisana metoda za določitev askorbinske kisline (vitamin C) v šumečih tabletah z uporabo CZE. Pred analizo je vzorec raztopljen in razredčen v destilirani vodi ter filtriran skozi nitrocelulozni membranski filter s porami velikosti 0,45 µm. Uporabili so kapilaro iz kvarčnega stekla dolžine 0,5 m z dvema detektorjema prevodnosti (C<sup>4</sup>D) postavljenima 10 cm od vsakega konca kapilare. Pred uporabo so kapilaro spirali z deionizirano vodo za 10 min, 0,1 M NaOH za 10 min, spet z deionizirano vodo za 10 min in na koncu z elektrolitom za 10 min. Vzorec je injiciran hidrodinamično 1,5 sekund s tlakom 25 kPa. Napetost je bila 25 kV. Elektrolit (pH 6,1) je bil sestavljen iz 30 mmol/L 2-(morfolin-4-il)etan-1-sulfonske kisline in 30 mmol/L histidina. Čas potovanja skozi kapilaro, območje linearnosti, koeficient determinacije, meja zaznave in kvantifikacije, ponovljivost in izkoristek pri optimalnih pogojih so

prikazani v Tabeli 3. Metoda dovoli analizo 40 vzorcev na uro. Metoda je optimizirana za hkratno določitev askorbinske kisline in cinka.

Tabela 3: Čas potovanja skozi kapilaro, območje linearnosti, koeficient determinacije, meja zaznave in kvantifikacije, ponovljivost in izkoristek pri optimalnih pogojih za določitev vitamina C z uporabo CZE

|  |            |
|--|------------|
| <i>Čas potovanja skozi kapilaro (s)</i>        | 75,0 ± 1,6 |
| <i>Območje linearnosti (μmol/L)</i>            | 5550-14800 |
| <i>Koeficient determinacije</i>                | 0,999      |
| <i>Meja zaznave (μmol/L)</i>                   | 20         |
| <i>Meja kvantifikacije (μmol/L)</i>            | 66         |
| <i>RSD znotraj istega dneva (10 ponovitev)</i> | 3,5%       |
| <i>RSD v različnih dnevih (3 ponovitve)</i>    | 6,1%       |
| <i>Izkoristek</i>                              | 100%       |

Metoda opisana v članku da Silve in sodelavcev <sup>[17]</sup> je prva metoda, s katero je dosežena hkratna določitev vseh vitaminov topnih v vodi. Za določitev so uporabili MEKC s kapilaro dolžine 0,6 m in notranjega premera 50 μm. Kapilaro so pred analizo tretirali z 1,0 M NaOH za 10 min, potem z 0,1 M NaOH za 10 min in na koncu za 5 min z Milli-Q vodo pod tlakom 414 kPa. Pred vsakim injiciranjem vzorca so kapilaro spirali še z 0,1 M NaOH za 6 min, 2 min z Milli-Q vodo in za 8 min z elektrolitom pod tlakom 138 kPa. Vzorec so tokrat bile multivitaminske tablete. Tablete so pred analizo raztopili v elektrolitu in dali v ultrazvočno kopel za 5 min. Pri optimalnih pogojih so kot elektrolit uporabili 0,02 M boratni pufer s pH 8,7. Kot surfaktant so uporabili 2,0 % (w/v) natrijev dodecilsulfat. Elektrolit so modificirali z 10 % (v/v) etanolom. Dodajanje etanola je bilo potrebno, saj zaradi velike afinitete do vodne faze, vseh vitaminov ni bilo mogoče ločiti v boratnem pufru. Dodajanje etanola je prispevalo k večji selektivnosti in omogočilo separacijo vitaminov, vendar je povečalo viskoznost in s tem zmanjšalo elektroosmozni tok. To je podaljšalo čase potovanja vzorca skozi kapilaro. Vzorce so injicirali hidrodinamično za 8 s pod tlakom 5,5 kPa. Napetost je bila 28 kV in temperatura 25 °C.

Uporabili so UV detektor, meritve so opravljali na valovni dolžini 214 nm. Časi potovanja skozi kapilaro, meje zaznave in kvantifikacije za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih so prikazani v Tabeli 4.

Tabela 4: Časi potovanja skozi kapilaro, meje zaznave in kvantifikacije za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih za določitev vitaminov topnih v vodi z uporabo MEKC

| <i>Vitamin</i> | <i>Čas potovanja skozi kapilaro (min)</i> | <i>Meja zaznave (mg/L)</i> | <i>Meja kvantifikacije (mg/L)</i> |
|----------------|---|----------------------------|-----------------------------------|
| <i>B12</i>     | 6,81                                      | 0,32                       | 0,97                              |
| <i>B2</i>      | 8,13                                      | 0,27                       | 0,83                              |
| <i>B6</i>      | 8,80                                      | 0,20                       | 0,62                              |
| <i>C</i>       | 11,10                                     | 4,98                       | 15,09                             |
| <i>B5</i>      | 11,34                                     | 4,92                       | 14,91                             |
| <i>B3</i>      | 13,85                                     | 0,30                       | 0,90                              |
| <i>B1</i>      | 14,82                                     | 0,86                       | 2,60                              |
| <i>B9</i>      | 16,84                                     | 0,28                       | 0,83                              |

