



Dipl.inž-master Tanja Brezo-Borjan

**ODREĐIVANJE VITAMINA B₁, B₂ I B₃ PRIMENOM
HRONOPOTENCIOMETRIJE I HRONOPOTENCIOMETRIJSKE
STRIPING ANALIZE**

Doktorska disertacija

Mentor
Prof. dr Zvonimir Suturović

Novi Sad, 2019.

Zahvalnica

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru prof.dr Zvonimiru Suturoviću na neizmernoj pomoći prilikom osmišljavanja teme, u eksperimentalnom radu i pisanju, kao i izuzetnom strpljenju i vremenu posvećenom izradi ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem doc.dr Zorici Stojanović na nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i stručnim savetima tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se dr Jovani Kos na izvođenju svih HPLC analiza u okviru eksperimentalnog dela doktorske teze, korisnim sugestijama i iskrenoj podršci tokom pisanja.

Veliku zahvalnost iskazujem prof.dr Snežani Kravić na stručnoj podršci, pomoći i prijateljskim savetima tokom mojih doktorskih studija i godina rada u Laboratoriji za instrumentalne metode analize.

Dr Ani Đurović hvala na kolegijalnosti i iskrenoj pomoći u toku izrade ove doktorske teze.

Biljani Zvizdalo hvala na grafičkoj podršci i lepoj reči.

Najveću zahvalnost dugujem mojim najbližima, jer su uvek uz mene.

Disertacija je rađena u okviru projekta 'Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu', potprojekat 1: 'Razvoj i unapređenje tehnologije funkcionalnih proizvoda od mleka', koji su finansirani od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	3
2.1. Kompleks vitamina B.....	3
2.1.1. Vitamin B ₁	5
2.1.2. Vitamin B ₂	14
2.1.3. Vitamin B ₃	22
2.2. Analitičke metode za određivanje vitamina B ₁ , B ₂ i B ₃	30
2.2.1. Priprema uzoraka.....	32
2.2.2. Visokopritisna tečna hromatografija (HPLC).....	33
2.2.3. Elektroanalitičke tehnike	38
2.3. Hronopotencimetrija	43
2.4. Hronopotenciometrijska striping analiza.....	47
2.4.1. Adsorpciona hronopotenciometrijska striping analiza	50
3. EKSPERIMENTALNI DEO	54
3.1. Instrumentacija	54
3.2. Pribor i posuđe.....	57
3.3. Hemikalije i reagensi	58
3.4. Priprema radnih elektroda.....	59
3.5. Optimizacija i validacija metoda	61
3.5.1. Opšti postupak optimizacije i validacije	62
3.6. Uzorci i priprema uzoraka za analizu	64
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
4.1. Određivanje vitamina B ₁ hronopotenciometrijskom striping analizom	66
4.1.1. Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsku striping analizu vitamina B ₁ na tankoslojnoj živinoj elektrodi	67
4.1.2. Validacija metode	79
4.2. Hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B ₂	90
4.2.1. Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B ₂ primenom planarne disk elektrode od staklastog ugljenika.....	91
4.2.2. Validacija metode	97
4.2.3. Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B ₂ primenom elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika	107
4.2.4. Validacija metode	115
4.3. Određivanje vitamina B ₃ hronopotenciometrijskom striping analizom	122

4.3.1.	Određivanje optimalnih uslova za određivanje vitamina B ₃ hronopotenciometrijskom striping analizom.....	122
4.3.2.	Validacija metode	135
5.	ZAKLJUČCI	146
6.	LITERATURA	149

1. UVOD

Vitamini predstavljaju grupu organskih jedinjenja koja su, u veoma malim količinama, neophodna za normalno funkcionisanje ljudskog organizma (esencijalni mikronutrijenti). Termin *vitamin* ne obuhvata druge tri grupe esencijalnih nutrijenata: minerale, esencijalne masne kiseline i esencijalne aminokiseline (Combs i McClung, 2017). Kako su fizičko-hemijske osobine vitamina, kao i njihove fiziološke uloge u organizmu vrlo raznolike, klasifikacija ovih jedinjenja je izvršena na osnovu rastvorljivosti, i to na vitamine rastvorne u vodi, tj. hidrosolubilne (grupa vitamina B, tzv. B-kompleks i vitamin C) i liposolubilne, odnosno vitamine rastvorne u mastima (A, D, E i K). Skoro svi vitamini se u prirodi javljaju u nekoliko biološki aktivnih oblika, poznatih kao *vitameri*, koji se međusobno razlikuju u strukturi, biopotencijalu i stabilnosti.

Većina vitamina je neizostavna u ljudskoj ishrani, jer ljudski organizam ne može da ih sintetizuje (izuzeci su vitamin D, koji se stvara u koži pod uticajem sunčeve svetlosti, i B₃ koji nastaje konverzijom triptofana, pod uslovom dovoljnog unosa ove aminokiseline putem ishrane). Biljke su glavni proizvođači vitamina (sem vitamina B₁₂), i predstavljaju primarne izvore ovih esencijalnih mikronutrijenata (Ball, 2006).

Vitamini imaju različite biohemijske funkcije u organizmu. Vitamin A je regulator ćelijskog rasta i diferencijacije, vitamin D ima ulogu sličnu hormonskoj, regulišući metabolizam minerala u izgradnji kostiju i drugih tkiva i važan je za imuni sistem organizma, vitamini C i E deluju kao antioksidansi, dok je uloga vitamina K u koagulaciji krvi nezamenjiva (Combs i McClung, 2017).

Deficijencija kao i prekomeran unos vitamina mogu dovesti do ozbiljnih oboljenja (Combert i Buckton, 2019). Suprotno liposolubilnim vitaminima, prekomeran unos hidrosolubilnih vitamina ne preči ozbiljnim komplikacijama po ljudski organizam, zbog olakšanog izlučivanja ovih jedinjenja, najčešće putem urinarnog trakta (Combs i McClung, 2017). Uzroci nutritivne vitaminske deficijencije su mnogobrojni, a mogu delovati pojedinačno ili kao skup faktora: nedovoljan unos vitamina, slaba apsorpcija, specifična stanja povećanih potreba organizma za određenim vitaminima, pojačano izlučivanje pojedinih vitamina, ili pojačan katabolizam.

Sposobnost ljudskog organizma da skladišti vitamine predstavlja dodatni faktor, npr. vitamin B₁ se skladišti samo 2 nedelje u malim količinama, pretežno u tkivu skeletnih mišića, srca, mozga, jetre i bubrega, dok se vitamin B₁₂ može skladištiti u jetri i do nekoliko godina. Klinička deficijencija pojedinih vitamina B grupe dovodi do pojave biohemijskih defekata koji se manifestuju kao oboljenja sa karakterističnim simptomima (mentalna konfuzija, slabljenje nervnih funkcija, kardiovaskularni poremećaji), dok deficijencija drugih vitamina izaziva blaže simptome kod ljudi (Ball, 2006).

S obzirom na fiziološki značaj, koji vitamini imaju za ljudski organizam, zahtevi u pogledu određivanja sadržaja vitamina u hrani i vitaminskim dodacima ishrani su poslednjih decenija znatno porasli. Zbog izuzetnog značaja u metabolizmu, vitamini B₁, B₂ i B₃ su odabrani kao predmet istraživanja ove disertacije.

Poslednjih decenija, elektroanalitičke tehnike se, pored primene u kvalitativnim i kvantitativnim određivanjima metala, sve češće koriste i za određivanje organskih molekula (Suturović, 2003). Ove tehnike odlikuje visoka osetljivost, tačnost, preciznost i selektivnost, kao i jednostavnost i brzina. Dodatno, cena instrumentacije i njene eksploatacije je relativno niska u poređenju sa najčešće korišćenim hromatografskim i optičkim metodama.

Detaljnim pretraživanjem literature, utvrđeno je da hronopotencijometrija i hronopotenciometrijska striping analiza nisu primenjivane za određivanje vitamina B grupe.

Cilj ove disertacije je ispitivanje elektrohemijskog ponašanja vitamina B₁, B₂ i B₃ primenom tehnika hronopotencijometrije i hronopotenciometrijske striping analize, razvijanje metoda za njihovo određivanje navedenim tehnikama, uz optimizaciju i validaciju metoda, kao i ispitivanje mogućnosti primene razvijenih metoda za analizu realnih uzoraka (multivitaminih dodataka ishrani).

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Kompleks vitamina B

Kompleks vitamina B predstavlja grupu organskih jedinjenja, u izvesnoj meri slične molekulske strukture, koja imaju slične biološke uloge (Graulet i Girard, 2017). Čine ga vitamini B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (nikotinamid), B₆ (piridoksin), B₉ (folna kiselina) i B₁₂ (cijanokobalamin). Pantotenska kiselina (vitamin B₅) i biotin (vitamin B₈) takođe pripadaju grupi vitamina B i neophodni su organizmu, ali je njihova deficijencija izuzetno retka (Gentili i Caretti, 2013). Svi B vitamini sadrže jednu ili više amino grupa i, izuzev pantotenske kiseline, svi imaju bar jedan prsten ili jezgro u svojoj hemijskoj strukturi. Molekulska masa ovih jedinjenja znatno varira, od vitamina najmanje molekulske mase, niacina (123 g/mol), do vitamina sa najvećom molekulskom masom, cijanokobalamina (1355 g/mol). Svi vitamini grupe B su dobro rastvorljivi u vodi, zavisno od vrednosti pH i temperature.

Da bi ostvarili svoju metaboličku aktivnost, vitamini B grupe, izuzev biotina, podležu hemijskoj aktivaciji. Proces aktiviranja podrazumeva reakcije adicije komplementarnih hemijskih grupa. Za tiamin, riboflavin, niacin i piridoksin, komplementarna hemijska grupa je fosfatna grupa, dok je za folate i cijanokobalamin, ugljenik komplementarna grupa. Nukleotidna jedinica predstavlja komplementarnu grupu za riboflavin, niacin, pantotensku kiselinu i cijanokobalamin (Graulet i Girard, 2017).

Nekoliko vitamina B grupe (B₁, B₂, B₃, B₆) ima ulogu u izgradnji koenzima koji učestvuju u procesima katabolizma hranljivih materija i proizvodnji energije neophodne organizmu. Osnovnu strukturu enzima čine apoenzim – proteinski deo i kofaktor, koji je vezan za apoenzim. Kofaktor može da bude neorganskog porekla (joni metala), ili organskog – koenzimi, koji se sastoje od vitamina. Vitaminska komponenta omogućava vezivanje enzima sa odgovarajućim supstratom (Murray i sar., 2003). Osnovne metaboličke reakcije u kojima učestvuju vitamini grupe B su (Graulet i Girard, 2017):

1. Sinteza lipida i njihovo iskorišćenje (obezbeđivanje energije u reakcijama oksidacije, sinteza fosfolipida i prostaglandina),
2. Sinteza i katabolizam aminokiselina procesima transaminacije,
3. Sinteza i katabolizam ugljenih hidrata, čime se obezbeđuje energija neophodna organizmu,
4. Reakcije interkonverzije između lipida, proteina i ugljenih hidrata, koje se odvijaju kroz transfer karbonskih jedinica,
5. Proces ćelijskog disanja,
6. Regulacija ciklusa metilacije,
7. Sinteza nukleinskih kiselina,
8. Obnavljanje i replikacija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK).

Ukoliko neophodni B vitamin izostane, formiranje koenzima nije moguće i lanac biohemijских reakcija se prekida. Posledica toga je akumuliranje supstrata u tkivu, sem u izuzetnim slučajevima, kada postoji mogućnost preusmeravanja metabolizma na druge puteve razlaganja nakupljenog supstrata (Ball, 2006).

Pre 1935. godine, kada je počela komercijalna proizvodnja tableta ekstrakta kvasca i polusintetičkog vitamina C, jedini izvor vitamina bila je hrana. 1950-tih godina došlo je do masovne proizvodnje i marketinga vitaminskih suplemenata, uključujući multivitaminske preparate, u cilju sprečavanja deficijencije vitamina u opštoj populaciji. Takođe, vlade brojnih zemalja su uvele obavezno dodavanje jedne esencijalne materije ili više njih, hrani (fortifikaciju), bilo da one ulaze ili ne ulaze u sastav hrane, u cilju prevencije ili korekcije nedostatka jednog ili više nutrijenata u populaciji ili specifičnoj populacionoj grupi (FAO/WHO, 1994). Najčešće se radi fortifikacija osnovnih namirnica kao što su brašno i mleko (www.ffinetwork.org). Iako navedeni načini smanjenja vitaminske deficijencije imaju jasnih prednosti, pokazalo se da je upotreba suplemenata od malog značaja za zdrave jedinke, koje balansiranom ishranom unose dovoljne količine vitamina. U slučaju nutritivne vitaminske deficijencije, upotreba suplemenata je neophodna i opravdana. Preporučeni dnevni unos vitamina B₁, B₂ i B₃ dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Preporučeni dnevni unos vitamina B₁, B₂ i B₃ (Graulet i Girard, 2017).

	B ₁ (mg/dan)	B ₂ (mg/dan)	B ₃ (mg/dan)
Odojčad			
0 – 6 meseci	0,2	0,3	2
7 – 12 meseci	0,3	0,4	4
Deca			
1 – 3 godine	0,5	0,5	6
4 – 8 godina	0,6	0,6	8
9 – 13 godina	0,9	0,9	12
Muškarci/žene			
≥ 14 godina	1,2/1,1	1,3/1,1	16/14
Trudnice	1,4	1,4	18
Dojilje	1,4	1,6	17

2.1.1. Vitamin B₁

Vitamin B₁, odnosno, *2-[3-[(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-4-methyl-1,3-thiazol-3-ium-5-yl]ethanol*, poznat je i pod nazivima tiamin i aneurin. Difosfat tiamina, koji se još naziva i tiamin-pirofosfat, ima ulogu koenzima u metabolizmu ugljenih hidrata i aminokiselina (Ball, 2006). Neophodan je za biosintezu adenozin-3-fosfata (ATP-a), riboze, nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD-a) i molekula DNK (Combs i McClung, 2017). Povećane potrebe za tiaminom se, stoga, javljaju u slučajevima ubrzanog metabolizma: kod povećane fizičke aktivnosti, trudnoće i dojenja, stanja dugotrajne povišene telesne temperature i hipertiroidizma (Ball, 2006). Uobičajeno oboljenje koje proističe iz dugotrajne deficijencije vitamina B₁ kod ljudi je beriberi, koje se ispoljava kao komplikovana klinička slika neuroloških i kardiovaskularnih poremećaja (Ball, 2006; Oni i sar., 2001). Ova bolest je bila rasprostranjena na Dalekom Istoku, gde je poliran, nefortifikovan pirinač predstavljao osnovnu hranu. Iako je celo zrno pirinča bogato vitaminom B₁, do deficita dolazi usled ljuštenja i poliranja, tj. odstranjivanja aleuronskog omotača zrna, koji je bogat nezasićenim mastima, vitaminima i mineralima. Njegovim odstranjivanjem sprečava se užeglost i produžava rok trajanja proizvoda. Tehnologije skladištenja koje smanjuju potrebu poliranja

novih kultura visokog prinosa, pružaju mogućnost suzbijanja tiaminske deficijencije među siromašnijim stanovništvom jugoistočne Azije. Posledice blaže deficijencije tiamina su gubitak težine i iritabilnost (Combs i McClung, 2017). Kod hroničnih alkoholičara, deficijencija ovog vitamina nastala usled loše ishrane, može dovesti do Vernik-Korsakofove encefalopatije, koja se ispoljava mentalnom konfuzijom i slabljenjem nervne funkcije. Dodatno, oslabljena funkcija jetre smanjuje iskorišćenje samog vitamina.

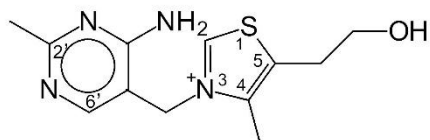
Tiamin je praktično netoksičan kada se unosi oralno, zbog ograničene apsorpcije i brzog izlučivanja viška vitamina putem urinarnog trakta (Ball, 2006).

2.1.1.1. Hemijska struktura, biopotencijal i fizičko-hemijske osobine vitamina B₁

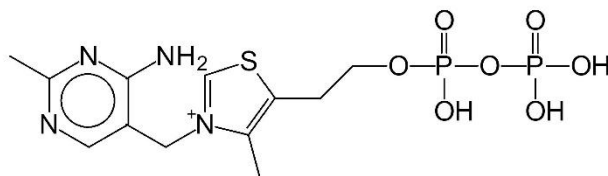
Molekul tiamina se sastoji od supstituisanog pirimidinskog i tiazolnog prstena, koji su povezani metilenskim mostom (Slika 1). Ovo jedinjenje je kvaternerni amin i javlja se kao monovalentni ili divalentni katjon, u zavisnosti od pH rastvora. U prirodi se javljaju tri fosfatna oblika: u živim organizmima dominantan oblik je koenzim tiamin-difosfat (TDP), poznat i kao tiamin-pirofosfat (TPP) (Slika 1). U malim količinama, u životinjskim tkivima su takođe prisutni i tiamin-monofosfat (TMP) i tiamin-trifosfat (TTP). Ovi oblici nemaju poznate koenzimske funkcije, iako TTP ima još uvek nerazjašnjenu ulogu u nervnoj transmisiji.