V članku Yina in soavtorjev <sup>[18]</sup> je opisana metoda hkratne določitve vitaminov topnih v vodi in vitaminov topnih v maščobah (A, E in D3) z uporabo MEEKC. Določitev vitaminov topnih v maščobah je z uporabo MEKC zelo težka, ker imajo le ti veliko afiniteto do micelov, kar povzroča dolge čase potovanja skozi kapilaro. Bolj uspešna metoda v tem primeru je MEEKC. Uporabili so kapilaro iz kvarčnega stekla brez prevleke dolžine 0,66 m in notranjega premera 75 µm. Optimalna napetost je bila 25 kV, temperatura pa 25 °C. Pred uporabo so kapilaro spirali z 1 M NaOH za 10 min, 0,1 M NaOH za 10 min in vodo za 10 min. Pred injiciranjem vsakega vzorca so jo dodatno spirali z vodo za 3 min in z mikroemulzijo za 3 min. Vzorec so injicirali hidrodinamično pod tlakom 2,76 kPa za 4 s. Uporabili so mikroemulzijo sestavljeno iz 20 mM boraksa (elektrolit), 1,2 % (w/w) natrijevega dodecilsulfata (surfaktant), 21 % (v/v) 1-butanola (kosurfaktant), 18 % (v/v) acetonitrila (modifikator) in 0,8 % (w/w) n-



heksana (oljna faza). Vloga kosurfaktana je stabilizacija mikroemulzije, modifikator pa je povečal selektivnost metode. Za detekcijo so uporabili detektor na diodni niz, meritve so opravljali na valovni dolžini 205 nm. Vzorec multivitaminske tablete so zmelili in ekstrahirali s 50 mL mikroemulzije v ultrazvočni kopeli za 15 min in filtrirali skozi najlonski filter s porami velikosti 0,45  $\mu\text{m}$ . Metoda je dosegla separacijo vseh vitaminov, vendar določenih vitaminov v realnem vzorcu ni zaznala (A, D3, B5, B12), bodisi zaradi premajhne koncentracije vitamina ali previsoke meje zaznave. Območja linearnosti, meje zaznave, ponovljivosti in izkoristki za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih so prikazani v Tabeli 5.

Tabela 5: Območja linearnosti, meje zaznave, ponovljivosti in izkoristki za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih za določitev vitaminov topnih v vodi in vitaminov topnih v maščobah z uporabo MEEKC

| <i>Vitamin</i> | <i>Območje linearnosti (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i> | <i>Meja zaznave (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i> | <i>RSD (%)</i> | <i>Izkoristek (%)</i> |
|----------------|--|---|----------------|-----------------------|
| <i>B1</i>      | 5-500  | 0,5   | 0,7            | 103                   |
| <i>B12</i>     | 5-500  | 0,3   | /              | 104                   |
| <i>A</i>       | 20-1000  | 12  | /              | 101                   |
| <i>B2</i>      | 5-200  | 0,5   | 1,0            | 93,0                  |
| <i>D3</i>      | 5-1000   | 0,7   | /              | 103                   |
| <i>E</i>       | 5-1000   | 0,3   | 1,5            | 97,0                  |
| <i>B6</i>      | 5-800  | 0,5   | 1,8            | 102                   |
| <i>B3</i>      | 5-500  | 1,6   | 1,6            | 102                   |
| <i>C</i>       | 5-1000   | 2,0   | 5,2            | 105                   |
| <i>B9</i>      | 10-500   | 4,1   | 0,1            | 95,0                  |
| <i>B5</i>      | 5-500  | 0,4   | /              | 103                   |

### 3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je separacijska tehnika, ki temelji na ločevanju komponent na podlagi njihovega različnega porazdeljevanja med stacionarno in tekočo mobilno fazo. Stacionarna faza je običajno nanesa na delce polnila v kromatografskih kolonah. Osnova stacionarne faze je običajno silikagel, ki je polaren (normalna faza). Silikagel je lahko tudi modificiran, da bo bolj nepolaren (reverzna faza). Pri normalni fazi je mobilna faza običajno mešanica organskih topil, pri reverzni pa mešanica vode ali pufrih raztopin s topili, ki se z vodo mešajo. Med analizo lahko sestavo mobilne faze spreminjamo (gradientna elucija) ali jo ves čas analize ohranjamo enako (izokraska elucija). Aparatura HPLC je prikazana na Sliki 3. Sestavljena je iz rezervoarja, v katerem se nahaja mobilna faza, črpalke, ki črpa mobilno fazo skozi kolono, injektorja za vzorec, kromatografske kolone in detektorja [19].



Slika 3: Shema aparature HPLC

Nelson in soavtorji [20] so razvili dve različni metodi tekočinske kromatografije/tandemske masne spektroskopije (HPLC/MS/MS) z izotopskim redčenjem za kvantitativno določitev folne kisline (FA) v multivitaminskih tabletah. Prva metoda uporablja ekstrakcijo na vodno/organski osnovi z detekcijo protoniranih  $[M+H]^+$  FA molekul, druga metoda pa uporablja ekstrakcijo na vodni osnovi z detekcijo deprotoniranih  $[M-H]^-$  FA molekul. Metoda z detekcijo pozitivnih ionov: Vzorec multivitaminskih tablet so prvo zmleli, potem so v 15 mL epruveto za centrifugo dodali 300 mg vzorca in 500  $\mu\text{L}$   $[^{13}\text{C}_5]$ -FA standarda (200  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 10 mL 0,1% ditiotreitola in 50/50 raztopine metanola in vode (pH 7,5). Epruveto so mešali 30 min nato centrifugirali 10 min pri 3000xg. Supernatant so prenesli v čisto epruveto in so ga filtrirali skozi regenerirani celulozni filter s porami velikosti 0,45  $\mu\text{m}$ . Volumen injiciranja je bil 10  $\mu\text{L}$ . Poskusi so bili izvedeni s trojnim kvadrupolnim MS/MS sistemom z uporabo ionizacije z razprševanjem v električnem polju (ESI). Vzorce so analizirali z uporabo Supelco Discovery HS-F5 (4,6mm×150 mm, premer delcev 5 $\mu\text{m}$ )