Za fortifikaciju hrane najčešće se koristi higroskopna so tiamin-hlorid-hidrohlorid ($C_{12}H_{17}N_4OSCl \cdot HCl$, $M = 337,3 \text{ g/mol}$), koja je komercijalno poznata pod nazivom tiamin-hidrohlorid. Drugi komercijalni oblik ovog vitamina, tiamin-mononitrat, je praktično nehigroskopan, pa se posebno preporučuje za obogaćivanje brašna (Ball, 2006).

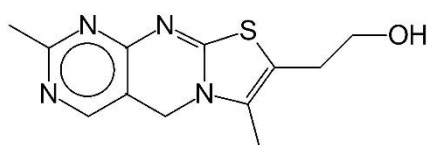
Tiamin-hidrohlorid je bezbojna kristalna supstaca ili beo prah mirisa sličnog kvascu, gorko-slanog ukusa. Tačka topljenja ovog jedinjenja je $207 \text{ }^\circ\text{C}$, na kojoj dolazi do razgradnje molekula. Veoma dobro se rastvara u vodi (100 g/100 ml), što ga čini pogodnim za parenteralnu upotrebu (Combs i McClung, 2017). Delimično je rastvoran u 95% etanolu (1 g/100 ml), a u mastima se ne rastvara.



Tiamin (slobodni oblik)



Tiamin-pirofosfat



Tiohrom

Slika 1. Hemijska struktura tiamina, tiamin-pirofosfata i tiohroma.

Tiamin je stabilan u kiseljoj sredini, ali sa porastom vrednosti pH stabilnost molekula opada, pa faktori kao što su povišena temperatura i hemijski reagensi mogu dovesti do deaktivacije vitamina. Blagom oksidacijom nastaje tiamin-disulfid, pri čemu ne dolazi do gubitka vitaminske aktivnosti, dok intenzivnijom oksidacijom kalijum-heksacijanoferatom(III) nastaje biološki neaktivan tiohrom (Slika 1). Fosfatni estri tiamina se oksiduju na identičan način, bez raskidanja fosfatnih grupa.

Molekul tiamina se rascepljuje pod uticajem sulfitnih jona, čak i na sobnoj temperaturi, pri čemu nastaju 2-metil-5-sulfometilpirimidin i tiazolni prsten. Ova reakcija je trenutna na pH 6, na pH 5 potpuno je završena nakon nekoliko časova, dok na pH 3 tiamin može da opstane u rastvoru sa sulfitima i do nekoliko meseci bez gubitka vitaminske aktivnosti. Pod dejstvom UV zračenja, tiamin se raspada (Ball, 2006).

2.1.1.2. Izvori vitamina B₁, stabilnost u hrani i bioraspoloživost

Tiamin proizvode bakterije i gljive, uključujući i mikrofloru debelog creva. Više od polovine ukupnog broja vrsta prisutnih u crevnoj mikroflori čoveka ima sposobnost sinteze vitamina B₁. Postoje indicije o njegovoj apsorpciji u ljudskom organizmu koje još nisu do kraja istražene (Combs i McClung, 2017).

Tkiva svih biljnih i životinjskih vrsta sadrže tiamin, odnosno, ovaj vitamin je široko rasprostranjen u svim vrstama prirodne neprocesuirane hrane, ali u relativno malim količinama. U važnije izvore tiamina spadaju kvasac i ekstrakt kvasca, pšenične mekinje, ovseno brašno, žitarice celog zrna, jestivo semenje, orašasti plodovi, svinjsko meso, džigerica (posebno svinjska), kao i srce i bubrezi. Govedina, jagnjetina, pileće meso, jaja, povrće i voće sadrže umerene količine, dok mleko sadrži relativno malu količinu ovog vitamina (Tabela 2) (Ball, 2006). Najvažniji izvor tiamina u ljudskoj ishrani predstavljaju žitarice celog zrna (Combs i McClung, 2017). U zrnu tiamin je neravnomerno raspoređen: u vrlo malim količinama je prisutan u endospermu, dok je u klicama i aleuronskom omotaču prisutan u znatno većim količinama. Kako se ovi delovi zrna uglavnom odstranjuju u tehnološkom procesu prerade, belo brašno, instant cerealije i, u nekim zemljama, beli pirinač, obogaćuju se dodatkom ovog vitamina.

U većini životinjskih tkiva, preko 90% tiamina se nalazi u obliku fosfata, pretežno TDP-a. Izuzetke predstavljaju svinjska i pileća bela vlakna skeletnih mišića, gde je tiamin najvećim delom prisutan u obliku TTP-a (70-80%). Kravlje mleko pretežno sadrži slobodan tiamin. Tiamin koji je prirodno prisutan u cerealijama i drugoj hrani biljnog porekla, nalazi se uglavnom u slobodnom obliku, sa izuzecima pšeničnih klica i mekinja, gde je prisutan u obliku TDP-a. Beli hleb sadrži tiamin u obliku TDP-a, koji nastaje fosforizacijom tiamina, a koji se dodaje u cilju fortifikacije brašna, dok deo potiče od samih kvasaca.

Bioraspoloživost tiamina (stepen apsorpcije i iskorišćenja u ljudskom organizmu) je izuzetno visoka za većinu namirnica bogatih ovim vitaminom (Ball, 2006).

Tabela 2. Prosečan sadržaj vitamina B₁ u pojedinim namirnicama (Ball, 2006).

Namirnica	mg vitamina B₁/100 g obroka
Kravlje mleko, punomasno, pasterizovano	0,03
Kokoške jaje, celo, sirovo	0,09
Pšenično brašno, sa mekinjama	0,47
Pšenično brašno, belo	0,31 ^a
Pirinač, smeđi, sirovi	0,59
Goveđi odrezak, sirov	0,10
Jagnjeći odrezak, sirov	0,09
Svinjski odrezak, sirov	0,98
Pileće meso, sirovo	0,14
Jetra, jagnjeća, dinstana	0,38
Bakalar, sirov, u filetima	0,04
Krompir, sirov	0,21
Leblebija, osušena, sirova	0,39
Soja, osušena, sirova	0,61
Crveni pasulj, osušen, sirov	0,65
Grašak, sirov	0,74
Brokoli, sirov	0,10
Jabuke, sirove	0,03
Đus od narandže, nezslađen	0,08
Kikiriki	1,14
Ekstrakt kvasca	4,10

^aOva vrednost se odnosi na fortifikovano brašno. Nativni sadržaj vitamina B₁ u belom brašnu: 0 g/100g (Combs i McClung, 2017).

Stabilnost tiamina u hrani najviše zavisi od oblika u kome se hrana nalazi, vrednosti pH i temperature. Od svih vitamina B-kompleksa, tiamin je najosetljiviji na toplotu. Stabilan je u proizvodima sa malim sadržajem vode, na sobnoj temperaturi, u blago kiselim uslovima. U neutralnim uslovima, podložan je razgradnji usled toplote. Alkalna sredina tokom proizvodnje hrane dovodi do gubitka vitamina B₁ (npr. upotreba praška za pecivo, čiji je osnovni sastojak natrijum-hidrogenkarbonat, tokom procesa pečenja dovodi do gubitka od oko 50% ukupne količine vitamina prisutnog u brašnu, jer pri navedenim uslovima dolazi do oksidacije, a samim tim i do deaktivacije vitamina). Na povišenim temperaturama može da

podlegne Majlardovim reakcijama. Tiamin se delimično gubi i u procesu kuvanja. Veoma je osetljiv na prisustvo sulfita, koji se komercijalno koriste za očuvanje boje različitih prehrambenih proizvoda. Kao nukleofil, sulfidni jon je destruktivan po molekul tiamina: dolazi do razlaganja na pirimidinski i tiazolni prsten. Upotreba sulfita nije dozvoljena u mesnim i drugim proizvodima koji se smatraju važnim izvorima vitamina B₁. Ovaj vitamin je osetljiv na reaktivne kiseonične vrste. Proteinski vezan vitamin B₁ (u životinjskim tkivima) je prilično stabilan i u manjoj meri podleže uticajima visoke temperature i vrednosti pH prilikom pripremanja hrane. Zamrznuta i dehidrirana hrana uglavnom pretrpi male gubitke ovog vitamina. Za zamrznutu hranu, ovi gubici se odnose na oticanje tečnosti usled otapanja (Combs i McClung, 2017; Ball, 2006).

2.1.1.3. Antitiaminski faktori

Antitiaminski faktori su prirodne supstance čije se dejstvo ispoljava gubitkom biološke aktivnosti vitamina B₁. Neke od ovih supstanci menjaju hemijsku strukturu vitamina i podeljene su u dve grupe: termolabilni antitiaminski faktori – enzimi (tiaminaze) i termostabilni – biljni polifenoli (Ball, 2006). Druge vrste ovih jedinjenja predstavljaju analoge vitamina B₁, koji formiraju biološki neaktivne komplekse sa TPP enzimima (oksitiamin, 2-metil-tiamin i dr.) (Combs i McClung, 2017).

Tiaminaze su prisutne u tkivima ljuskara i riba, a proizvode ih i mikroorganizmi (Ball, 2006). Bakterijske tiaminaze su egzoenzimi, što znači da se formiraju na spoljašnjoj opni bakterijske ćelije, a njihova aktivnost zavisi od stepena otpuštanja, koje se u kiseloj sredini (npr. u rumenu preživara) vrlo brzo odvija (Combs i McClung, 2017). U vitalnim ćelijama tiamin je nedostupan za tiaminaze, ali prilikom oštećenja tkiva i kontakta enzima i vitamina, pri pH 4-8, dolazi do deaktivacije vitamina. Tiaminaze ispoljavaju svoje dejstvo tokom skladištenja i pripreme hrane, i *in vivo* ako dođe do prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Ovi enzimi se inaktiviraju toplotom, pa se termičkom obradom hrane koja ih sadrži, potpuno uništavaju.

Polifenoli koji pokazuju antitiaminsko dejstvo pripadaju hidroksi derivatima cimetne kiseline, flavonoidima i taninima. Ove termostabilne supstance su rasprostranjene u velikom broju

biljnih vrsta: čaju, kafi, pirinčanim mekinjama, borovnici, kupinama, crvenoj cikoriji, cvekli, crvenom kupusu i dr. (Ball, 2006). Neke studije su pokazale da uticaj polifenola na intestinalnu apsorpciju zavisi od sastava matriksa hrane, jer izolovani polifenoli nemaju uticaja na apsorpciju ovog vitamina u crevima (Calhau i sar., 2014).

2.1.1.4. Apsorpcija i transport vitamina B₁

Da bi se apsorbovao u crevima, tiamin mora da bude u slobodnom obliku, tj. oslobođen fosfatnih grupa. Defosforizacija se ostvaruje dejstvom enzima fosfataza i pirofosfataza, u gornjim delovima tankog creva. Slobodni (neesterifikovani) oblik tiamina se apsorbuje jednim od dva mehanizma: aktivnim transportom ili pasivnom difuzijom.

Aktivni transport se ostvaruje kada je koncentracija vitamina mala (<2 μmol/l), najvećim delom u mukoznom epitelu dvanaestopalačnog creva, posredstvom specifičnog, Na⁺-nezavisnog, pH-zavisnog, elektroneutralnog, proteinskim-katjonskim nosačima potpomognutog mehanizma (Nath i sar., 2017). Intestinalni transport tiamina može da bude smanjen dejstvom nekoliko faktora, kao što su hronična konzumacija alkohola ili fiziološko starenje. Nivo tiamina u organizmu utiče na apsorpciju obrnuto proporcionalno, što je hormonski regulisano, i direktno je povezan sa metabolizmom glukoze (Rufa i Rosini, 2015). Pasivna difuzija se odvija u uslovima visoke koncentracije tiamina (doza od oko 2,5 mg).

Prolazak vitamina B₁ kroz bazolateralnu membranu enterocita u krv je Na⁺-zavisna i odvija se uz hidrolizu ATP-a pod uticajem enzima Na⁺/K⁺-ATP-aze. Najveći deo ovog vitamina u serumu je nespecifično vezan za proteine, pretežno albumin. Oko 90% ukupnog tiamina u krvi (5-12 μg/dl) se nalazi u eritrocitima. Prolazak vitamina kroz ćelijsku membranu i ulazak u citoplazmu je omogućen proteinskim katjonskim nosačima. Nakon ulaska u ćeliju, vitamin B₁ se fosforizuje, a oblik TPP čini većinu unutarćelijskog vitamina B₁ (70-90%). Jedna trećina unutarćelijskog TPP-a dospeva u mitohondrije, gde se velikom brzinom vezuje za odgovarajuće proteine, ili se defosforizuje do TMP-a, koji se vraća u citoplazmu, u slobodnom obliku. Obe reakcije se odvijaju uz oslobađanje energije u vidu ATP-a.

Odrasli ljudski organizam skladišti od 30-50 mg tiamina, koji je pretežno raspoređen u tkivu skeletnih mišića, srca, mozga, jetre i bubrega, u obliku TPP-a. Nivo tiamina u pojedinim vrstama tkiva zavisi od same vrste tkiva, bez značajnije moći skladištenja ni u jednoj vrsti posebno (Combs i McClung, 2017).

2.1.1.5. Metabolizam vitamina B₁

Kao što je već navedeno, fosforizacijom tiamina mogu da nastanu tri proizvoda: TMP, TDP (TPP) i TTP. TMP se proizvodi od tiamina nespecifičnim fosfatazama uz utrošak energije u vidu ATP-a. TDP se formira uz dejstvo tiamin-difosfokinaze, u jetri i mozgu, takođe uz utrošak ATP-a. TTP se može formirati od TDP-a na dva načina: dejstvom adenilat-kinaze, koja se nalazi u citoplazmi skeletnih mišića, i hemiosmotskim mehanizmom, koji je sličan mehanizmu sinteze ATP-a u procesu mitohondrijalne oksidativne fosforilacije.

Fosfatni estri tiamina se mogu hidrolizovati nespecifičnim fosfatazama (alkalnim ili kiselim), kao i sa nekoliko specifičnih fosfataza. Trifostataze hidrolizuju TTP do TDP, a difosfataze hidrolizuju TDP do TMP. Hidroliza TMP-a do slobodnog tiamina se odvija pod uticajem nespecifičnih fosfohidrolaza prisutnih u mnogim tkivima.

Promet tiamina kroz tkiva je generalno visok. Višak vitamina, koji se ne vezuje u tkivu, izlučuje se velikom brzinom. Vreme poluživota vitamina B₁ u ljudskom tkivu je 10-20 dana. Tiamin se izlučuje preko urina, pretežno kao slobodan vitamin i TMP, u manjoj meri kao TPP, tiohrom, ili kao jedan od ostalih metabolita (Combs i McClung, 2017).

2.1.1.6. Metaboličke funkcije vitamina B₁

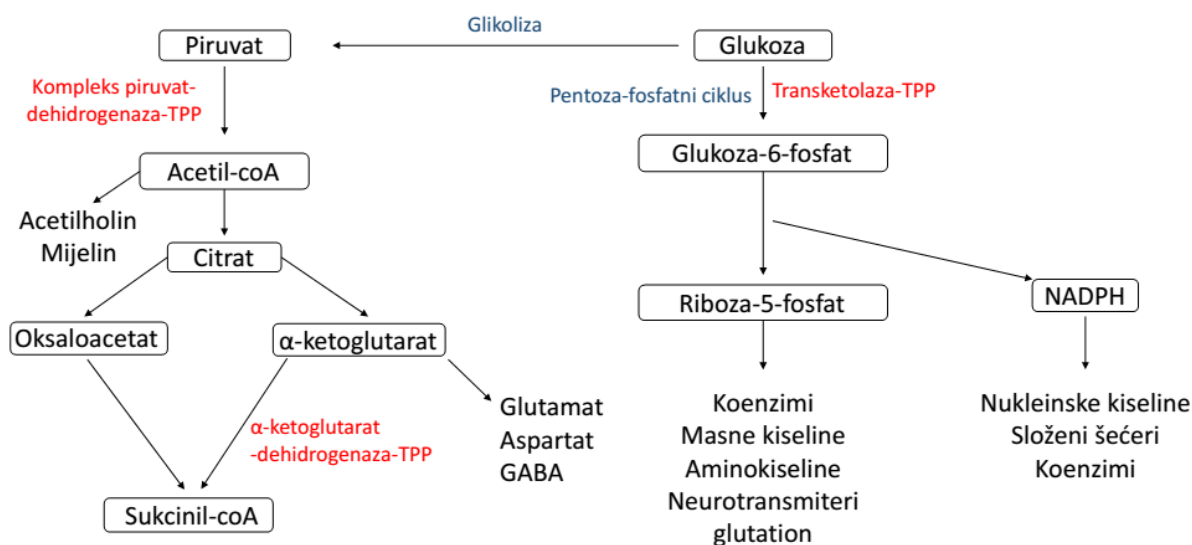
Tiamin-fosfatni estri imaju razne metaboličke uloge: ulogu kosupstrata, koenzima i neurološke uloge u organizmu.