kolone in predkolone HS-F5 (3mm×20 mm, premer delcev 5 µm). Mobilna faza je bila sestavljena iz mobilne faze A: 1% raztopina mravljične kisline v vodi in mobilne faze B: 1% raztopina mravljične kisline v metanolu. Za separacijo so uporabili gradientno elucijo (0 min, 60 % A/40 % B; 10,0 min, 60 % A/40 % B; 10,1 min, 0 % A/100 % B; 12,0 min, 0 % A/100 % B; 12,1 min, 60 % A/40 % B; 15,0 min, 60 % A:40 % B (v/v)). Pretok mobilne faze je bil 500 µL/min. Metoda z detekcijo negativnih ionov je bila identična prvi opisani metodi razen tega, da so ekstrakcijo izvedli z 10 mL 0,3% raztopine amonijevega hidroksida (pH 11,1) in so uporabili drugačno mobilno fazo, sestavljeno iz mobilnih faz A: 0,1% raztopina očetne kisline v vodi in B: 0,1% raztopina očetne kisline v metanolu (0 min, 55 % A/45 % B; 10,0 min, 55 % A/45 % B; 10,1 min, 0 % A/100 % B; 12,0 min, 0 % A/100 % B; 12,1 min, 55 % A/45 % B; 15,0 min, 55 % A/45 % B (v/v)). Natančnost merjenja FA za obe metodi je bila  $\geq 95\%$  in RSD 1%. Območje linearnosti, meja zaznave in meja kvantifikacije za obe metodi pri optimalnih pogojih so prikazani v Tabeli 6.

Tabela 6: Območje linearnosti, meja zaznave in meja kvantifikacije za obe metodi pri optimalnih pogojih za določitev folne kisline z uporabo HPLC/MS/MS

| <i>Metoda</i>               | <i>Območje linearnosti (ng)</i> | <i>Meja zaznave (ng)</i> | <i>Meja kvantifikacije (ng)</i> |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| <i>Pozitivna ionizacija</i> | 0,02-73                         | 0,02                     | 0,06                            |
| <i>Negativna ionizacija</i> | 0,02-293                        | 0,02                     | 0,06                            |

Bin Li in sodelavci [21] so uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z detektorjem na diodni niz za določitev vseh vitaminov topnih v vodi. Vzorce so analizirali z uporabo µBondapak C<sub>18</sub> kolone (300 x 63,9 mm, premer delcev 10 µm). Mobilna faza je bila sestavljena iz mobilne faze A: metanol in mobilne faze B: 0,1 M raztopina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru (pH 7,0). Separacijo so izvedli z gradientno elucijo (0-7,0 min, 10 % A/90 % B; 8,0-15,0 min, 40 % A/60 % B (v/v)). Pretok mobilne faze je bil 1,5 mL/min, volumen injiciranja 20 µL, temperatura analize 25°C. Kot detektor so uporabili detektor na diodni niz pri 265 nm za vitamin C, 234 nm za vitamin B1, 266 nm za vitamin B2, 324 nm za vitamin B6, 282 nm za vitamin B9, 361 nm za vitamin B12, 261

nm za B3 in 204 nm za B5. Vzorec tablet so raztopili v 50 mL fosfatnega pufru (pH 7,0). Pred analizo so ga filtrirali skozi membranski filter s porami velikosti 0,45 µm in razredčili 1/100 z raztopino fosfatnega pufru. Območja linearnosti, koeficienti determinacije, meje zaznave, ponovljivosti in izkoristki za posamezne vitamine so prikazani v Tabeli 7.

Tabela 7: Območja linearnosti, koeficienti determinacije, meje zaznave, ponovljivosti in izkoristki za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih za določitev vitaminov topnih v vodi z uporabo HPLC

| <i>Vitamin</i> | <i>Območje linearnosti (µg/mL)</i> | <i>Koeficient determinacije</i> | <i>Meja zaznave (µg/mL)</i> | <i>RSD (%)</i> | <i>Izkoristek (%)</i> |
|----------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| <i>B1</i>      | 1,0-50,0                           | 0,9994                          | 0,5                         | 1,8            | 98                    |
| <i>B2</i>      | 1,0-40,0                           | 0,9999                          | 0,2                         | 1,5            | 96                    |
| <i>B6</i>      | 0,5-30,0                           | 0,9992                          | 0,1                         | 2,1            | 102                   |
| <i>B12</i>     | 0,05-5,0                           | 0,9986                          | 0,02                        | 4,2            | 95                    |
| <i>C</i>       | 5,0-200,0                          | 0,9995                          | 0,1                         | 0,8            | 96                    |
| <i>B3</i>      | 10-200,0                           | 0,9993                          | 0,1                         | 1,2            | 99                    |
| <i>B5</i>      | 1,0-30,0                           | 0,9991                          | 0,5                         | 1,5            | 95                    |
| <i>B9</i>      | 0,5-20,0                           | 0,9994                          | 0,1                         | 2,1            | 97                    |

Moreno in sodelavci [22] so opisali metodo za hkratno določitev vitaminov topnih v vodi (B1, B2, B6 in B12) in vitaminov topnih v maščobah (A, E in D3) v multivitaminskih tabletah. Za pripravo vzorca so uporabili SPE, s katerim so dosegli separacijo vitaminov topnih v vodi in vitaminov topnih v maščobah in so vsako skupino analizirali posebej. Ekstrakcija je potekala na SPEC C<sub>18</sub> AR 3 mL koloni, ki so jo pred uporabo kondicionirali s 500 µL metanola in 500 µL deionizirane vode. Raztopino vzorca so razredčili z vodo 1:9 in dodali 1 mg/L standardne raztopine vitamina B12 (ta korak je bil potreben, ker realni vzorci vsebujejo manj vitamina B12 kot drugih vitaminov in bi po SPE količina B12 padla pod mejo zaznave). Skozi kolono so dali 200 µL alikvota

vzorca. Vitamini topni v vodi so šli skozi kolono in so jih zbrali v 10 mL bučko ter jo dopolnili do oznake z deionizirano vodo, vitamini topni v maščobah pa so ostali vezani na sorbent. Kolono so sprali s 3 mL deionizirane vode in 3 mL raztopine metanol:voda (6:4, v/v), da iz kolone odstranijo morebitne ostanke vitaminov topnih v vodi. Kolono so posušili, nato so eluirali vitamine topne v maščobah s 3 mL metanola in 3 mL kloroforma. Eluat so zbrali v 10 mL bučko in jo dopolnili do oznake z metanolom. Za določitev vitaminov topnih v vodi so uporabili reverzno-fazno Nova-Pack C<sub>18</sub> (150 x 3,9 mm, premer delcev 4 µm) kolono. Mobilna faza je bila sestavljena iz mobilne faze A: 0,05 M amonijev acetat in mobilne faze B: metanol. Separacija je potekala z gradientno elucijo (0-1,5 min, 92,5 % A/7,5 % B; 1,6 min, 84 % A/16 % B; 15 min, 70 % A/30 % B). Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min, volumen injiciranja vzorca pa 40 µL. Določitev je potekala na sobni temperaturi, detekcije so opravljene z UV-Vis spektrofotometrom na valovnih dolžinah 270 nm za B1, B2, in B6 ter 362 nm za B12. Za določitev vitaminov topnih v maščobah so uporabili isto kolono. Mobilna faza je bila sestavljena iz mobilne faze A: metanol in mobilne faze B: acetonitril. Separacija je potekala z izokratsko elucijo (95 % A/5 % B v/v). Pretok mobilne faze je bil 2 mL/min, volumen injiciranja vzorca pa 20 µL. Določitev je potekala na sobni temperaturi, detekcije so opravljene z UV-Vis spektrofotometrom na valovni dolžini 285 nm. Območja linearnosti, koeficienti determinacije, meje zaznave in ponovljivosti za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih so prikazani v Tabeli 8. Izkoristki na realnem vzorcu so bili 78 - 116 %.

Tabela 8: Območja linearnosti, koeficienti determinacije, meje zaznave in ponovljivosti za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih za določitev vitaminov topnih v vodi in vitaminov topnih v maščobah z uporabo HPLC

| <i>Vitamin</i> | <i>Območje linearnosti (mg/L)</i> | <i>Koeficient determinacije</i> | <i>Meja zaznave (mg/L)</i> | <i>RSD (%)</i> |
|----------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|
| <i>B6</i>      | 1,78-14,20                        | 0,9996                          | 1,37                       | 6,23           |
| <i>B1</i>      | 4,39-39,44                        | 0,9998                          | 3,18                       | 3,16           |
| <i>B2</i>      | 2,18-17,43                        | 0,9998                          | 1,84                       | 1,68           |
| <i>D3</i>      | 0,16-1,30                         | 0,9998                          | 0,05                       | 2,31           |
| <i>E</i>       | 10,15-18,20                       | 0,9998                          | 3,09                       | 1,64           |

|            |            |        |      |      |
|------------|------------|--------|------|------|
| <i>A</i>   | 4,94-39,49 | 0,9998 | 5,0  | 1,72 |
| <i>B12</i> | 0,04-0,12  | 0,9998 | 0,04 | 6,02 |

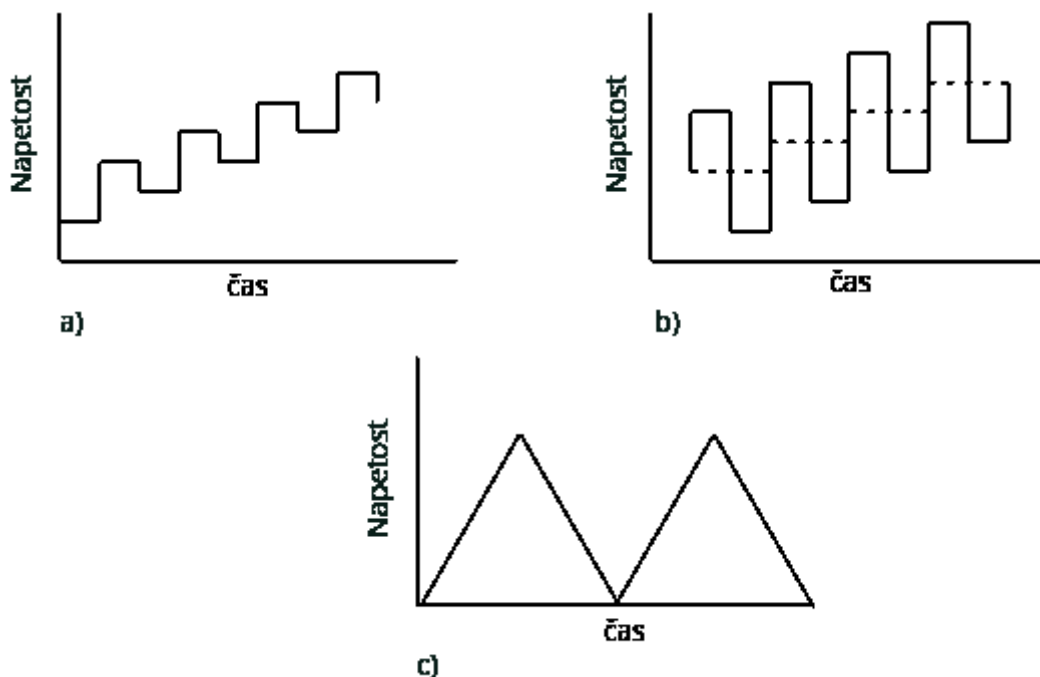
### 3.2.4 Superkritična tekočinska kromatografija

Superkritična tekočinska kromatografija (SFC) je kromatografska metoda v kateri se kot mobilna faza uporablja superkritična tekočina. Lastnosti, prednosti in pomanjkljivosti superkritičnih tekočin so opisane v razdelku 3.1.4.