Ulogu kosupstrata ima TTP, koji može da bude donor fosfatne grupe, npr. u reakciji fosforizacije pojedinih proteina, uključujući protein neuromuskularne sinapse – rapsin.

TPP (koji se još naziva kokarboksilaza) je esencijalni koenzim u sastavu pet enzimskih kompleksa: transketolaze, tri α -keto-kisele dehidrogenaze i liaze.

Transketolaza katalizuje transfer glikoaldehidne grupe između šećera. Tri α -keto-kisele dehidrogenaze katalizuju reakcije oksidativne dekarboksilacije. Liaza katalizuje razlaganje masnih kiselina nakon α -oksidacije. U svakoj od ovih reakcija, TPP ima klasičnu ulogu koenzima, funkcionišući kao energetski bogat fosfoanhidrid sa visokim potencijalom za transfer fosfatne grupe. Deprotonovanjem molekula TPP formira se karbanjon na C-2 položaju tiazolnog prstena, koji reaguje sa polarizovanom 2-karbonil-grupom supstrata (α -ketokiseline ili α -ketošećera) i slabi pojedine C-C veze, što rezultira oslobađanjem CO₂. Za više organizme, dekarboksilacija je oksidativnog karaktera, uz nastajanje karboksilne kiseline. Osnovni metabolički putevi koji uključuju vitamin B₁ su prikazani na Šemi 1.

Šema 1. Osnovni metabolički putevi koji uključuju vitamin B₁ (Nath i sar., 2017).



Acetil-coA – Acetil-koenzim A; Sukcinil-coA – Sukcinil-koenzim A; GABA – γ -aminobuterna kiselina.

Tiamin ima vitalnu ulogu u funkcionisanju nervnog sistema. Nervna stimulacija, bilo električna, bilo hemijska, rezultira defosforizacijom fosfatnih estara i oslobađanjem tiamina. Ključna uloga vitamina B₁ u funkcionisanju nervnog sistema se ogleda kroz tri karakteristična

patološka stanja: Vernik-Korsakof-ov sindrom, Alchajmerova i Parkinsonova bolest (Combs i McClung, 2017).

2.1.2. Vitamin B₂

Vitamin B₂, tj. *7,8-dimethyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypropyl]benzo[g]pteridine-2,4-dione*, koji se još naziva i riboflavin, predstavlja esencijalni faktor u metabolizmu ugljenih hidrata, aminokiselina i masti, a takođe učestvuje i u antioksidativnoj zaštiti ćelije i deluje antikancerogeno (Combs i McClung, 2017; Masek i sar., 2012; Ali i sar., 2008; Martin i sar., 2002). Ima važnu ulogu u sintezi hemoglobina i reguliše vid (Nezamzadeh-Ejhieh i Pouladsaz, 2014). Ovaj vitamin takođe povećava efikasnost konvencionalnih terapija kod raznih oboljenja kao što je stafilokokna infekcija (Juarez del Valle i sar., 2014) i deluje preventivno kod intestinalnog zapaljenja epitela indukovano upotrebom hemoterapijskog leka cisplatina (Bodiga i sar., 2012). Ulazi u sastav flavinskih koenzima kroz koje ispoljava svoje biološko delovanje: flavin adenin dinukleotid (FAD) i flavin mononukleotid (FMN). Pojedini flavoproteini (konjugovani proteini koji kao koenzim imaju FAD i FMN) su esencijalni za aktivaciju vitamina B₆ i B₉ i građenje njihovih koenzima (Combs, 2012). Neke od oksido-redukcionih reakcija u kojim učestvuju ovi koenzimi su oksidacija redukovano nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), oksidacija sukcinata do fumarata u ciklusu trikarboksilnih kiselina i oksidacija koenzima A u reakcijama β-oksidacije masnih kiselina (Ball, 2006). U ovim procesima flavinski koenzimi podležu redukciji u dva uzastopna jednoelektronska koraka, što omogućava jedno- i dvoelektronski transport u reakcijama katalisanim flavoenzimima (Combs i McClung, 2017). Redukovani flavini (FADH₂ ili FMNH₂) se reoksiduju u citohrom elektron-transportnom lancu. Flavinski koenzimi su neophodni i u specifičnim reakcijama interkonverzije vitamina B₆ i folatnih vitamina, kao i u reakcijama sinteze nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) od triptofana.

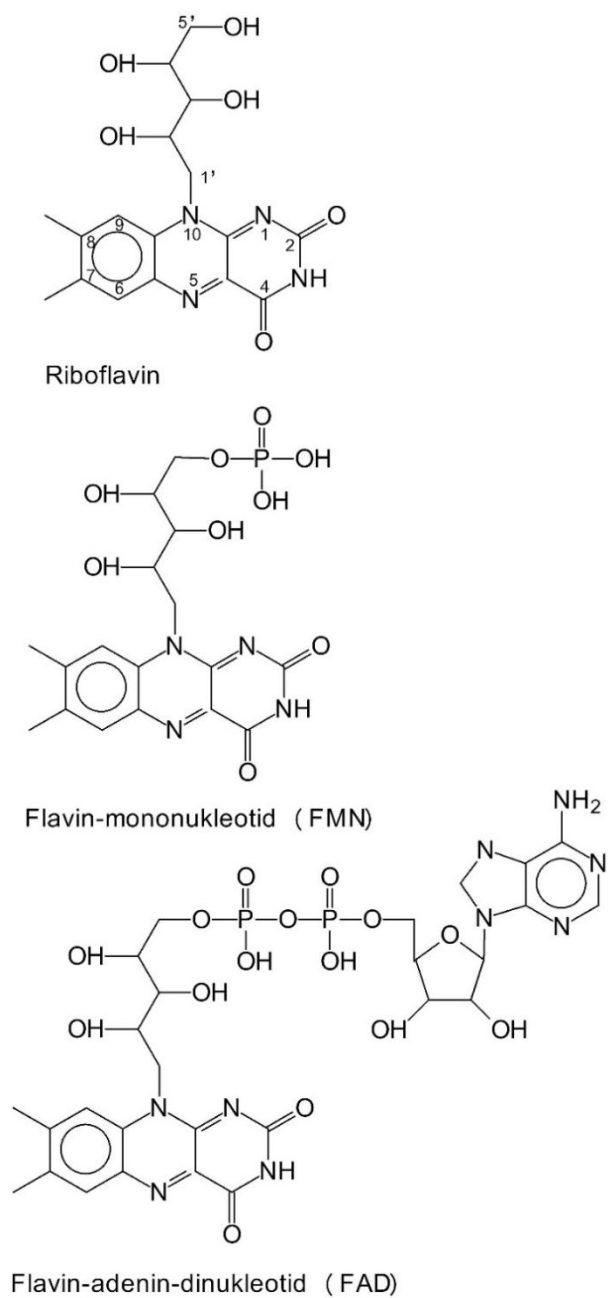
Kod ljudi nisu uočeni ozbiljni patološki simptomi koji se mogu pripisati nedostatku vitamina B₂, iako usled deficijencije, može doći do pojave lezija na koži i sluzokoži, intenzivne fotofobije i neuroloških poremećaja (Ball, 2006). Deficijencija se najpre manifestuje u tkivima sa veoma brzim ćelijskim metabolizmom, kao što je koža i sluzokoža, što je dodatni dokaz fundamentalne uloge riboflavina u metabolizmu (Combs i McClung, 2017).

2.1.2.1. Hemijska struktura, biopotencijal i fizičko-hemijske osobine vitamina B₂

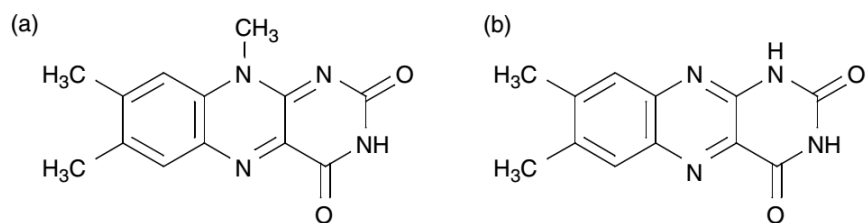
U prirodi se mogu naći tri vitamera vitamina B₂ jednakog vitaminskog potencijala: riboflavin, riboflavin-5'-fosfat (FMN) i riboflavin-5'-adenozildifosfat (FAD). U biološkim sistemima, riboflavin se fosforizuje do FMN i FAD (Combs i McClung, 2017). Strukture navedenih jedinjenja su predstavljene na Slici 2. Molekul riboflavina (C₁₇H₂₀N₄O₆, M = 376,36 g/mol) se sastoji od substituisanog izoaloksazinskog prstena sa ribitil bočnim nizom. U biološkim tkivima, FAD i, u manjoj meri FMN, predstavljaju koenzime za veliki broj flavinskih enzima (flavoproteina). Za većinu flavoproteina važi da su flavini vezani čvrstim vezama za apoenzim, ali ne i kovalentnim.

Riboflavin kristalizuje u obliku žutih do žuto-narandžastih kristala. Tačka topljenja iznosi 280 °C. Ovaj vitamin je bez mirisa, neprijatnog, gorkog ukusa. U neutralnim vodenim rastvorima, riboflavin fluorescira žuto-zeleno. Riboflavin je delimično rastvoran u vodi (10-13 mg/100 ml na sobnoj temperaturi) i apsolutnom etanolu (4,5 mg/100 ml). U razblaženoj hloridnoj kiselini je dobro rastvoran, kao i u razblaženim alkalijama, iako je u alkalnim uslovima nestabilan. Nerastvoran je u acetonu, dietiletru i hloroformu.

U čvrstom obliku, riboflavin je stabilan. U rastvoru, ovaj vitamin se razgrađuje pod uticajem UV zračenja i vidljive svetlosti, pri čemu se stepen degradacije povećava sa povećanjem temperature i vrednosti pH (Ball, 2006). Fotohemijska degradacija se odvija na bočnom ribitil lancu riboflavina (Combs i McClung, 2017). U neutralnim i kiselim uslovima nastaje fotodegradacioni proizvod lumihrom, dok u alkalnim uslovima nastaje lumiflavin (Slika 3). Ni jedan od ovih proizvoda ne pokazuje vitaminsku aktivnost. Ukoliko su zaštićeni od svetlosti, vodeni rastvori vitamina B₂, u pH opsegu između 2 i 5 su stabilni do temperature od 120 °C. Iznad pH 7, izoaloksazinski prsten se brzo razgrađuje na povišenim temperaturama. U odsustvu svetlosti, riboflavin je stabilan u prisustvu kiseonika i brojnih drugih oksidacionih agenasa (Ball, 2006).



Slika 2. Strukture riboflavina, FMN i FAD.



Slika 3. Fotodegradacioni proizvodi riboflavina: a) lumiflavin i b) lumihrom.

2.1.2.2. Izvori vitamina B₂, stabilnost u hrani i bioraspoloživost

Mikroflora debelog creva čoveka ima mogućnost sinteze riboflavina, međutim, još uvek nema jasnih dokaza o apsorpciji vitamina proizvedenog na ovaj način.

Kako su FMN i FAD neophodni koenzimi mnogih biohemijskih procesa, kako u biljnim, tako i u životinjskim ćelijama, flavini se mogu naći, makar u malim količinama, u svim vrstama prirodne neprocesuirane hrane. Posebno bogate izvore vitamina B₂ predstavljaju ekstrakt kvasca, džigerica (jetra) i bubrezi, a pšenične mekinje, jaja, meso, mleko i sir su takođe važni izvori ovog vitamina (Tabela 3). Žita celog zrna sadrže relativno male količine flavina, ali su ipak važan izvor ovog vitamina, jer predstavljaju jednu od osnovnih namirnica. Mlevenjem žita dolazi do značajnih gubitaka vitamina B₂ (do 60%), zbog čega se belo brašno obogaćuje vitaminom B₂. Obogaćivanje hleba i instant žitnih kaša značajno doprinosi unosu vitamina B₂. Polirani pirinač, kod koga takođe dolazi do gubitaka ovog vitamina usled poliranja, ne obogaćuje se njime. Žuta boja riboflavina bi pirinač učinila vizuelno neprivlačnim sa stanovišta populacija kojima je pirinač osnovna hrana (Ball, 2006). Izlaganjem celog zrna pirinča pari pre procesa mlevenja, riboflavin se, iz klice i aleuronskog omotača prevodi u endosperm, čime se potpuno sprečavaju gubici.

S obzirom da je riboflavin otporan na toplotu, sterilizacija i kuvanje hrane ne dovode do degradacije vitamina. Izloženost svetlosti može dovesti do značajnih gubitaka sadržaja ovog vitamina (npr. izloženost mleka koje je pakovano u staklenu ambalažu može dovesti do destrukcije više od polovine sadržaja riboflavina u toku jednog dana). Pod uticajem svetlosti, u hrani dolazi do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (superoksida, hidroksil radikala i dr.), koji reaguju sa vitaminom B₂ razgrađujući ga. Fotodegradacija riboflavina se ubrzava dodatkom natrijum-hidrogenkarbonata, koji se koristi kao stabilizator boje povrća. Do gubitaka može da dođe zbog prelaska vitamina u vodu u kojoj se hrana kuva (Combs i McClung, 2017).

Nekovalentno vezan oblik riboflavina u hrani, FMN, FAD i slobodan riboflavin, dobro se apsorbuju u tankom crevu. Suprotno slobodnom obliku, kovalentno vezan vitamin u flavinski kompleks, koji se pretežno nalazi u biljnim tkivima, rezistentan je prema digestiji, i time neraspoloživ. Riboflavin poreklom iz životinjskih tkiva ima veću bioraspoloživost od onog

poreklom iz biljnih tkiva (Combs, 2012). Kravlje mleko pretežno sadrži slobodan riboflavin, dok FMN i FAD sadrži u veoma malim količinama. U punomasnom mleku, 14% flavina je nekovalentnim vezama vezano za specifične proteine. Jaja (i žumance i belance), sadrže posebne riboflavin-vezujuće proteine, koji imaju zaštitnu ulogu, jer čuvaju riboflavin u jajetu za embrionalni razvoj (Ball, 2006).

Tabela 3. Prosečan sadržaj vitamina B₂ u pojedinim namirnicama (Ball, 2006).

<i>Namirnica</i>	<i>mg vitamina B₂/100 g obroka</i>
Kravlje mleko, punomasno, pasterizovano	0,23
Sir, čedar	0,39
Kokoške jaje, celo, sirovo	0,47
Pšenično brašno, sa mekinjama	0,09
Pšenično brašno, belo	0,03
Pirinač, smeđi, sirovi	0,07
Goveđi odrezak, sirov	0,21
Jagnjeći odrezak, sirov	0,20
Svinjski odrezak, sirov	0,24
Pileće meso, sirovo	0,18
Jetra, jagnjeća, dinstana	5,65
Bakalar, sirov, u filetima	0,05
Krompir, sirov	0,02
Leblebija, osušena, sirova	0,24
Soja, osušena, sirova	0,27
Crveni pasulj, osušen, sirov	0,19
Grašak, sirov	0,02
Brokoli, sirov	0,06
Jabuke, sirove	0,02
Đus od narandže, nezaslađen	0,02
Kikiriki	0,10
Ekstrakt kvasca	11,90

2.1.2.3. Apsorpcija i transport vitamina B₂

FMN i FAD koji su prisutni u hrani oslobađaju se nekovalentnih veza sa flavoproteinima dejstvom hlorovodonične kiseline u želucu, kao i želudačnom i crevnom proteolizom. Riboflavin, koji je vezan u kompleks sa riboflavin-vezujućim proteinima, oslobađa se na isti način. Flavinski koenzimi se hidrolizuju u gornjim delovima tankog creva do slobodnog riboflavina, koji se potom apsorbuje. Hidroliza se ostvaruje dejstvom alkalnih fosfataza, koje su lokalizovane u membrani enterocita. U ovim reakcijama učestvuju i FMN-fosfataza i FAD-pirofosfataza, takođe smeštene u membrani enterocita. Apsorpcija oslobođenog riboflavina se ostvaruje u tankom crevu, energetski potpomognutim transportom, kada su u pitanju fiziološke koncentracije vitamina, i slobodnom difuzijom, pri povišenim koncentracijama. U ovim procesima, važnu ulogu imaju i žučne soli. Transport riboflavina kroz membranu enterocita je Na⁺-nezavisan i elektroneutralan proces (Ball, 2006).

Deo apsorbovanog riboflavina se fosforizuje do FMN-a, u citoplazmi enterocita, dejstvom ATP-zavisne flavokinaze. Riboflavin dospeva u krvotok u slobodnom obliku i u obliku FMN-a.

Transport slobodnog riboflavina i FMN-a kroz krvnu plazmu može da bude nespecifičan i specifičan. Nespecifičan transport podrazumeva stvaranje vodonične veze između vitamina i proteina plazme (albumina, i imunoglobulina: IgA, IgG i IgM). Specifičan transport se ostvaruje posebnim, riboflavin-vezujućim proteinima. Prolazak riboflavina kroz ćelijsku membranu i ulazak u ćeliju je omogućen dejstvom riboflavin-vezujućih proteinskih receptora lokalizovanih na ćelijskoj membrani. Ovaj vitamin u ćelije dospeva u slobodnom obliku, ali se u tkivima konvertuje u koenzimski oblik, pretežno FMN, i u manjoj meri FAD, koji se potom vezuju u flavoproteine. Najveće količine vitamina se nalaze u tkivu jetre, bubrega i srca. U većini tkiva, slobodni riboflavin čini manje od 2% ukupnih flavina (Combs i McClung, 2017).

2.1.2.4. Metabolizam vitamina B₂

Konverzija riboflavina u FMN se odvija ATP-zavisnim procesom fosforizacije u citoplazmi većine ćelija. Ovaj proces je enzimski katalizovan flavokinazom, uz Zn²⁺-jon kao aktivator.

Tiroksin ima ulogu stimulatora flavokinaze. Najveći deo FMN se konvertuje u FAD, takođe enzimski, FAD-sintetazom.

Flavini vezani za proteine su otporni prema degradaciji, dok se FAD i FMN oblik transformiše unutar ćelije, u mitohondrijama i citoplazmi, dejstvom enzima različitih izoformi. FAD se prevodi do FMN-a dejstvom FAD-pirofosfataze (uz oslobađanje energije u vidu AMP-a), a FMN se razlaže do slobodnog riboflavina dejstvom FMN-fosfohidrolaze. FAD i FMN se razlažu do slobodnog riboflavina dejstvom alkalnih fosfataza, koji potom izlazi iz ćelije. Degradacija riboflavina podrazumeva hidroksilaciju izoaloksazinskog prstena citohrom P450-zavisnim procesom koji se odvija u jetri.

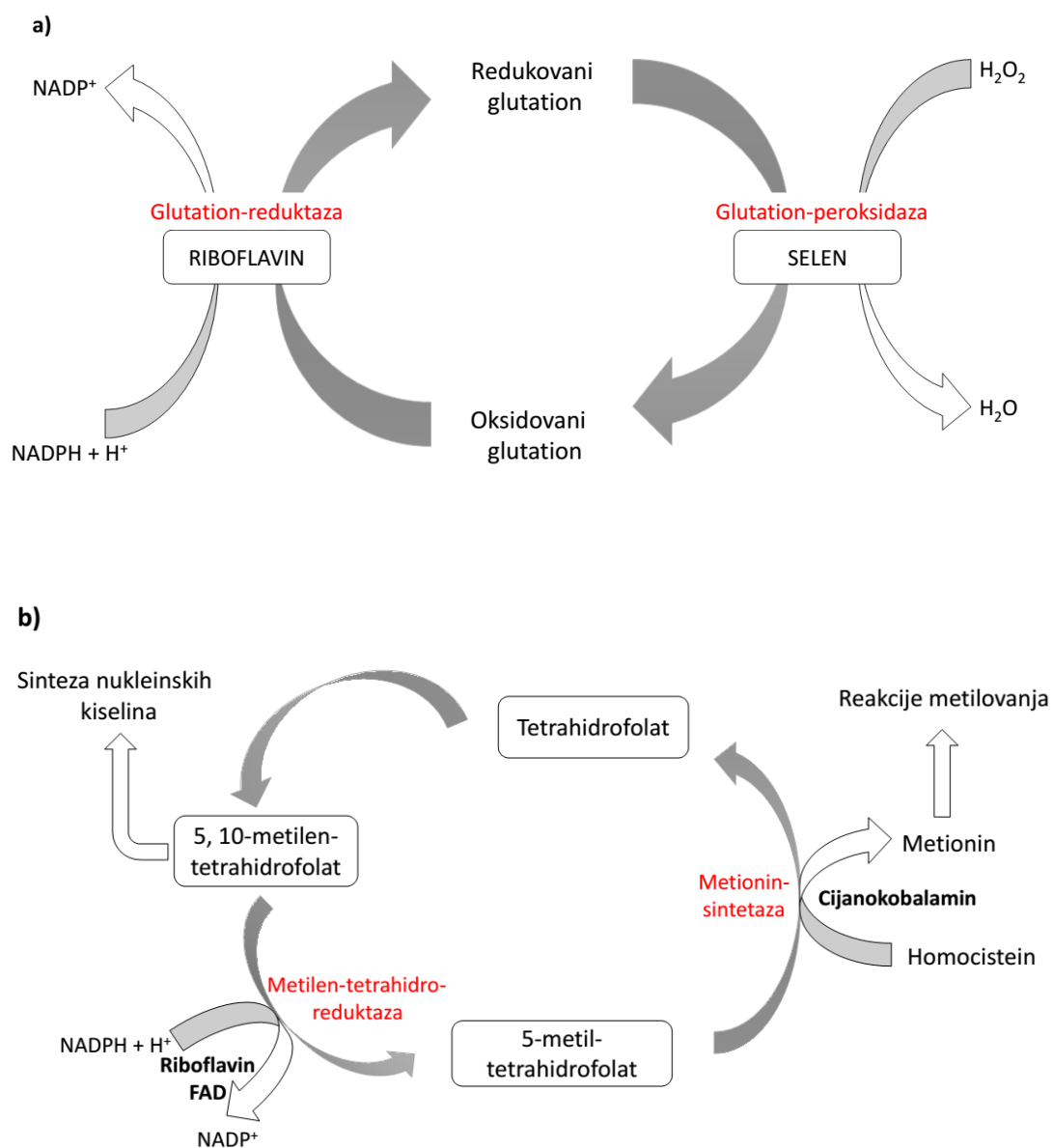
Izlučivanje riboflavina se odvija izuzetno brzo, pretežno putem urina. Zbog toga su dnevne potrebe za ovim vitaminom određene stepenom izlučivanja, a ne efikasnošću metabolizma. Vitamin se izlučuje uglavnom u slobodnom obliku (60-70%), a u manim količinama u vidu metabolita 7 α - 8 α -hidroksiriboflavin, riboflavin-5'- α -D-glukozid, 8 α -sulfonilriboflavin, lumihrom i dr. Kod sisara se ovaj vitamin izlučuje u mleko najvećim delom u slobodnom obliku i kao FAD, a u manjoj meri u obliku metabolita (Combs i McClung, 2017).

2.1.2.5. Metaboličke funkcije vitamina B₂

Već je istaknuto da FMN i FAD, koenzimi čiju esencijalnu komponentu čini riboflavin, imaju ulogu intermedijera u transportu elektrona u biohemijskim oksidoredukcionim reakcijama. Više od 100 enzima u životinjskim i mikrobnim ćelijama vezuje FMN i FAD, pri čemu FAD predstavlja kofaktor za oko 84% flavoenzima, dok je FMN kofaktor za oko 16% (Combs i McClung, 2017). Na Šemi 2a) predstavljen je redoks ciklus glutaciona koji ima veoma važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti organizma od reaktivnih kiseoničnih vrsta (npr. vodonik-peroksida). Jedan molekul vodonik-peroksida se redukuje u dva molekula vode, dok se dva molekula glutaciona oksiduju u reakciji katalisanoj enzimom glutation-peroksidazom, za čije je delovanje neophodan selen. Oksidovani glutation može da se redukuje dejstvom FAD-zavisnog enzima, glutation-reduktaze.

Na Šemi 2b) dat je pojednostavljen prikaz metabolizma folata i nukleinskih kiselina. Za sintezu nukleinskih kiselina potrebno je dejstvo enzima 5,10-metilen-tetrahidrofolata, dok je za sintezu metionina iz homocisteina neophodan 5-metil-tetrahidrofolat. Metionin, u obliku S-adenozila, neophodan je u mnogim biološkim reakcijama metilovanja, uključujući metilovanje DNK. Metilen-tetrahidrofolat reduktaza je flavin-zavisni enzim koji katalizuje redukciju 5,10-metilen-tetrahidrofolata do 5-metil-tetrahidrofolata.

Šema 2. Neke metaboličke uloge vitamina B₂: a) oksido-redukциони ciklus glutationa; b) metabolizam folata i nukleinskih kiselina (Linus Pauling Institute, 2017).



2.1.3. Vitamin B₃

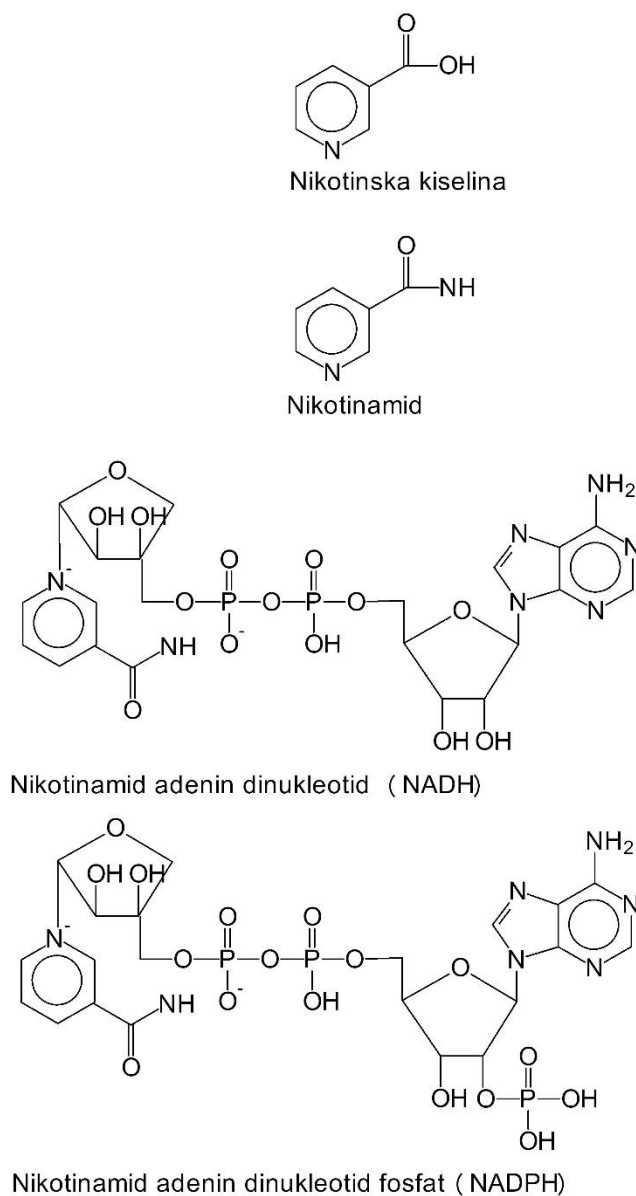
Vitamin B₃ (niacin) je generički naziv za dva vitamena jednake vitaminske aktivnosti – nikotinsku kiselinu i nikotinamid (*pyridine-3-carboxylic acid* i *pyridine-3-carboxamide*). U ljudskom organizmu, nikotinska kiselina se prevodi u nikotinamid. Nikotinamid predstavlja reaktivni deo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP), čija je jedna od osnovnih funkcija u organizmu transport protona i elektrona u nizu oksidoredukcionih reakcija koje obezbeđuju energiju razgradnjom ugljenih hidrata, masnih kiselina i aminokiselina, kao i sintezu neophodnih masnih kiselina, aminokiselina i pentoza. Niacin može biti sintetisan *in vivo* iz esencijalne aminokiseline L-triptofana. Prosečan unos proteina putem ishrane obezbeđuje dovoljan unos triptofana, zadovoljavajući time potrebe organizma za niacinom, pa je primarna deficijencija ovog vitamina retka. Sekundarna deficijencija je moguća usled gastrointestinalnih poremećaja ili alkoholizma. Deficijencija niacina rezultuje pelagrom, oboljenjem koje se u vidu epidemije javljalo u populacijama koje su se pretežno hranile kukuruzom, jer je zein, glavni protein kukuruza, siromašan u sadržaju triptofana. Odgovarajuća priprema kukuruza omogućava oslobađanje nikotinske kiseline iz vezanog oblika, a podrazumeva tretman rastvorom Ca(OH)₂ ili drvnim pepelom, kojima se postižu alkalni uslovi neophodni za oslobađanje vitamina. Rani simptomi pelagre su tremor, iritiranost, anksioznost i depresija, dok se delirijum i demencija mogu javiti u odmaklim fazama bolesti. Ukoliko se ne leči, bolest je fatalna (Ball, 2006).

2.1.3.1. Hemijska struktura, biopotencijal i fizičko-hemijske osobine vitamina B₃

Hemijske strukture nikotinske kiseline (C₆H₅O₂N, M = 123,11 g/mol), nikotinamida (C₆H₆ON₂, M = 122,12 g/mol) i nikotinamid-nukleotidnih koenzima, koji se sastoje od jezgra (adenin-monofosfata – AMP) i pseudonukleotida u čiji sastav ulazi nikotinamidna jedinica, predstavljene su na Slici 4.

Oksidovani oblici koenzima su pozitivno naelektrisani (NAD^+ i NADP^+), dok su redukovani oblici predstavljeni kao NADH i NADPH .

Najveći deo ćelijskog NAD i NADP , koji je skladišten u citoplazmi, vezan je za proteine, iako su koenzimi veoma slabim vezama povezani sa apoenzimom.



Slika 4. Hemijska struktura nikotinske kiseline, nikotinamida, NADH i NADPH .

Pošto se u ovoj disertaciji određivao nikotinamid, biće više reči o njegovim fizičko-hemijskim osobinama. Ova supstanca kristalizuje u vidu bezbojnih iglica. Temperatura topljenja je 129°C . Bez mirisa je, gorkog ukusa. Veoma dobro se rastvara u vodi (100 g/100 ml) i etanolu

(67 g/100 ml). U acetonu, dietiletru i hloroformu se veoma slabo rastvara. Nikotinamid nije osetljiv na dejstvo atmosferskog kiseonika, svetlost, ni toplotu, ako je u čvrstom stanju ili u neutralnim rastvorima (Ball, 2006), dok se u kiselim i alkalnim uslovima hidrolizuje do nikotinske kiseline (Combs i McClung, 2017). Oksidovani oblici koenzima (NAD^+ i NADP^+) su nestabilni u alkalnoj sredini, a redukovani oblici (NADH i NADPH) su nestabilni u kiseloj sredini (Ball, 2006).

2.1.3.2. Izvori vitamina B_3 , stabilnost u hrani i bioraspoloživost

Mikroflora debelog creva u ljudskom organizmu ima mogućnost sinteze vitamina B_3 , ali apsorpcija ovako sintetisanog vitamina još uvek nije naučno dokazana (Combs i McClung, 2017).

Zbog mogućnosti sinteze niacina iz triptofana, hrana izbalansiranog sadržaja, koja je bogata proteinima, značajno doprinosi ukupnom unosu niacina. Sadržaj niacina, triptofana i ukupni niacinski ekvivalent u pojedinim vrstama hrane dat je u Tabeli 4. Nemasno crveno meso, živinsko meso i meso jetre sadrže znatne količine niacina i triptofana, i zajedno sa mahunarkama, predstavljaju jedne od najvažnijih izvora ovog vitamina. U mesu, niacin je prisutan uglavnom u obliku nikotinamida formiranog *postmortem*, hidrolizom NAD. Kikiriki buter predstavlja izvanredan izvor niacina. Sir i jaja su relativno siromašni u sadržaju niacina, ali zbog visokog proteinskog sadržaja, ove namirnice imaju visok niacinski ekvivalent. Voće i povrće obezbeđuje znatne količine ovog vitamina, u zavisnosti od dnevnog unosa. Tokom procesa prženja kafe, znatne količine niacina nastaju u reakciji demetilacije trigonelina (N-metil-nikotinske kiseline). Za fortifikaciju ili obogaćivanje hrane, koristi se slobodni nikotinamid, zbog visoke rastvorljivosti u vodi.

U zrelim zrnima žita, najveći deo niacina nalazi se u obliku vezane nikotinske kiseline koncentrisane u aleuronskom sloju i klici. Mlevenjem, u cilju proizvodnje belog brašna, ukloni se skoro celokupna količina vitamina, koja ostaje u mekinjama.

Tabela 4. Prosečan sadržaj vitamina B₃ u pojedinim namirnicama (mg/100 g obroka)
(Ball, 2006).