Salvador in soavtorji <sup>[13]</sup> so opisali metodo za določitev vitamina E s superkritično tekočinsko kromatografijo v multivitaminskih tabletah. Vzorec so pripravili s superkritično tekočinsko ekstrakcijo na način opisan v razdelku 3.1.4. Prednost uporabe SFE skupaj s SFC je v tem, da ni potrebe po uporabi organskih topil za ekstrakcijo in mobilno fazo. Uporabljeno je le nekaj mililitrov diklorometana. Za SFC so uporabljali kromatograf s sistemom za dovajanje mobilne faze z maksimalnim tlakom 500 atm in kapaciteto 250 mL. Uporabili so plamensko ionizacijski detektor (FID) in kolono iz nerjavečega jekla (10 cm z notranjim premerom 1 mm) z Nucleosil C18 polnilom z velikostjo delcev 5 µm. Ekstrahiran vzorec so prenesli v 10 mL bučko in dopolnili do oznake z diklorometanom. V SFC sistem so injicirali 1 µL te raztopine. Temperaturo so nastavili na 60 °C in je ves čas bila konstantna, tlak so spreminjali od 100 atm (konstanten 3 min) do 450 atm (konstanten 20 min) s hitrostjo 70 atm/min. Počasno višanje tlaka je vplivalo na selektivnost metode. Koeficient determinacije je bil 0,99993. Interferenc drugih vitaminov v vzorcu ni bilo. Retencijski čas je bil 14,2 min. Izkoristki na treh različnih vzorcih so bili  $94 \pm 6 \%$ ,  $102 \pm 2 \%$  in  $101,3 \pm 0,7 \%$ .

### 3.2.5 Voltometrija

Voltometrija je ena izmed elektrokemijskih analiznih tehnik, pri kateri s časom spreminjamo napetost in opazujemo tok. Graf, ki ponazarja odvisnost toka od napetosti se imenuje voltamogram. Voltometrija poteka v elektrolitski celici v kateri se nahajajo tri elektrode in sicer delovna, referenčna in protielektroda. Obstaja veliko voltametričnih metod, ki se razlikujejo po načinu apliciranja napetosti oz. po obliki napetostnega signala <sup>[23]</sup>. Najbolj pogosto uporabljene voltametrične metode pri določitvi vitaminov v prehranskih dopolnilih so diferenčna pulzna voltometrija, voltometrija s pravokotnimi pulzi in ciklična voltometrija. Oblike napetostnega signala vseh treh metod so prikazane na Sliki 4.



Slika 4: Oblika napetostnega signala pri a) diferenčni pulzni voltametriji, b) voltametriji s pravokotnimi pulzi in c) ciklični voltametriji

**Diferenčna pulzna voltametrija** je metoda pri kateri apliciramo zaporedje pravokotnih pulzov v diskretnih korakih. V vsakem naslednjem koraku je napetost povečana za isti faktor, čas trajanja koraka je vedno enak. Torej napetost narašča linearno z naloženim pravokotnim profilom. Tok merimo dvakrat in sicer tik pred začetkom in tik pred koncem enega koraka. Na voltamogram nanašamo razliko med izmerjenima tokovoma. Ta razlika se imenuje diferenčni tok <sup>[23]</sup>.

**Voltametrija s pravokotnimi pulzi** je metoda pri kateri tudi apliciramo zaporedje pravokotnih pulzov v diskretnih korakih z razliko, da napetost ne narašča linearno ampak stopničasto z naloženim pravokotnim profilom. En korak je kombinacija dveh pulzov in sicer katodnega, kjer se analit reducira na površini delovne elektrode in nato anodnega, kjer se reducirani analit spet oksidira. Tok izmerimo na koncu obeh pulzov in na voltamogram nanesemo razliko med obema <sup>[23]</sup>.

**Ciklična voltametrija** je metoda pri kateri je napetostni signal trikotne oblike. Napetost torej v enem koraku prvo nekaj časa linearno narašča (katodni val), nato pa linearno pada (anodni val) do začetne vrednosti <sup>[23]</sup>.

Kuzmanović in soavtorji <sup>[24]</sup> so uporabili diferenčno pulzno voltametrijo z uporabo z borom dopirane diamantne elektrode za določitev vitamina B6. Z borom dopirana

diamantna elektroda predstavlja eno najboljših elektrodnih materialov zaradi svojega širokega potencialnega okna, majhnega toka v ozadju, dolgoročne stabilnosti, majhne adsorpcije in visoke občutljivosti. Meritve so bile izvedene z uporabo potenciostata. Celica je bila sestavljena iz treh elektrod. Z borom dopirana diamantna elektroda je bila uporabljena kot delovna elektroda, Ag/AgCl (3 M KCl) kot referenčna elektroda in Pt žica kot protielektroda. Pred prvo meritvijo so delovno elektrodo sprali z deionizirano vodo in so jo obrisali s svilenim robčkom dokler ni dosežen zrcalni videz površine. Potem so jo anodno obdelali z nastavitvijo +2 V za 3 min v 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> da bi očistili površino elektrode, usledila je še katodna obdelava z nastavitvijo -2 V za 3 min. Vzorec multivitaminskih tablet so raztopili v nosilnem elektrolitu in postavili v ultrazvočno kopel za 30 min. Potem so vzorec prefiltrirali, prenesli v 100 mL bučko in dopolnili do oznake z nosilnim elektrolitom. Za meritve so uporabljali pufrsko raztopino Britton-Robinson s pH 6. Amplituda pulza je bila 130 mV in čas pulza 50 ms. Raziskali so vpliv prisotnosti vitaminov B1, B12, B2 in C v vzorcu. Koncentracija interferenc je bila 5x višja kot koncentracija vitamina B6. Izkazalo se je da vitamini B1, B2 in C ne motijo analize, medtem ko jo B12 moti. Dobro definiran oksidacijski vrh za vitamin B6 je bil okoli +1,05 V nasproti Ag/AgCl (3 M KCl). Pri optimalnih pogojih je bilo linearno območje od 7 do 47 μM, meja zaznave 3,76 μM, ponovljivost po 7 meritvah 3,6% za vzorec z 9 μM vitamina B6 in 2,4% za vzorec z 30 μM vitamina B6. Izkoristki na dveh različnih vzorcih (9 in 30 μM vitamina B6) so bili 107 in 104 %.