<i>Namirnica</i>	<i>Vitamin B₃ (mg/100 g)</i>	<i>Niacinski ekvivalent^a</i>	<i>Ukupni niacinski ekvivalent</i>
Kravlje mleko, punomasno, pasterizovano	0,2	0,6	0,8
Sir, čedar	0,1	6,8	6,9
Kokoške jaje, celo, sirovo	0,1	3,7	3,8
Pšenično brašno, sa mekinjama	5,7	2,5	8,2
Pšenično brašno, belo	1,7 ^b	1,9	3,6
Pirinač, smeđi, sirovi	5,3	1,5	6,8
Goveđi odrezak, sirov	5,0	4,7	9,7
Jagnjeći odrezak, sirov	5,4	3,9	9,3
Svinjski odrezak, sirov	6,9	4,5	11,4
Pileće meso, sirovo	7,8	4,3	12,1
Jetra, jagnjeća, dinstana	19,9	4,9	24,8
Bakalar, sirov, u filetima	2,4	3,4	5,8
Krompir, sirov	0,6	0,5	1,1
Leblebija, osušena, sirova	1,9	2,9	4,8
Soja, osušena, sirova	2,2	5,7	7,9
Crveni pasulj, osušen, sirov	2,1	3,5	5,6
Grašak, sirov	2,5	1,1	3,6
Brokoli, sirov	0,9	0,8	1,7
Jabuke, sirove	0,1	0,1	0,2
Banane	0,7	0,2	0,9
Đus od narandže, nezaslađen	0,2	0,1	0,3
Kikiriki	13,8	5,5	19,3
Ekstrakt kvasca	64,0	9,0	73,0
Instant kafa	24,8	2,9	27,7

^aNiacinski ekvivalent = Triptofan mg/60; ^bova vrednost se odnosi na fortifikovano brašno.

Niacin je stabilan tokom procesuiranja hrane, skladištenja i kuvanja. U termički neobrađenoj hrani, niacin je prisutan kao NAD ili NADP, ali tokom termičkog tretmana, ovi nukleotidi, u izvesnoj meri, podležu hidrolizi do slobodnog nikotinamida. Upotreba praška za pecivo

oslobađa veliki deo vezanog vitamina iz brašna, tokom pečenja. Tretman pirinča vrelom vodenom parom pre mlevenja, ne povećava sadržaj niacina poliranog zrna, kao što je to slučaj za ostale vitamine B-grupe, jer nikotinska kiselina u svom vezanom obliku ne difunduje u endosperm (Ball, 2006).

Biraspoloživost niacina zavisi od oblika u kome se ovaj vitamin nalazi. U mnogim vrstama hrane, niacin se može naći u sastavu kompleksa iz koga se ne može osloboditi digestijom, što onemogućava apsorpciju. U zrnima žita, niacin je prisutan u obliku kovalentno vezanih kompleksa sa peptidima i ugljenim hidratima male molekulske mase, koji se jednim imenom zovu niacitin. Esterifikovani niacin u ovim kompleksima nije dostupan. Bioraspoloživost se može značajno povećati tretmanom alkalne hidrolize. U centralnoj Americi, kukuruz se, tradicionalno, potapa i kuva u vodenom rastvoru $\text{Ca}(\text{OH})_2$, koji obezbeđuje alkalne uslove sredine i oslobađa niacin iz kompleksa (Combs i McClung, 2017). Još jedan od načina oslobađanja niacina je tretman drvnim pepelom, koji je takođe alkalni i oslobađa vezanu nikotinsku kiselinu (Ball, 2006). Ovakva praksa pripremanja hleba u ovom delu sveta je štitila stanovništvo od pelagre.

Trigonelin, metilovani derivat niacina, koji ima ulogu biljnog hormona, nije, kao takav, bioraspoloživ, ali je termolabilan, pa do oslobađanja nikotinske kiseline dolazi na povišenim temperaturama (Combs i McClung, 2017).

2.1.3.3. Apsorpcija i transport vitamina B₃

Najčešći oblici niacina u hrani životinjskog porekla su NAD i NADP (sem u slučaju mesa i mleka, gde je ovaj vitamin prisutan u slobodnom obliku) (Ball, 2006). Ovi oblici se razgrađuju do slobodnog nikotinamida, koji može da se apsorbira. Oba oblika koenzima mogu da se razgrade pod uticajem intestinalnog enzima NAD(P)^+ -glikohidrolaze, na nikotinamid i ADP-ribozu, nikotinamid mononukleotid i 5'-AMP, ili dejstvom fosfodiesteraze na nikotinamid-ribozu i ADP. Defosforilacijom nikotinamid mononukleotida takođe nastaje nikotinamid-ribozid, koji hidrolizom može da se konvertuje do nikotinamida, pri čemu nastaje riboza, ili fosforilacijom, pri čemu nastaje riboza-1-fosfat.

Niacin se apsorbira u želucu i tankom crevu. I nikotinska kiselina i nikotinamid se apsorbiraju u malim koncentracijama, putem Na^+ -zavisne difuzije, organskim jonskim transportom. U velikim dozama vitamina, apsorpcija se odvija pasivnom difuzijom.

Niacin se transportuje u portalni krvotok kao slobodni nikotinamid i nikotinska kiselina. Kako se nikotinska kiselina prevodi u nikotinamid, nivo nikotinamida u krvi premašuje nivo nikotinske kiseline. Nikotinamid i nikotinska kiselina prelaze u eritrocite, ćelije jetre i većinu perifernih tkiva putem difuzije, nakon čega se prevode u nukleotide. Niacin se skladišti u jetri i drugim tkivima, koja ga preuzimaju u slobodnom obliku i prevode u piridin-nukleotide NAD i NADP. Najveći deo ovog enzima nalazi se u obliku NAD, koji se, za razliku od NADPH, pretežno nalazi u oksidovanom stanju NAD^+ (Combs i McClung, 2017).

2.1.3.4. Metabolizam vitamina B₃

Postoje tri izvora piridinskih nukleotida: nikotinska kiselina, nikotinamid i triptofan. Nikotinska kiselina i nikotinamid se prevode istim metaboličkim putem do NAD^+ , nakon deaminacije nikotinamida. U molekul nastale nikotinske kiseline se uvodi fosforiboza (dejtstvom enzima nikotinat-fosforibozil-transferaze), adenil-grupa (dejtstvom deamino- NAD^+ -pirofosforilaze, i amino-grupa (dejtstvom NAD^+ -sintetaze). Nastali NAD^+ se može fosforizovati dejtstvom ATP-zavisne NAD^+ -kinaze, pri čemu nastaje NADP^+ .

Sve životinjske vrste, uključujući i čoveka, u različitoj meri imaju sposobnost sinteze metabolički aktivnog oblika niacina, NAD ili NADP. Biosinteza uključuje nekoliko koraka:

1. Oksidativno cepanje triptofan-pirolskog prstena dejtstvom enzima triptofan-pirolaze, pri čemu nastaje N-formil-kinurenin,
2. Cepanje formil-grupe dejtstvom enzima formilaze, pri čemu nastaje kinurenin,
3. Flavin adenin-zavisna hidroksilacija kinurenina kinurenin-3-hidroksilazom, pri čemu nastaje 3-hidroksi-kinurenin,
4. Deaminacija 3-hidroksi-kinurenina, piridoksal-fosfat-zavisnom transaminazom, pri čemu nastaje ksanturenska kiselina (koja se može izlučivati preko urina, ili metabolisati),

5. Cepanje alaninskog ostatka sa lanca ksanturenske kiseline piridoksal-fosfat-zavisnim enzimom kinureninazom; nastaje 3-hidroksi-antranilinska kiselina,
6. Oksidativno otvaranje prstena 3-hidroksi-antranilinske kiseline Fe^{2+} -zavisnom dioksigenazom, pri čemu nastaje delimično stabilni α -amino- β -karboksimumkonski- ϵ -semialdehid. Ova reakcija predstavlja tačku grananja u metabolizmu:
 - α -amino- β -karboksimumkonski- ϵ -semialdehid dejstvom dekarboksilaze, može da se konvertuje u α -aminomukonski- ϵ -semialdehid, koji se redukuje i potom dekarboksiluje do acetil-koenzima A,
 - Ako se α -amino- β -karboksimumkonik- ϵ -semialdehid akumulira, određena količina spontano se metabolizuje na jedan od dva načina. Prvi podrazumeva dehidraciju, uz nastajanje kinolinske kiseline, koja se dekarboksiluje, uz uvođenje fosforiboze dejstvom fosforibozil-transferaze, pri čemu nastaje nikotinamid mononukleotid. Nikotinamid mononukleotid se prevodi u NAD^+ ATP-zavisnom NAD^+ -sintetazom. Drugi način metabolisanja podrazumeva dekarboksilaciju semialdehida i nastajanje pikolinske kiseline.

Konverzija triptofana u NAD nije energetski efikasan proces. Istraživanja su pokazala da je za 1 mg NAD ljudskom organizmu potrebno oko 60 mg triptofana. Ipak, procenjuje se da niacin-deficitarne osobe koriste oko 3% unetog triptofana za biosintezu niacina, što zadovoljava oko 2/3 potreba za ovim vitaminom (Combs i McClung, 2017).

Piridinski nukleotidi se razlažu hidrolitičkim cepanjem β -glikozidnih veza, dejstvom NAD(P)^+ -glikohidrolaze. Oslobođeni nikotinamid se deaminacijom može prevesti u nikotinsku kiselinu, koja se može ponovo prevesti u NAD^+ . Alternativno, nikotinska kiselina se može metilovati u jetri, dejstvom N-metiltransferaze, pri čemu nastaje 1-metilnikotinamid, koji se dalje može oksidovati do različitih produkata. Nastali produkti se mogu izlučivati putem urina (Combs i McClung, 2017).

Različiti hidrosolubilni metaboliti ovog vitamina se izlučuju putem urina. Kod uobičajenog unosa vitamina, najvažniji metaboliti u urinu su 1-metilnikotinamid i njegov oksidacioni proizvod 1-metil-6-piridon-3-karboksamid (Combs i McClung, 2017).

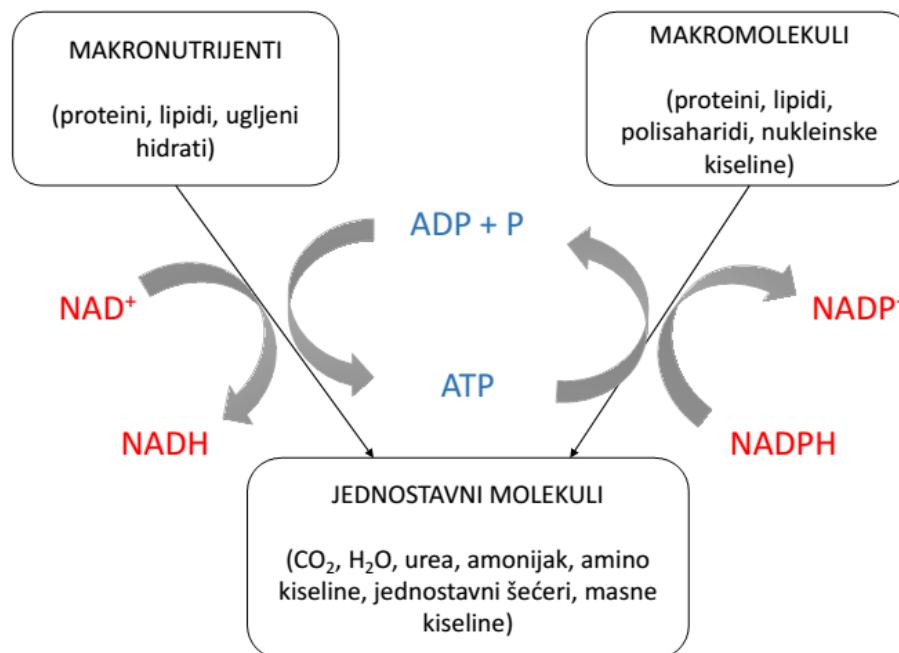
2.1.3.5. Metaboličke funkcije vitamina B₃

Niacin u organizmu funkcionira kao esencijalna komponenta enzimskih kosupstrata NAD i NADP. Oba koenzima imaju ulogu intermedijera u metaboličkim reakcijama transporta vodonika, uključujući oko 500 reakcija u kojima učestvuju ugljeni hidrati, masne kiseline i aminokiseline. Svaka od ovih reakcija se odvija prema opštem mehanizmu:



Ulogu prenosioca oba elektrona u dvoelektronskom transportu vodonika posredstvom navedenih koenzima ima hidridni jon (H^-). Transport je stereospecifičan i uključuje C-4 pozicije na piridinskom prstenu koenzima. Atomi vodonika na C-4 pozicijama u molekulu NAD(H) i NADP(H) nisu ekvivalentni, tj. svaki se stereospecifično prenosi do odgovarajućeg supstrata. Reakcije koje su katalisane piridin-nukleotid-zavisnim dehidrogenazama podrazumevaju odvajanje protona iz alkoholne grupe supstrata i prenos hidridnog jona sa istog C-atoma na C-4 poziciju nikotinamida. Nakon ove reakcije slede reakcija fosforilacije ili dekarboksilacije. Uprkos sličnostima u mehanizmu i strukturi, NAD(H) i NADP(H) imaju različite metaboličke funkcije i većina dehidrogenaza je specifična za jedan ili drugi koenzim. Pojednostavljen prikaz metaboličke funkcije vitamina B₃ je predstavljen na Šemi 3.

Šema 3. Metaboličke uloge vitamina B₃ (pojednostavljen prikaz) (Linus Pauling Institute,2017).



2.2. Analitičke metode za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₃

Vitamini B₁, B₂ i B₃, nakon odgovarajuće pripreme uzoraka (koja zavisi od vitamina koji se određuje, sastava uzorka i primenjene tehnike određivanja), mogu biti određeni biohemijskim (mikrobiološkim) i instrumentalnim metodama analize.

Mikrobiološke metode se tradicionalno koriste za određivanje vitamina grupe B. Pogodne su za procenu ukupne vitaminske aktivnosti hrane, jer se mogu primeniti za određivanje svih vitamina B grupe i dovoljno su osetljive za merenje prirodno prisutnih vitamina u hrani. Odabir mikroorganizama se vrši na osnovu njihovih specifičnih potreba za određenim oblikom vitamina, koji je biološki aktivan u ljudskom organizmu (Ball, 2006). Ove metode su veoma specifične (selektivne), ali zahtevaju dosta vremena, komplikovane su za izvođenje i nemaju zadovoljavajuću preciznost, zbog čega je njihova primena u analitičke svrhe, u

savremenim analizama, sve ređa (Fatima i sar., 2019). Puna vrednost ovih metoda postiže se u kombinaciji sa instrumentalnim metodama analize (Marjanović, 2001).

U okviru instrumentalnih metoda analize, za određivanje vitamina grupe B danas se najčešće koriste hromatografske metode i optičke metode, odnosno, kombinacija ovih metoda, gde se nakon hromatografskog razdvajanja za detekciju razdvojenih komponenata primenjuje neka optička metoda (spektrofotometrija ili fluorimetrija). Optičke instrumentalne metode se samostalno mogu primeniti samo pri analizi uzoraka sa jednostavnim matriksom, a u drugim slučajevima uzorak se mora pripremiti primenom neke od metode razdvajanja. Fluorimetrijske metode predstavljaju oficijelne metode za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₃ (AOAC, 64, 1981; 58, 1975; 53, 1970). Fluorimetrija je analitička tehnika kojom se identifikacija supstanci i određivanje njene koncentracije vrši na osnovu luminescencije. Za mnoge organske molekule raspodela talasnih dužina emisionog spektra predstavlja jedinstvenu karakteristiku molekula (Kropp, 1974). Ove metode su veoma osetljive, ali su, ako se primenjuju samostalno, pogodne samo za analize uzoraka jednostavnog matriksa, kao što su različiti napici ili vitaminski preparati (Jenčo i sar., 2017; Hucker i sar., 2011).

Tankoslojna hromatografija je veoma jednostavna tehnika za razdvajanje komponenata smeše u cilju izolovanja jednog jedinjenja ili ispitivanja čistoće same smeše. Ova tehnika ne zahteva skupu instrumentaciju (Santiago i Strobel, 2013). Po tačnosti, metode koje se zasnivaju na ovoj tehnici su polukvantitativne i koriste se za preliminarnu identifikaciju analita iznad određene koncentracije, nakon čega se on dalje uglavnom određuje nekom tačnijom metodom. Ove metode su relativno male preciznosti i imaju malu osetljivost. Povećanje osetljivosti ovih metoda se postiže odabirom odgovarajuće stacionarne i mobilne faze, primenom instrumenata za automatsko nanošenje uzoraka, dvodimenzionalne hromatografije i osetljivih detektora (npr. denzitometrijom, Ramanskom spektroskopijom, infracrvenom spektroskopijom i masenom spektroskopijom). Tankoslojna hromatografija, čije su karakteristike poboljšane na navedeni način, naziva se tankoslojna hromatografija visokih performansi (*High-performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC). Uspešno je primenjena za određivanje hidrosolubilnih vitamina kao i njihovih metabolita, u različitim farmaceutskim vitaminskim preparatima i biološkim uzorcima (Cimpoi i Hosu, 2007).

Kapilarna elektroforeza predstavlja visokoefikasnu tehniku, ali ima relativno nisku osetljivost. Povećanje osetljivosti se postiže kombinacijom tehnika, odnosno, primenom

osetljivih detektora (npr. laserski indukovani fluorescentni detektor), uz prethodnu ekstrakciju analita odgovarajućim postupkom. Najčešće korišćene tehnike kapilarne elektroforeze za određivanje hidrosolubilnih vitamina su kapilarna zonska elektroforeza, micelarna elektrokinetička hromatografija i kapilarna elektrochromatografija (Fatima i sar., 2019).