Mielech in soavtorji <sup>[25]</sup> so uporabili ciklično voltometrijo in voltametrijo s pravokotnimi pulzi za določitev vitaminov B2 in C. Za meritev so uporabili pufer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> s pH 6,8. Uporabili so trielektrodni sistem. Staklena ogljikova elektroda je bila uporabljena kot delovna elektroda, nasičena kalomelska elektroda kot referenčna in Pt žica kot protielektroda. Vse raztopine so pred meritvijo prepihali z argonom za 10 min in so meritve opravljali pri sobni temperaturi. Pred prvo meritvijo so stakleno ogljikovo elektrodo očistili tako, da so jo polirali z aluminijevim oksidom v prahu, takoj po tem so jo sprali z dvakrat destilirano vodo, nato so jo ultrazvočno čistili v 1:1 dušikovi kislini in posušili na zraku. Vzorce multivitaminskih tablet so pripravili tako, da so jih zdrobili in raztopili v 0,02 M očetni kislini ter segrevali in mešali. Potem so vzorec prefiltrirali, prenesli v 100 mL bučko in dopolnili do oznake z nosilnim elektrolitom. Prvo so posneli ciklični voltamogram vitamina B2 v potencialnem oknu -0,7 V do 0,0 V. Na voltamogramu je bil prisoten tako oksidacijski vrh (-0,417 V) kot redukcijski vrh (-0,470 V), kar pomeni, da je reakcija na delovni elektrodi kvazi-reverzibilna. Nato so posneli ciklični voltamogram vitamina C v potencialnem oknu 0,0 V do 0,6 V. Prisoten je bil le oksidacijski vrh (0,37 V), kar pomeni, da je reakcija ireverzibilna. S temi ugotovitvami so začeli analizo z voltometrijo s pravokotnimi pulzi. Skeniranje v



potencialnem oknu -0,7 V do 0,6 V z amplitudo pulza 25 mV in časom pulza 10 ms je dalo vrhove pri -0,47 V in +0,35 V proti nasičeni kalomelski elektrodi za vitamin B2 oz. vitamin C. Oba vitamina so lahko istočasno določili iz istega voltamograma. Območja linearnosti, meje zazanave, koeficienti determinacije, ponovljivosti in izkoristki za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih so prikazani v Tabeli 9. Testirane so tudi interference drugih vitaminov. Drugi vitamini topni v vodi niso vplivali na določitev, saj niso elektroaktivni v območju merjenja. Vitamini topni v maščobah niso topni v vodi in niso dali odziva.

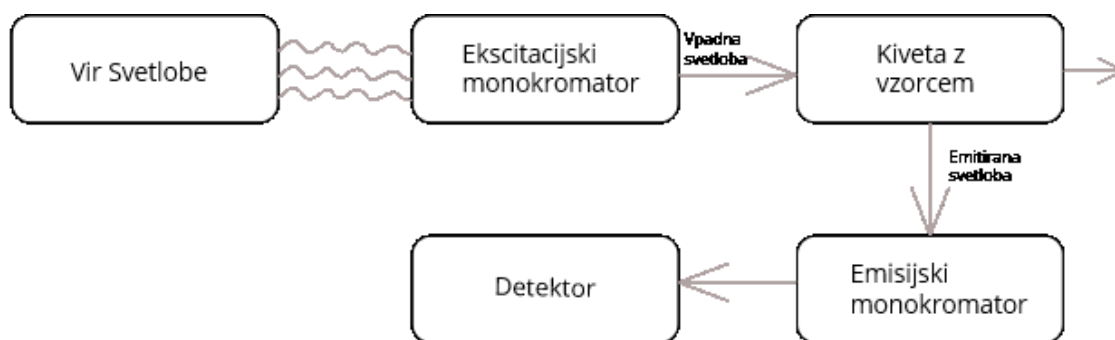
Tabela 9: Območja linearnosti, meje zazanave, koeficienti determinacije, ponovljivosti in izkoristki za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih za določitev vitaminov B2 in C z uporabo voltametrije s pravokotnimi pulzi

| <i>Vitamin</i> | <i>Območje linearnosti (mol/L)</i> | <i>Meja zaznave (μM)</i> | <i>Koeficient determinacije</i> | <i>RSD (%)</i> | <i>Izkoristek (%)</i> |
|----------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------------|
| B2             | (1,5–30) 10 <sup>-6</sup>          | 0,9                      | 0,996                           | 2,6            | 96 – 98,3             |
| C              | (1,5–30) 10 <sup>-4</sup>          | 100                      | 0,9897                          | 3,1            | 99,1 – 99,2           |

### 3.2.6 Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrija je spektroskopska metoda, ki temelji na fluorescenci. Predpostavimo, da molekule vzorca vzbudimo z ekscitacijskim fotonom z energijo  $\Delta E_{\text{ex}}$ . Pri določenih spojinah bo začel vzbujeni elektron prehajati med vibracijskimi stanji s čemer se bo izgubil del absorbirane energije (interna konverzija). Pri vračanju elektrona iz vzbujenega stanja nazaj v osnovno stanje bo imel emitirani foton energijo  $\Delta E_{\text{em}}$ , ki bo zaradi interne konverzije manjša od energije ekscitacijskega fotona (posledično bo za valovne dolžine fotonov veljalo  $\lambda_{\text{em}} > \lambda_{\text{ex}}$ ). Temu pojavu rečemo fluorescenca. Približno 10 % znanih spojin fluorescira, zato je metoda zelo specifična in občutljiva. Spojine, ki ne fluorescirajo lahko derivatiziramo z uporabo ustreznega fluorescenčnega reagenta. Instrument, ki se uporablja za spektrofluorimetrijo je spektrofluorimeter. Njegova shema je prikazana na Sliki 5. Sestavljen je iz vira svetlobe, ki je običajno Xe-žarnica, ekscitacijskega monokromatorja, s katerim

kontroliramo valovno dolžino vpadne svetlobe, kivete v kateri se nahaja vzorec, emisijskega monokromatorja, s katerim kontroliramo valovno dolžino emitirane svetlobe in detektorja zanjo. Intenziteto emitirane svetlobe merimo pravokotno na pot vpadne svetlobe zato, da nas pri meritvi vpadna svetloba ne bi motila [19].



Slika 5: Shema spektrofleurimetra

Mohamed in soavtorji [26] so razvili dve spektrofleurimetrični metodi za določitev vitaminov B1, B2 in B6 v prisotnosti B12. Prva je metoda za določanje vitamina B1 in temelji na oksidaciji tiamina do tiokroma z jodom v alkalnem mediju. Metoda je bila uporabljena za določanje vitamina B1 v binarnih, terciarnih in kvartarnih zmesih z vitamini B2, B6 in B12 brez interferenc. Druga metoda je za določanje vitaminov B2 in B6 v acetatnem pufru s pH 6. Tudi v tem primeru vitamina B1 in B12 nista bila moteča. Vzorec multivitaminskih tablet so zmleli in raztopili v 30 mL destilirane vode v 50 mL bučki. Raztopino so postavili v ultrazvočno kopel za 10 min. Bučko so dopolnili do oznake z destilirano vodo in so raztopino filtrirali. Prvi del filtrata so zavrgli. Alikvoto so dodatno razredčili pred analizo z destilirano vodo, da bi dobili koncentracije vitaminov v linearnem območju in primerne za analizo. Metoda 1: 1 mL standardne raztopine oz. raztopine vzorca so prenesli v 10 mL bučko, ji dodali 1 mL raztopine joda (0,030 M) in 1 mL raztopine natrijevega hidroksida (0,053 M). Bučko so dopolnili do oznake z etanolom. Počakali so 20 min in so merili relativno intenziteto fluorescence (RFI) pri  $\lambda_{ex}$  360 nm in  $\lambda_{em}$  430 nm proti slepi raztopini. Metoda 2: 1 mL standardne raztopine oz. raztopine vzorca so prenesli v 10 mL bučko in jo razredčili do oznake z acetatnim pufrom s pH 6. Izmerili so RFI pri  $\lambda_{ex}$  325 nm in  $\lambda_{em}$  415 nm za B2 in pri  $\lambda_{ex}$  457 nm in  $\lambda_{em}$  527 nm za B6. Preučevali so učinek nekaterih pomožnih snovi, ki se uporabljajo v farmacevtskih pripravkih, kot so saharoza, glukoza, laktoza, citronska kislina, talk, škrob in propilen glikol. Dobili so dobre izkoristke ( $97,6 \pm 0,7$ – $101,2 \pm 0,8$ )% kar ukazuje na to, da te pomožne snovi niso moteče za analizo. RSD za različne

vzorci je bil 0,46–1,02%, kar kaže na dobro natančnost. Območja linearnosti, koeficienti determinacije, meje zaznave in kvantifikacije za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih so prikazani v Tabeli 10.

Tabela 10: Območja linearnosti, koeficienti determinacije, meje zaznave in kvantifikacije za posamezne vitamine pri optimalnih pogojih za določitev vitaminov B1, B2 in B6 s spektrofotometrijo

| <i>Vitamin</i> | <i>Območje linearnosti (ng/mL)</i> | <i>Koeficient determinacije</i> | <i>Meja zaznave (ng/mL)</i> | <i>Meja kvantifikacije (ng/mL)</i> |
|----------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| <i>B1</i>      | 20-500                             | 0,9999                          | 4,20                        | 14,00                              |
| <i>B2</i>      | 10-100                             | 0,9991                          | 2,75                        | 9,17                               |
| <i>B6</i>      | 10-120                             | 0,9995                          | 2,00                        | 6,67                               |

Zeeb in soavtorji <sup>[9]</sup> so opisali spektrofotometrično metodo za določitev vitamina B1 v tabletah. Vzorec je pripravljen z DLLME in sicer s postopkom opisanim v razdelku 3.1.2. V prvem koraku priprave vzorca so vitamin B1 oksidirali s ferocianidom, da bi dobili fluorescenčni tiokrom. Relativno intenziteto fluorescence so merili pri  $\lambda_{ex}$  375 nm in  $\lambda_{em}$  438 nm. Dobljeni izkoristki na realnih vzorcih so bili 91,4–103,5%. Pri optimalnih pogojih je bilo območje linearnosti 0,2-100 ng/mL, koeficient determinacije 0,9991, meja zaznave 0,06 ng/mL in RSD 3,0 %.



## 4 Zaključek

Mikrobiološka analiza je dolgo let bila standardna metoda za določitev vitaminov, vendar je z razvojem novejših metod izgubila na pomembnosti predvsem zaradi časa potrebnega za izvedbo. Najbolj priljubljena metoda in hkrati metoda, ki se najbolj hitro razvija je HPLC. Prednosti HPLC so v točnosti, občutljivosti in v tem, da je v veliki meri avtomatizirana, pomanjkljivost je da pogosto zahteva komplicirane priprave vzorca in drago opremo. Kot bolj okolju prijazna alternativa se je razvila SFC, vendar ima ta lahko probleme zaradi nizke polarnosti mobilne faze. Spektrofluorimetrična metoda ponuja visoko občutljivost in specifičnost, vendar se lahko pojavijo problemi z interferencami. Dobra alternativa je tudi CE, katere prednost je hitrost separacije in majhna poraba reagentov, ampak ima lahko včasih težave s ponovljivostjo. Voltametrična metoda je dobra izbira zaradi specifičnosti in enostavnosti aparature, vendar je pomanjkljivost v morebitnih interferencah. Težko je reči, da obstaja ena analizna metoda za določitev vitaminov v prehranskih dopolnilih, ki je v vseh primerih najboljša. Izbira metode je lahko odvisna od različnih faktorjev, na primer ali določamo vitamine topne v vodi ali v maščobah, ali želimo določiti samo en vitamin ali več hkrati, kakšen je vzorec oz. ali v vzorcu pričakujemo še druge komponente, ki lahko povzročijo interference. Sigurno je pa, da se bojo metode še naprej razvijale, saj je določitev vitaminov v prehranskih dopolnilih zelo pomembna naloga.