Najčešće primenjivana tehnika za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₃ je visokopritisna tečna hromatografija (*High Pressure Liquid Chromatography, HPLC*), koju, u te svrhe, preporučuje Evropski komitet za standardizaciju (engl. *European Committee for Standardization – CEN*). HPLC se najčešće primenjuje u kombinaciji sa drugim tehnikama, spregnuta sa UV/VIS ili fluorescentnim detektorom, kao i masenim spektrometrom (Koop i sar., 2014; Yang i sar., 2013; Petteys i Frank, 2011).

Pri određivanju vitamina elektroanalitičkim tehnikama, priprema uzorka za analizu je veoma značajna, kako zbog eliminisanja uticaja matriksa uzorka, tako i zbog prevođenja analita u odgovarajući oblik pogodan za reakciju/izdvajanje na radnoj elektrodi. Zbog visoke osetljivosti, često se i u HPLC koriste neki elektrohemijski detektori (Langer i Lodge, 2014).

2.2.1. Priprema uzoraka

Već je ranije napomenuto da je vitamin B₁ u prirodi prisutan u slobodnom (tiamin) i esterifikovanom obliku (tiamin monofosfat, difosfat i trifosfat). Naziv vitamin B₂ obuhvata više jedinjenja iste biološke aktivnosti (FMN, FAD i riboflavin), od kojih su neki (FMN i FAD) u životinjskim tkivima čvrsto vezani sa apoenzimima (mada ne i kovalentno). Vitamin B₃ je u živom životinjskom tkivu prisutan u sastavu koenzima NAD i NADP, dok je u mesu prisutan u slobodnom obliku. U zrelih zrnima žitarica, ovaj vitamin je pretežno prisutan u obliku nikotinske kiseline, koja nije biorasploživiva jer je vezana sa polisaharidima (niacinin) ili polipeptidima (niacinogen).

U cilju određivanja ukupnog sadržaja vitamina B₁, neophodno je izvesti ekstrakciju, koja se obično sastoji od hidrolize primenom 0,1 mol/l HCl u vodenom kupatilu na 100 °C ili u autoklavu na 121 °C, ili enzimske digestije. Kiseli tretman oslobađa proteinski vezan vitamin i

razlaže skrob na prostije šećere. Enzimski tretman, koji se obično izvodi primenom različitih fosfataza, može da traje po nekoliko sati (u proseku 3 h inkubacije), kako bi se izvršila potpuna defosforizacija estara tiamina.

Slično kao i za vitamin B₁, da bi se odredio ukupni sadržaj vitamina B₂, mora se izvršiti ekstrakcija koja obuhvata kiselu hidrolizu ili enzimsku digestiju. Kisela hidroliza oslobađa proteinski vezan oblik vitamina i prevodi FAD u FMN, dok se enzimskom digestijom postiže defosforizacija FMN i hidroliza skroba. Najčešće korišćeni enzimi su takadijastaza, amilaza i kisele fosfataze (Gentili i Caretti, 2013).

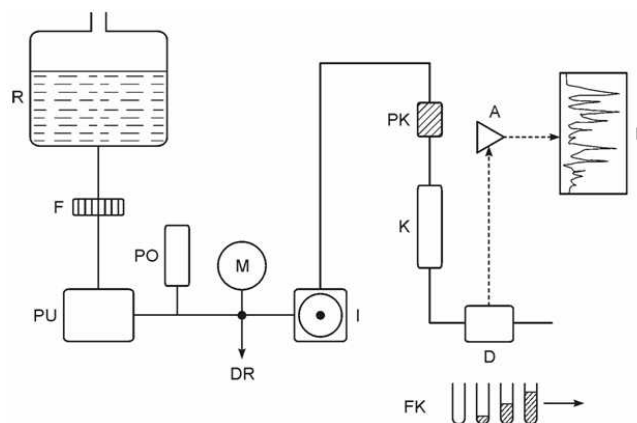
Određivanje ukupnog vitamina B₃ (slobodni + hemijski vezani oblik) ili slobodnog (bioraspoloživi) oblika, zasniva se na prethodnoj primeni odgovarajućih postupaka ekstrakcije. Ukupni niacin se dobija tretmanom u autoklavu na 121 °C, u prisustvu alkalija ili mineralnih kiselina, dok se slobodni niacin izdvaja ključanjem sa mineralnom kiselinom, ili inkubacijom sa NAD-glikohidrolazom na 37°C, u toku 18 h (Gentili i Caretti, 2013).

Da bi se odredio nativni sadržaj vitamina u realnim uzorcima, koji je obično vrlo nizak, dobijeni ekstrakti se, pre analize, najčešće moraju prečišćavati i koncentrovati primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (*Solid Phase Extraction, SPE*) na n-C₁₈ kolonicama ili slabim katjonskim izmenjivačima jona (Gratacós-Cubarsí i sar., 2011).

2.2.2. Visokopritisna tečna hromatografija (HPLC)

Visokopritisna tečna hromatografija je danas jedna od najčešće primenjivanih tehnika instrumentalnih metoda analize. Pored izuzetne osetljivosti, ova tehnika ima mogućnost simultanog određivanja većeg broja jedinjenja. Koristi se za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata iz različitih uzoraka. Raspon molekulskih masa supstanci koje se mogu razdvajati i određivati visokopritisnom tečnom hromatografijom se kreće od oko 50 g/mol do oko 10000 g/mol.

Osnovni delovi aparature za HPLC prikazani su na Slici 5 (Marjanović, 2001; Simson, 1978).



Slika 5. Šematski prikaz aparature za visokopritisnu tečnu hromatografiju.

Na Slici 5 skraćenicama su označeni sledeći delovi: sistem za snabdevanje mobilnom fazom (rezervoari) – R, filter – F, pumpa i gradijent programer – PU, prigušivač oscilacija – PO, manometar – M, ventil za uvođenje uzorka (injektor) – I, pretkolona – PK, kolona – K, detektor – D, frakcioni kolektor – FK, pojačavač signala (atenuator) – A, uređaja za obradu i prikazivanje rezultata – P.

Nakon injektovanja male zapremine (do 50 μ l) pripremljenog i prečišćenog uzorka, on dospeva u hromatografsku kolonu nošen tečnom mobilnom fazom pod pritiskom i do 300 bar. Razdvajanje se dešava na osnovu specifičnih hemijskih i fizičkih interakcija između određivane supstance i stacionarne faze, zbog čega dolazi do različitog zadržavanja komponenata uzorka na stacionarnoj fazi (Moldoveanu i David, 2013). Supstance razvojene u koloni dospevaju u detektor, koji signal mase prevodi u električni signal, a zatim se promene tog signala sa vremenom beleže kao hromatogram. Vreme eluiranja (retenciono vreme) određivane supstance predstavlja njenu kvalitativnu karakteristiku, a površina zahvaćena pikom na hromatogramu kvantitativnu karakteristiku. Identifikacija supstanci se izvodi poređenjem retencionog vremena sa vremenom odgovarajućeg standarda, dok se određivanje njihovog sadržaja izvodi primenom neke relativne metode (Marjanović, 2001).

Rastvarač, odnosno smeša rastvarača (mobilna faza), može biti stalnog sastava, tj. stalne elucione moći, i tada se postupak hromatografskog razdvajanja označava kao izokratski, ili promenljivog sastava, koji podrazumeva promenu elucione moći po unapred definisanoj

funkciji, kada je reč o neizokratskom postupku, tj. gradijentnoj eluciji. Prednost gradijentne elucije je u tome što može znatno da skрати vreme analize (Moldoveanu i David, 2013).

Punjenje hromatografske kolone (vrsta stacionarne faze), kao i sastav mobilne faze, zavise od supstanci koje se razdvajaju. Savremena punjenja kolona za HPLC se gotovo isključivo u osnovi sastoje od osnovnog silikatnog materijala, čija je površina hemijski modifikovana, vezivanjem odgovarajućih supstanci različitog karaktera (tzv. hromatografija na vezanim fazama). Najčešći modifikatori su hlоро- ili alkoksi- derivati silana sa alifatičnim lancima različite dužine (n-C₈, n-C₁₂, n-C₁₈), aromatičnim ostacima, -NH₂, -CN i drugim hemijskim grupama, od čijih fizičko-hemijskih osobina zavise karakteristike punjenja kolone (Marjanović, 2001; Simson, 1978).

Najčešće primenjivani detektori u visokopritisnoj tečnoj hromatografiji su: UV/VIS detektori, detektor sa fotoosetljivim diodama (*Diode Array Detector*, DAD), fluorimetrijski (FD), elektrohemijski detektor i maseni detektor (MS).

Primena HPLC za određivanje vitamina B₁

Za određivanje slobodnog vitamina B₁ najčešće se primenjuje reversno-fazna (RF) tečna hromatografija i reversno-fazna tečna hromatografija uparenih jona. Polarnost i mala molarna masa vitamina B₁ uzrokuju njegovo kratko zadržavanje na RF kolonama i malu hromatografsku rezoluciju (Gentili i Caretti, 2013). Ovaj nedostatak se otklanja primenom RF tečne hromatografije uparenih jona, što podrazumeva dodatak određenog reagensa u mobilnu fazu (npr. alkil-sulfonata, metanola), koji reaguje sa analitom i formira manje polarno jedinjenje koje se duže zadržava na koloni, usled hidrofobnih interakcija sa stacionarnom fazom (Moldoveanu i David, 2013).

Zbog relativno male vrednosti molarnog koeficijenta apsorpcije svetlosti, za osetljivija određivanja često se upotrebljava fluorescentni detektor (Gentili i Caretti, 2013). Da bi se ovaj detektor mogao primeniti, neophodno je redukovani oblik vitamina (tiamin), prevesti u oksidovani oblik (tiohrom), koji pokazuje izrazita fluorescentna svojstva (Tiong i sar., 2015; Körner i sar., 2009; Bohrer i sar., 2004). Hemijska oksidacija se postiže upotrebom cijanogenbromida (BrCN) ili kalijum-fericijanida u jako alkalnoj sredini (15% NaOH). Ovde se javlja

problem uklanjanja nusproizvoda reakcije, koje je najčešće komplikovano i dugotrajno (Kusube i sar., 1983).

Da bi se izbegla hemijska oksidacija, koja je neophodna u slučaju primene fluorescentnog detektora, razvijene su spektrofotometrijske metode poboljšane osetljivosti i selektivnosti. Gratacós-Cubarsí i sar. su, 2011. godine primenili HILIC metodu – tečnu hromatografiju hidrofilnih interakcija (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) kombinovanu sa DAD detekcijom za određivanje vitamina B₁ u sušenim kobasicama. HILIC metode se primenjuju za određivanje polarnih, slabo kiselih ili baznih jedinjenja. Stacionarna faza je polarna, dok je mobilna faza manje polarna od stacionarne faze, ali ipak rastvorna u vodi (CH₃OH, CH₃CN). Gratacós-Cubarsí i sar. su kao mobilnu fazu primenili smešu acetonitrila i metanola, uz linearnu gradijentnu eluciju. Polarna stacionarna faza se uobičajeno dobija hemijskim vezivanjem molekula sa polarnim molekulskim grupama na krajevima (diol-, amino-, *zwitter*-jon i dr.) na čvrsti nosač (Moldoveanu i David, 2013). Markopoulou i sar. su 2002. godine za određivanje vitamina B₁ u multivitaminским tabletama primenili reversno-faznu hromatografiju sa UV detekcijom. Mobilna faza se sastojala od acetonitrila i trietil-amina, a primenjena je takođe gradijentna elucija.

Primena HPLC za određivanje vitamina B₂

Za određivanje vitamina B₂ takođe se najčešće primenjuju reversno-fazna hromatografija i reversno-fazna hromatografija uparenih jona, uglavnom na C₁₈ kolonama, mada se mogu koristiti i C₈ kao i amid-C₁₆ kolone. UV-VIS (Koop i sar., 2014), DAD (Jin i sar., 2012) i fluorescentni detektor (Petteys i Frank, 2011; Jakobsen, 2008) se pri tome najčešće primenjuju. Slobodni flavini u vodenim rastvorima pokazuju intenzivnu žuto-zelenu fluorescenciju (450 nm ekscitacija/522 nm emisija), dok proteinski vezani oblici ne fluoresciraju (3-imino-grupa, koja je odgovorna za fluorescenciju, učestvuje u građenju hemijske veze). UV-vidljivi spektar riboflavina se sastoji od četiri trake, sa maksimumima na 223, 266, 373 i 445 nm. Uobičajeno je merenje apsorbancije na 254 nm, mada je detekcija na 446 nm manje podložna interferencijama (Gentili i Caretti, 2013).

Primena HPLC za određivanje vitamina B₃

Kao i u slučaju vitamina B₁ i B₂, analitička tehnika koja se najčešće primenjuje za određivanje vitamina B₃ je visokopritisna tečna hromatografija, i to reversno-fazna hromatografija uparenih jona i HILIC hromatografija (Langer i Lodge, 2014; Gentili i Caretti, 2013; Yang i sar., 2013), a ređe hromatografija na kolonama sa izmenjivačima jona (Callmer i Davies, 1974).

Savremene metode tečne hromatografije za određivanje vitamina B₃ podrazumevaju primenu UV/VIS (Parham i sar., 2015; Ciulu i sar., 2011; Chen i Wolf, 2007) i fluorescentnog detektora (Lahély i sar., 1999; Ndaw i sar., 2002), kao i masenog spektrometra (Yang i sar., 2013; Hampel i sar., 2012; Chen i Wolf, 2007).

UV detekcija ovog vitamina je rađena od 254 nm do 264 nm, za oba vitamera. Moć apsorpcije svetlosti zavisi od vrednosti pH, odnosno, što je vrednost pH niža, apsorpcija je veća. Ovaj vid detekcije vitamina B₃ daje pouzdane rezultate, ali osetljivost i selektivnost određivanja su relativno male, zbog čega se interferirajuća jedinjenja moraju ukloniti u postupku prečišćavanja uzorka. U cilju snižavanja granice detekcije i poboljšanja selektivnosti bez primene postupka prečišćavanja hidrolizata, neki autori (Lahély i sar., 1999; Ndaw i sar., 2002) su predložili metode zasnovane na post-kolonskom ozračivanju eluata u prisustvu H₂O₂ i Cu²⁺, čime se obezbeđuje fluorescencija ovih jedinjenja (280 nm ekscitacija/380 nm emisija).

Hampel i sar. su 2012. godine razvili prvu UPLC-MS/MS (*Ultra-Performance Liquid Chromatography tandem Mass-Spectrometry*) metodu za simultano određivanje vitamina grupe B (tiamina, riboflavina, FAD, nikotinamida i piridoksina). UPLC tehnika podrazumeva primenu čestica veoma malih dimenzija, prečnika manjeg od 2,5 μm, za punjenje kolone (uobičajeno je veličina čestica 3-10 μm) i izrazito visokih radnih pritisaka mobilne faze, čime se postiže efikasnije razdvajanja komponenata (Moldoveanu i David, 2013). Postignuta je veoma dobra osetljivost, od 0,01 μg/l do 4,00 μg/l, zavisno od vitamina. Metoda je primenjena za određivanje navedenih vitamina u majčinom mleku (Hampel i sar., 2012).

Langer i Lodge su, 2014-te godine, određivali tiamin, riboflavin, nikotinsku kiselinu, nikotinamid, piridoksin, folnu i askorbinsku kiselinu, primenom HILIC hromatografije, pri čemu su uporedili rezultate dobijene pomoću DAD, fluorimetrijskog i kulonometrijskog detektora. Primenom UV/DAD i fluorimetrijskog detektora mogli su da se detektuju svi

određivani vitamini, dok je kulonometrijski detektor mogao da se primeni za detekciju piridoksina, folne kiseline i vitamina C. Kulonometrijski detektor je pokazao veliku osetljivost i selektivnost za određivane vitamine, ali je osnovni nedostatak ove kombinacije metoda dugo trajanje analize (do 48 h), jer je za rad navedenog detektora, jonsku jačinu mobilne faze i vrednost pH neophodno održavati konstantnima, što značajno usporava hromatografiju, odnosno, produžava eluiranje određivanih vitamina.

2.2.3. Elektroanalitičke tehnike

Iako se za određivanje vitamina B grupe najčešće preporučuju i primenjuju različite metode visokopritisne tečne hromatografije, ipak, usled često komplikovane pripreme uzoraka, skupe instrumentacije i cene eksploatacije, kao i nepovoljnog ekološkog aspekta ovih tehnika zbog upotrebe toksičnih rastvarača, razvijene su i alternativne analitičke metode za određivanje vitamina, među kojima i elektroanalitičke: polarografija, potenciometrija, voltometrija, voltometrijska striping analiza. Elektroanalitičke metode se najčešće primenjuju za određivanje metala u različitim uzorcima. Međutim, poslednjih decenija sve češću primenu one nalaze i u određivanjima organskih molekula (Suturović, 2003). Elektroanalitičke tehnike se izdvajaju po svojoj osetljivosti, selektivnosti, brzini i mogućnosti određivanja uz relativno jednostavnu pripremu uzoraka.