## 5 Literatura

- [1] J. T. Dwyer, J. Holden, K. Andrews, J. Roseland, C. Zhao, A. Schweitzer, C. R. Perry, J. Harnly, W. R. Wolf, M. F. Picciano, et al.: Measuring Vitamins and Minerals in Dietary Supplements for Nutrition Studies in the USA. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 37–46.
- [2] *Priporočeni dnevni vnosi vitaminov in mineralov*. Nacionalni inštitut za javno zdravje. <https://www.nijz.si/sl/priporoceni-dnevni-vnosi-vitaminov-in-mineralov> (pridobljeno 03. maj. 2020)
- [3] K. W. Phinney, C. A. Rimmer, J. B. Thomas, L. C. Sander, K. E. Sharpless, S. A. Wise: Isotope Dilution Liquid Chromatography - Mass Spectrometry Methods for Fat- and Water-Soluble Vitamins in Nutritional Formulations. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 92–98.
- [4] A. Gironés-Vilaplana, D. Villanõ, J. Marhuenda, D. A. Moreno, C. Garcíá-Viguera: Vitamins. V: *Nutraceutical and Functional Food Components*. 1 izd., vol. 1, C. M. Galanakis (ur.), Cambridge, MA: Academic Press 2017, str. 159–201
- [5] Y. Zhang, W. E. Zhou, J. Q. Yan, M. Liu, Y. Zhou, X. Shen, Y. L. Ma, X. S. Feng, J. Yang, G. H. Li: A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010. *Molecules* **2018**, 23, 1–25.
- [6] H. Prosen, I. Kralj Cigić: Navodila za vaje pri predmetu Kemijska analiza živil. 1 izd. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2012, str. 19–21
- [7] F. Momenbeik, M. Roosta, A. A. Nikoukar: Simultaneous Microemulsion Liquid Chromatographic Analysis of Fat-Soluble Vitamins in Pharmaceutical Formulations: Optimization Using Genetic Algorithm. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 3770–3773.
- [8] A. Quigley, W. Cummins, D. Connolly: Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the Analysis of Milk and Dairy Products : A Review. *J. Chem.* **2016**, 2016.
- [9] M. Zeeb, M. R. Ganjali, P. Norouzi: Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by Spectrofluorimetry as a Simple and Accurate Technique for Determination of Thiamine (Vitamin B1). *Microchim. Acta* **2010**, 168, 317–324.
- [10] P. K. Mukherjee: Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs. V: *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. 1 izd., vol. 1, P. K. Mukherjee (ur.), Amsterdam: Elsevier 2019, str. 515–537
- [11] A. O. Rudenko, L. A. Kartsova: Determination of Water-Soluble Vitamin B and Vitamin C in Combined Feed, Premixes, and Biologically Active Supplements

- by Reversed-Phase HPLC. *J. Anal. Chem.* **2010**, *65*, 71–76.
- [12] S. M. Ooi, P. W. S. Heng: Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bioactives – A Southeast Asia Perspective. V: *Gases in Agro-food Processes*. 1 izd., vol. 1, R. Cachon, P. Girardon, A. Voilley (ur.), Cambridge, MA: Academic Press 2019, str. 625–634
- [13] A. Salvador, M. A. Jaime, M. De Guardia, G. Becerra: Supercritical Fluid Extraction and Supercritical Fluid Chromatography of Vitamin E in Pharmaceutical Preparations. **1998**, *35*, 53–55.
- [14] A. Lebidzińska, M. L. MarszałŁ: Analytical Trends in the Simultaneous Determination of Vitamins B1, B6 and B12 in Food Products and Dietary Supplements. V: *B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. 1 izd., vol. 1, V. R. Preedy (ur.), London: Royal Society of Chemistry 2012, str. 195–209
- [15] Capillary Electrophoresis. Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Capillary\\_Electrophoresis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis) (pridobljeno 25. maj. 2020).
- [16] M. M. A. C. Ribeiro, A. A. Prado, A. Domingues Batista, R. Alejandro Abarza Munoz, E. Mathias Richter: Rapid Method for Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Zinc in Effervescent Tablets by Capillary Zone Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection. *J. Sep. Sci.* **2019**, *42*, 754–759.
- [17] D. C. da Silva, J. V. Visentainer, N. E. de Souza, C. C. Oliveira: Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of the Ten Water-Soluble Vitamins in Food Supplements. *Food Anal. Methods* **2013**, *6*, 1592–1606.
- [18] C. Yin, Y. Cao, S. Ding, Y. Wang: Rapid Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins with Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1193*, 172–177.
- [19] H. Prosen, I. Kralj Cigić, M. Strlič: Praktikum iz analizne kemije. 1 izd., Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2014, str. 101–128
- [20] B. C. Nelson, K. E. Sharpless, L. C. Sander: Quantitative Determination of Folic Acid in Multivitamin/Multielement Tablets Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1135*, 203–211.
- [21] H. Bin Li, F. Chen: Simultaneous Determination of Nine Water-Soluble Vitamins in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 271–274.
- [22] P. Moreno, V. Salvadó: Determination of Eight Water- and Fat-Soluble Vitamins



- in Multi-Vitamin Pharmaceutical Formulations by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 207–215.
- [23] D. C. Harris: Quantitative Chemical Analysis. 7 izd., New York, NY: W. H. Freeman and Company 2007, str. 362–369
- [24] D. Kuzmanović, M. Khan, E. Mehmeti, R. Nazir, N. R. R. Amaizah, D. M. Stanković: Determination of Pyridoxine (Vitamin B6) in Pharmaceuticals and Urine Samples Using Unmodified Boron-Doped Diamond Electrode. *Diam. Relat. Mater.* **2016**, *64*, 184–189.
- [25] K. Mielech: Simultaneous Voltammetric Determination of Riboflavin and L-Ascorbic Acid in Multivitamin Pharmaceutical Preparations. *J. Trace Microprobe Tech.* **2003**, *21*, 111–121.
- [26] A. M. I. Mohamed, H. A. Mohamed, N. M. Abdel-Latif, M. R. Mohamed: Spectrofluorimetric Determination of Some Water-Soluble Vitamins. *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 1758–1769.