2.2.3.1. Elektroanalitičke tehnike za određivanje vitamina B₁

U pogledu primene elektroanalitičkih tehnika za određivanje vitamina B₁, među prvima su se pojavile direktne polarografske i diferencijalno-pulsne polarografske metode (Siddiqui i sar., 2001; Vergara i sar., 1980; Pederio i sar., 1972; Wollenberger, 1945), uz primenu kapljućih živinih elektroda kao radnih elektroda.

Vitamin B₁ je određivan i argentometrijski, uz primenu potenciometrije za indicaciju završne tačke titracije, upotrebom Ag/Ag₂S membranske jonselektivne elektrode (Hassan i sar., 1989). Potenciometrija kao samostalna tehnika, uz primenu odgovarajućih jonselektivnih

elektroda je takođe primenjivana (Zhang i sar., 1990). 2007. godine je razvijena veoma selektivna potenciometrijska metoda za određivanje ovog vitamina u multivitaminским farmaceutskim preparatima (Pires i sar., 2008), zasnovana na primeni jonelektivne elektrode proizvedene primenom β -ciklodekstrina u nosaču od karboksil-polivinilhlorida. Ciklodekstrini su ciklični oligosaharidi, kojima specifična struktura molekula omogućava da u središnjem delu molekula, koji je hidrofobnog karaktera, stvara inkluzione komplekse sa određenim molekulima (katjonima vitamina). Ove strukture predstavljaju elektrohemijske jonofore (male organske molekule, koji mogu vezati metalne jone i pomerati ih duž koncentracionog gradijenta kroz dvosloj) sa specifičnim mehanizmom vezivanja, različitim u odnosu na klasične jonoizmenjivače.

Poslednjih decenija su razvijene i mnoge voltametrijske metode za određivanje elektrohemijskog ponašanja vitamina B₁, kao i sadržaja ovog vitamina u različitim uzorcima. Martinez i sar. su 1996. godine primenili ovu tehniku u kombinaciji sa tankoslojnim polimerski-modifikovanim elektrodama od staklastog ugljenika i platine, formiranih elektrohemijskom depozicijom polipirol dodecil sulfata. Oni i sar. (2001) primenili su elektrodu od ugljenične paste u nativnom obliku i modifikovanu mangan ftalocijaninom u iste svrhe. Elektrohemijsko ponašanje slobodnog tiamina i njegovih fosfatnih derivata ispitano je na čvrstim platinskim elektrodama, takođe primenom voltametrije (Sutton i sar., 2004). U kombinaciji sa ovom tehnikom primenjene su i štampane ugljenične elektrode (*screen-printed carbon electrodes*) (Westmacott i sar., 2018).

Voltametrija sa pravougaonim impulsima (*Square-Wave Voltammetry*) takođe je primenjena za određivanje tiamina, pri čemu su upotrebljene zlatna elektroda modifikovana cisteinom (Wan i sar., 2002) i tankoslojna živina elektroda u metodi sa kadmijum-jonom kao indikatorskim jonom, koji uslovljava pojavu signala vitamina B₁ (Jiang i Sun, 2007).

Poslednjih godina, adsorpciona striping voltametrija nalazi sve veću primenu. Među prvima, koristila se elektroda živine kapi (Aboul-Kasim, 2000), uz kombinovanje adsorpcionog i katalitičkog efekta, čime je omogućeno znatno povećanje osetljivosti određivanja tiamina. Tankoslojna olovna elektroda, istovremeno formirana sa stvaranjem depozita tiamina, se takođe koristila za određivanje ovog vitamina adsorpcionom striping voltametrijom (Tyszczyk-Rotko, 2012).

Za određivanje sadržaja i elektrohemijskog ponašanja vitamina B₁ primenjena je i diferencijalno pulsna adsorpciona striping voltometrija (Brahman i sar., 2016). U ovim ispitivanjima, autori su koristili različite ugljenične elektrode: elektroda od staklastog ugljenika, elektroda od ugljenične paste, u nativnom obliku i modifikovana nanocevicama (jednozidne - *single walled* i višezidne - *multi walled*), i postigli izuzetno veliku osetljivost metode. Za određivanje elektrohemijskog ponašanja vitamina B₁ u istom istraživanju, primenjena je ciklična voltometrija.

Prasad i sar. (2017) primenili su diferencijalno pulsnu anodnu striping voltometriju u kombinaciji sa nanomerskom Ni-film elektrodom za detekciju tiamina u tragovima.

Najnovije elektroanalitičke metode podrazumevaju primenu biosenzora velike selektivnosti. Biosenzori se najčešće proizvode imobilisanjem enzima na odgovarajuću elektrodu. Halma i sar. (2017) su u cilju konstruisanja amperometrijskog biosenzora za određivanje vitamina B₁ odgovarajućim postupkom imobilisali tiamin difosfat-zavisnu transketolazu, poreklom iz vrste *Escherichia coli*, na elektrodu od staklastog ugljenika. Brahman i sar. (2013) su proizveli biosenzor za određivanje vitamina B₁, modifikovanjem elektrode od ugljenične paste višezidnim nanocevicama, na koju je imobilisana DNK.

2.2.3.2. Elektroanalitičke tehnike za određivanje vitamina B₂

Od elektroanalitičkih tehnika, za određivanje riboflavina najzastupljenije su voltometrija i voltometrijska striping analiza. Ranije se u ove svrhe uglavnom primenjivala adsorpciona striping voltometrija u kombinaciji sa živinim elektrodama u baznim uslovima (Economou i Fielden, 1995; Wang i sar., 1985). Kako pri ovim uslovima dolazi do brže razgradnje riboflavina, razvijene su metode određivanja u blago kiselim uslovima (Villamil i sar., 1993; Çakir i sar., 1997).

Među najprimenjenije voltometrijske tehnike za određivanje vitamina B₂ spadaju diferencijalno pulsna voltometrija (Hajian i sar., 2014; Jabbar i sar., 2012; Ensafi i sar., 2012; Kotkar i sar., 2007; Kadara i sar., 2006; Slepchenko i sar., 2005; Anisimova i sar., 2001) i adsorpciona diferencijalno pulsna striping voltometrija (Muthusankar i sar., 2019;

Bandžuchová i sar., 2012; Ensafi i sar., 2012; Baš i sar., 2011; Safavi i sar., 2010; Gu i sar., 2001). Po zastupljenosti primene, slede tehnike voltometrija sa pravougaonim impulsima (Gribat i sar., 2017; Stanković i sar., 2016; Kotkar i sar., 2007), posebno njena striping modifikacija, uz adsorpciju u koraku predelektrolize (Riman i sar., 2015; Ly i sar., 2011; Wu i sar., 2007; Kotkar i sar., 2007; Qijin i sar., 2001; Çakir i sar., 1997).

Adsorpcionu striping voltometriju sa naizmeničnom sinusoidnom promenom potencijala primenili su Villamil i sar., 1993. godine.

Za određivanje vitamina B₂ primenjivane su elektrode od staklastog ugljenika različite modifikacije. Gu i sar. su 2001. godine primenili elektrohemijski tretiranu elektrodu od staklastog ugljenika, na kojoj dolazi do adsorpcije vitamina, dok su istu elektrodu, ali bez prethodnog tretmana, primenili Slepchenko i sar. 2005 godine. Gribat i sar. (2017) upotrebili su rotirajuću disk elektrodu od staklastog ugljenika modifikovanu filmom hematita. Ensafi i sar. (2012) su primenili elektrohemijski tretiranu grafitnu elektrodu u određivanju ovog vitamina. Kao radne elektrode, primenjeni su i štampani ugljeni senzori (Kadara i sar., 2006), kompozitna elektroda od ugljenične paste modifikovana oktilpiridin heksafluorofosfatom (Safavi i sar., 2010), planarna elektroda od ugljenične paste modifikovana aza-makrocikličnim jedinjenjima (Kotkar i sar., 2007), kao i elektroda od ugljenične paste sa ugljenim nanocevčicama, modifikovana sa DNK (Ly i sar., 2011). Osetljivo i selektivno određivanje riboflavina je postignuto na dijamantskoj elektrodi dopiranoj borom (Stanković i sar., 2016), dok su Wu i sar. (2007) koristili grafitnu elektrodu u obliku cilindra zagrevanu električnim putem.

U određivanju vitamina B₂ primenjena je i obnovljiva srebro-amalgam prstenasta elektroda (Baš i sar., 2011), čvrste srebrne amalgam elektrode (Bandžuchová i sar., 2012), elektroda od politiofenskih nanocevčica velike gustine (Hajian i sar., 2014), dok je tankoslojna živina elektroda primenjena za ispitivanje interakcije riboflavin-kadmijum (Jabbar i sar., 2012). Qijin i sar. su 2001. godine za određivanje vitamina B₂ primenili zlatnu elektrodu modifikovanu slojem L-cisteina. Sá i sar. (2015) upotrebljavali su bizmutovu elektrodu u vidu filma, dok su Riman i sar. (2015) koristili štampanu grafitnu elektrodu modifikovanu slojem bizmuta. U novije vreme, sve više se upotrebljavaju izuzetno selektivni biosenzori za određivanje vitamina B₂, npr. DNK biosenzor (Ensafi i sar., 2012), kao i već pomenuti nanokompozitni senzori (Muthusankar i sar., 2019).

U velikom broju navedenih studija, ciklična voltometrija je našla širu primenu u određivanju elektrohemijskog ponašanja riboflavina, dok je sadržaj vitamina određen nekom osetljivijom elektroanalitičkom tehnikom. U literaturi takođe postoje primeri samostalne primene ciklične voltetrije za određivanje riboflavina (Nezamzadeh-Ejhieh i Pouladsaz, 2014; Bai i sar., 2010; Shiu i Shi, 2000).

Od svih pomenutih metoda, najveća osetljivost ostvarena je primenom adsorpcione stripping voltetrije sa pravougaonim impulsima, i elektrode od ugljenične paste modifikovane dodatkom DNK; postignuta granica detekcije iznosi 0,2 ng/l (Ly i sar., 2011). Primenom iste tehnike u kombinaciji sa zlatnom elektrodom modifikovanom cisteinom ostvarena je granica detekcije od $2,5 \cdot 10^{-11}$ mol/l (9,4 ng/l) (Qijin i sar., 2001).

2.2.3.3. Elektroanalitičke tehnike za određivanje vitamina B₃

Voltetrijsko ponašanje nikotinske kiseline je detaljno ispitano na različim elektrodnim materijalima: živi (Zón i sar., 1994; Mellado i Montoya, 1994; Jurkiewicz-Herbich, 1992; Rodríguez-Amaro i sar., 1990), platini (Horányi, 1990; Batina i sar., 1989; Gui i sar., 1989; Stern i sar., 1989) i zlatu (Wang i sar., 2006). Međutim, radovi koji se bave određivanjem vitamina B₃ u različitim uzorcima primenom elektranalitičkih metoda su malobrojni.

Za određivanje nikotinske kiseline i nikotinamida u vitaminskim farmaceutskim preparatima, primenjena je ciklična voltetrija na zlatnoj elektrodi (Wang i sar., 2006). Postignuta je granica detekcije od 0,27 µmol/l za nikotinsku kiselinu, dok je za nikotinamid granica detekcije iznosila 0,33 µmol/l.

Nikotinska kiselina je određivana u uzorcima hrane primenom adsorpcione stripping voltetrije (ciklične i sa linearnom promenom potencijala), na zlatnoj elektrodi modifikovanoj slojem merkptoacetatne kiseline (Yang i sar., 2008). Postignuta granica detekcije iznosila je 0,14 µmol/l.

2.3. Hronopotencimetrija

Hronopotencimetrija je elektroanalitička tehnika u kojoj dolazi do elektrolize ispitivanog rastvora, primenom konstantne struje, uz praćenje promena potencijala radne elektrode u odnosu na referentnu elektrodu, u funkciji vremena.

Kretanje elektroaktivnih vrsta ka površini radne elektrode mora da se odvija isključivo difuzijom, zbog čega se ispitivani rastvor tokom analize ne meša. Migraciono kretanje jona se suzbija visokim koncentracijama pomoćnog elektrolita, dok relativno kratko vreme elektrolize obezbeđuje ograničenje konvektivnog prenosa mase (Jain i Gaur, 1977).

Konstantna struja, saopštena između radne i pomoćne elektrode, uslovljava naglu promenu potencijala do vrednosti koja obezbeđuje elektrolizu elektroaktivne komponente rastvora, odnosno analita. Za analit u oksidovanom obliku, elektrodna reakcija se prikazuje jednačinom:



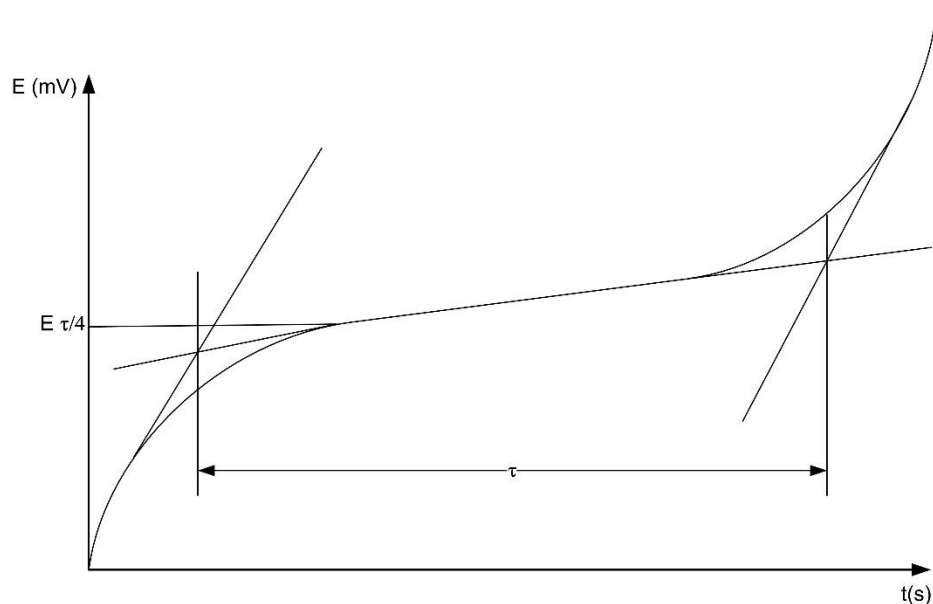
Koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini radne elektrode stalno opada, jer je elektrodna reakcija brža od procesa difuzije, zbog čega se javlja koncentracioni gradijent u okolini radne elektrode (sve veća razlika koncentracije analita u blizini elektrode i u rastvoru). Potencijal elektrode se pomera ka negativnijim vrednostima, kako bi i dalje proticala konstantna struja. Dok je koncentracija oksidovanog oblika analita na površini elektrode različita od nule, promena potencijala radne elektrode će se sporo odvijati. Ova promena je definisana Nernstovim izrazom:

$$E = E^\theta + \frac{RT}{nF} \log \frac{C_{ox}(0,t)}{C_{red}(0,t)} \quad (2)$$

gde su:

E – potencijal elektrode u stanju ravnoteže (V); E^θ – standardni redoks potencijal (V); R – univerzalna gasna konstanta (J/mol K); T – temperatura (K); n – broj razmenjenih elektrona u reakciji; F – Faradejeva konstanta (C/mol); $C_{ox}(0,t)$ i $C_{red}(0,t)$ – koncentracije oksidovanog i redukovano oblika supstance u vremenu t (mol/dm³).

U momentu kada se celokupna količina oksidovanog oblika analita redukuje na radnoj elektrodi, dolazi do skoka potencijala, sve do vrednosti pri kojoj se odvija elektroliza sledeće elektroaktivne vrste prisutne u rastvoru. Vreme koje je potrebno da koncentracija analita na elektrodi padne na nulu zove se *tranziciono vreme* (τ) i predstavlja kvantitativnu karakteristiku. Za supstance koje se redukuju ovo vreme se često naziva *vreme redukcije*, a za supstance koje se oksiduju *vreme oksidacije*. Način merenja tranzicionog vremena prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Uobičajeni izgled hronopotenciograma

Kvalitativnu karakteristiku predstavlja potencijal radne elektrode ($E_{\tau/4}$), koji donekle odgovara standardnom potencijalu, odnosno, za reversne sisteme identičan je sa polarografskim polutalasnim potencijalom. Ovaj potencijal se određuje kao ordinata četvrtine vrednosti tranzicionog vremena.

S obzirom da se u hronopotencijometriji elektroliza odvija pri konstantnoj struji, zavisnost koncentracije oksidacionog oblika supstance na površini radne elektrode od vremena je predstavljena izrazom (Sand, 1901):

$$C_{ox}(0, t) = C_{ox}^0 - \frac{2}{\pi} \left(\frac{i}{nFD_{ox}A} \right) \delta_{ox}(t) \quad (3)$$

gde su:

$C_{ox}(0, t)$ – koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini elektrode u vremenu t ,

C_{ox}^0 – početna koncentracija oksidovanog oblika supstance,

i – struja elektrolize (A),

n – broj razmenjenih elektrona,

D_{ox} – koeficijent difuzije oksidovanog oblika supstance (cm^2/s),

A – površina elektrode (cm^2),

$\delta_{ox}(t)$ – debljina difuzionog sloja u funkciji vremena t , a data je izrazom: $\delta_{ox}(t) = \sqrt{\pi D_{ox} t}$.

Iz jednačine (3), uz uslov da je $C_{ox}(0, t) = 0$, za difuzioni proces sledi da je tranziciono vreme:

$$\tau^{1/2} = \frac{nFA(\pi D_{ox})^{1/2}}{2i} C_{ox}^0 \quad (4)$$

Jednačina (4) je osnovna jednačina hronopotenciometrijske analize i često se naziva *Sandova jednačina*. Kada su veličine n , F , A , D_{ox} i i konstantne, jednačina (4) se može pisati u obliku:

$$\tau^{1/2} = K \cdot C_{ox}^0 \quad (5)$$

odnosno:

$$\tau = K' \cdot C_{ox}^0{}^2 \quad (6)$$

gde su K i K' konstante proporcionalnosti.

Iz izraza (6) se može videti da tranziciono vreme, tj. vrednost analitičkog signala raste sa kvadratom koncentracije analita. Nelinearnost analitičkog signala od koncentracije znatno ograničava praktičnu primenu hronopotenciometrije u kvantitativnoj analizi.

Primenom Nernstovog izraza, moguće je izvesti funkcionalnu zavisnost potencijala radne elektrode (E) od vremena elektrolize (t):

$$E = E_{\tau/4} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\tau^{1/2} - t^{1/2}}{t^{1/2}} \quad (7)$$

gde je:

$$E_{\tau/4} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{red}}{D_{ox}} \right)^{1/2} \quad (8)$$

E_0 – standardni redoks potencijal ispitivanog sistema.

Za slučaj anodne polarizacije radne elektrode, kada se na radnoj elektrodi vrši oksidacija elektroaktivne vrste, izraz za potencijal predstavljen je izrazom:

$$E = E_{\tau/4} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\tau^{1/2} - t^{1/2}}{t^{1/2}} \quad (9)$$

Za ireverzibilan elektrodni proces važi sledeća jednačina:

$$E = E_0 + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left[\frac{nF A c_{ox}^0 k}{i} \right] + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left[\sqrt{\frac{\tau}{t}} - 1 \right] \quad (10)$$

gde je:

α – koeficijent prenosa naelektrisanja,

k – konstanta brzine reakcije za ireversan sistem (cm/s),

c_{ox}^0 – koncentracija analita.

Teorijske osnove hronopotencimetrije su postavili Sand i Karaoglanoff još početkom dvadesetog veka, ali je kao analitičku metodu primenjuje Ruis tek 40-tih godina, dok su Gierst i Juliard dokazali njenu primenu za proučavanje kinetike elektrodnih reakcija (Thomas i Henze, 2001; Gierst i Juliard, 1953).

Hronopotencimetrija se uglavnom koristi za određivanje metala. Međutim, poslednjih godina se ova tehnika sve češće primenjuje i za određivanje organskih molekula koji direktno ili indirektno učestvuju u elektrodnim reakcijama (Đurović, 2018; Đurović i sar., 2016; Stojanović i sar., 2013; Stojanović, 2011; Stojanović i Švarc-Gajić, 2011; Suturović i Marjanović, 2002; Suturović i Marjanović, 1999).

2.4. Hronopotenciometrijska stripping analiza

Kod hronopotenciometrijske stripping analize (HSA), u prvom koraku se stvara depozit na radnoj elektrodi, pri konstantnom potencijalu i uz intenzivno mešanje rastvora, a u analitičkom koraku se primenjuje hronopotenciometrija, tj. depozit se rastvara saopštavanjem konstantne struje.

Za razliku od hronopotenciometrije, gde zavisnost između vrednosti analitičkog signala raste sa kvadratom koncentracije, odnosno nije linearna, u HSA gde se primenjuje prethodno koncentrovanje analita, ova zavisnost postaje linearna (Reilley i Stumm, 1962; Mamatov i sar. 1957). U HSA se za analitički signal koristi termin *vreme rastvaranja*.

U uslovima povratne elektrodne reakcije, ako se koncentrovanje izvodi na tankoslojnoj živinoj elektrodi pri konstantnoj struji, zavisnost potencijala elektrode (E) od vremena elektrolize (t) u HSA, je:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}} \frac{\pi^{1/2} n F A D_{ox}^{1/2} C_{ox}^0}{2i} - \frac{RT}{nF} \ln \left[(\tau + t)^{1/2} \frac{i}{i - i_S} - t^{1/2} \right] \quad (11)$$

Odnos vremena rastvaranja (τ) i vremena elektrolize (t) dat je izrazom:

$$\frac{\tau}{t} = \frac{1}{\left(1 - \frac{i_S}{i}\right)^2 - 1} \quad (12)$$

gde je:

i_S – primenjena struja tokom strippinga (analitičkog koraka),

i – primenjena struja tokom elektrolize.

Analitička primena hronopotenciometrijske stripping analize se prvi put pominje 1962. godine, u radovima Neeb-a (Thomas i Henze, 2001), koji je, određujući talijum na

tankoslojnoj živinoj elektrodi, potvrdio linearnu zavisnost tranzicionog vremena od koncentracije analita, a koju je teorijski izveo Perone (Reilley, 1962). Osamdesetih godina prošlog veka dolazi do ekspanzije praktične primene ove tehnike.

Perone i sar. (1966; 1967) razradili su teorijske osnove hronopotenciometrijske striping analize za reverzibilne sisteme na tankoslojnoj živinoj elektrodi. Autori su rešili problem difuzije pretpostavljajući linearnu difuziju unutar filma žive, uz inicijalne i konturne uslove, koje su usvojili deVries i van Dalen (1964; 1965):

$$t = 0; 0 < x < l; C_{red} = C_{red}^0$$

gde je:

x – rastojanje od površine elektrode; l – debljina filma žive; C_{red}^0 – početna koncentracija supstance na elektrodi; C_{red} – koncentracija supstance na elektrodi nakon vremena t

$$t > 0; |i/(nFA)| = \lambda = const.$$

$$t > 0; x = l; D_{red} \left(\frac{dC_{red}}{dx} \right) = -\lambda$$

$$t > 0; x = 0; D_{red} \left(\frac{dC_{red}}{dx} \right) = 0$$

Potencijal elektrode se menja u vremenu t prema funkciji:

$$E = E_0 + \frac{0,059}{n} \log[2l/(\pi D_{ox})^{1/2}] + \frac{0,059}{n} \log \left[\frac{t^{1/2}}{\tau-t} \right] \quad (13)$$

Iz prethodne jednačine, uz određeno vreme elektrolize, konstantnu brzinu mešanja i uslov da je C_{red}^0 približno jednako $1/l$, sledi da je:

$$i \cdot \tau \sim C_{red}^0 \quad (14)$$

$$\tau \sim \frac{C_{red}^0}{l} \quad (15)$$

Vreme rastvaranja (τ) je proporcionalno koncentraciji analita u rastvoru i konstantno je za konstantne uslove elektrolize, tj. obrnuto je proporcionalno debljini sloja žive. Linearna zavisnost vremena rastvaranja od koncentracije je potvrđena brojnim studijama (Kemula i Sasha, 1979; Kabanova i sar., 1978; Baranski i Galus, 1971; Willems i Neeb, 1969; Kemula i

Strojek, 1966). Brainina i Vdovina su 1972. godine izvele jednačine za hronopotenciometrijske krive rastvaranja metalnih filmova sa čvrstih elektroda, bez mešanja, po kojima se potencijal elektrode u vremenu t menja po funkciji:

$$E = E_{\theta} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{1}{\gamma} \left(C^0 + \frac{2i}{nFA} \sqrt{\frac{t}{\pi D}} \right) - \frac{RT}{nF} \ln(Q_0 - i_t) \quad (16)$$

gde je:

γ – konstanta proporcionalnosti; Q_0 – početno naelektrisanje depozita na elektrodi koje je jednako $\frac{nFADC_{ox}^0\tau}{\delta}$ (τ – vreme elektrolize, δ – debljina difuzionog sloja); C^0 – sadržaj metalnog filma po jedinici površine elektrode; $i_t = -nFAD \left(\frac{\sigma C_{ox}}{dx} \right)_{x=0}$. Ova jednakost važi za reverzibilne elektrodne reakcije na tankim filmovima.

Vreme rastvaranja je:

$$\tau_t = Q_0/i \quad (17)$$

Za 'deblje' filmove važi jednačina:

$$E = E_{\theta} + \frac{RT}{nF} \ln \left(C^0 + \frac{2i}{nFA} \sqrt{\frac{t}{\pi D}} \right) \quad (18)$$

Za ireverzibilne elektrodne reakcije na 'tankom' sloju važi jednakost:

$$E = E_{\theta} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{i}{nFAk'\gamma} - \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln(Q_0 - i \cdot t) \quad (19)$$

$$\tau_t = \frac{Q_0}{i} \quad (20)$$

Tj. za 'deblji' sloj:

$$E = E_{\theta} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{i}{nFAk'\gamma} \quad (21)$$

$$\tau_t = \frac{Q_0}{i} \quad (22)$$

Konstanta k' predstavlja konstantu brzine prenosa naelektrisanja pri standardnom potencijalu. Kao što se iz navedenih jednačina može videti, tranziciono vreme je bilo proporcionalno koncentraciji ispitivane supstance u svim slučajevima.

U hronopotenciometrijskoj stripping analizi uglavnom se koriste čvrste radne elektrode (staklasti ugljenik, zlato, srebro, platina), pa njena reproduktivnost najviše zavisi od reproduktivnosti pripreme aktivnih površina radnih elektroda (Suturović, 2003). HSA je manje selektivna od potenciometrijske stripping analize (PSA), ali je selektivnija od voltametrijskih stripping tehnika sa linearnom promenom potencijala. Razlog tome je mnogo manji uticaj kapacitetne struje na analitički signal u HSA, a naročito u potenciometrijskoj stripping analizi (PSA). U pogledu osetljivosti, savremene HSA i PSA su se približile voltametrijskim stripping tehnikama, zahvaljujući razvoju brojnih modifikacija i veoma tačnom merenju vremena rastvaranja (kvantitativne karakteristike).

HSA se danas uglavnom koristi za elektroanalitičko određivanje elemenata koji se ne mogu odrediti primenom potenciometrijske stripping analize. Najčešće se primenjuje za određivanje žive, srebra, bizmuta, selena, sumpora, nikla, kobalta, arsena i halogenida (Augelli i sar., 2007; Suturović i sar., 1997; Huiliang i sar., 1988; Eskilsson i Haraldsson, 1987; Renman i sar., 1986).

Švarc-Gajić je 2006. godine razvila metode hronopotenciometrijske stripping analize za određivanje žive uz primenu različitih elektrodnih sistema. Razvijene metode su primenjene za određivanje žive u vodi za piće, morskoj vodi, rečnoj, jezerskoj, bunarskoj, i otpadnoj vodi.

2.4.1. Adsorpciona hronopotenciometrijska stripping analiza

Adsorpciona stripping analiza se primenjuje za određivanje analita koji se ne mogu koncentrovati elektrolizom. Na ovaj način se mogu odrediti brojna organska jedinjenja, metali koji su teško rastvorni u živi (npr. Fe, Al i Cr), koji imaju ekstremne standardne potencijale, grade intermetalna jedinjenja ili je elektrohemijaska reakcija metalnog jona ireverzibilna, kao što je to slučaj sa jonom nikla (van Leeuwen i Town, 2007). Analit se na elektrodi izdvaja kontrolisanom nespecifičnom adsorpcijom sa ili bez potenciostatske kontrole (Suturović, 2003).

Prvi korak adsorpcione striping analize podrazumeva izdvajanje molekula organskih jedinjenja ili površinski aktivnih kompleksa određivanih metala na površini radne elektrode u uslovima kontrolisane, nespecifične adsorpcije, najčešće uz mešanje rastvora. Nespecifična adsorpcija ne zahteva potenciostatsku kontrolu, ipak, utvrđeno je da potencijal radne elektrode utiče na osetljivost i selektivnost određivanja. Nakon umirenja rastvora koje obično traje 15-30 s, depozit se desorbuje promenom potencijala elektrode, kada je u pitanju adsorpciona voltametrijska striping analiza (AdVSA), ili saopštavanjem konstantne struje, kada se ova tehnika naziva adsorpciona hronopotenciometrijska striping analiza (AdHSA). U adsorpcionoj striping analizi, u analitičkom koraku najčešće se primenjuje diferencijalno pulsna voltametrija i klasična voltametrija sa linearnom promenom potencijala, a ređe hronopotenciometrija (Suturović, 2003). Adsorpciona striping voltametrija je izuzetno osetljiva tehnika, granica detekcije pri određivanju nekih organskih jedinjenja (riboflavin, tiourea) i metala nakon adsorpcije njihovim površinski aktivnih kompleksa doseže i do 10^{-11} mol/l (Wang, 1985; Wang i sar., 1985). AdHSA je, u poređenju sa AdVSA, izučavana u mnogo manjem obimu, iako ima određenih prednosti, kao što je npr. mnogo manji uticaj površinski aktivnih smetajućih supstanci.

Izbor radne elektrode zavisi od vrednosti završnog potencijala analize tokom analitičkog koraka. Ako se završni potencijal nalazi u negativnoj oblasti, kao radna elektroda najčešće se primenjuje elektroda živine kapi. U slučaju da je završni potencijal u pozitivnoj oblasti, koriste se elektrode od platine, ugljene paste ili impregniranog grafita. Stepens adsorpcije analita zavisi od pomoćnog elektrolita, elektrodnog materijala, pH, temperature, transporta mase i trajanja adsorpcije. Vreme adsorpcije zavisi od koncentracije analita i efikasnosti prenosa mase. Ukoliko su vremena adsorpcije suviše duga, dolazi do zasićenja površine radne elektrode, koje za posledicu ima nelinearnost analitičkog signala.

Smetnje u adsorpcionoj striping analizi uzrokovane su prisustvom drugih površinski aktivnih materija i specifičnom adsorpcijom halogenida. Druge površinski aktivne materije mogu značajno smanjiti deponovanje analita, što zavisi od odnosa koncentracija i jačine adsorpcionih sila. Takođe, desorpcija smetajućih supstanci može da dovede do preklapanja analitičkih signala. Ukoliko smetnje samo delimično blokiraju aktivnu površinu elektrode, one se donekle mogu eliminisati kraćim vremenom deponovanja i saopštavanjem selektivnog potencijala adsorpcije (Suturović, 2003). Ako su smetnje intenzivne, smetajuću

supstancu je potrebno odvojiti pogodnom metodom pripreme uzorka (najčešće nekom hromatografskom metodom).

Analogno sa HSA, i u AdHSA zavisnost između analitičkog signala (tranzicionog vremena, τ) i količine adsorbovanog analita je linearna (van Leeuwen i Town, 2007).

Adsorpciona hronopotenciometrijska striping analiza se primenjivala za veoma osetljivo određivanje gvožđa u priobalnim vodama, na rotirajućoj takoslojnoj živinoj elektrodi, koristeći 1-nitrozo-2-naftol i 2,2-bipiridin za kompleksiranje jona gvožđa (Riso i sar., 2007). Ova tehnika se koristila i u određivanjima tragova kobalta i nikla, na tankoslojnoj bizmutovoj elektrodi, kao alternativnoj elektrodi živinim elektrodama (Hutton i sar., 2003). Kao kompleksirajući agens, u ovim određivanjima se koristio dimetilglioksim. AdHSA se primenjivala i za određivanje organskih molekula. Sulfatni polisaharidi su određivani u morskoj vodi primenom adsorpcione hronopotenciometrijske striping analize sa zamenom rastvora pre analitičkog koraka, na elektrodi živine kapi (Strmečki i Plavšić, 2012). Ista tehnika se koristila za određivanje nativnog, denaturisanog i redukovano oblika albumina poreklom iz goveđeg seruma (Ostatná i Paleček, 2008).

Pretraživanjem savremene dostupne naučne literature nije utvrđeno da su hronopotenciometrija i hronopotenciometrijska striping analiza do sada primenjivane za određivanje sadržaja vitamina B grupe.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Instrumentacija

Sva elektroanalitička ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije izvedena su u Laboratoriji za instrumentalne metode analize Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, uz primenu sistema za elektrohemijsku analizu koji je konstruisan na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu i proizveden u saradnji sa Elektrouiverzalom (Leskovac).

Sistem za elektrohemijsku analizu se sastoji iz tri dela: elektrohemijskog analizatora M1, procesnog dela i štampača (Slika 7).

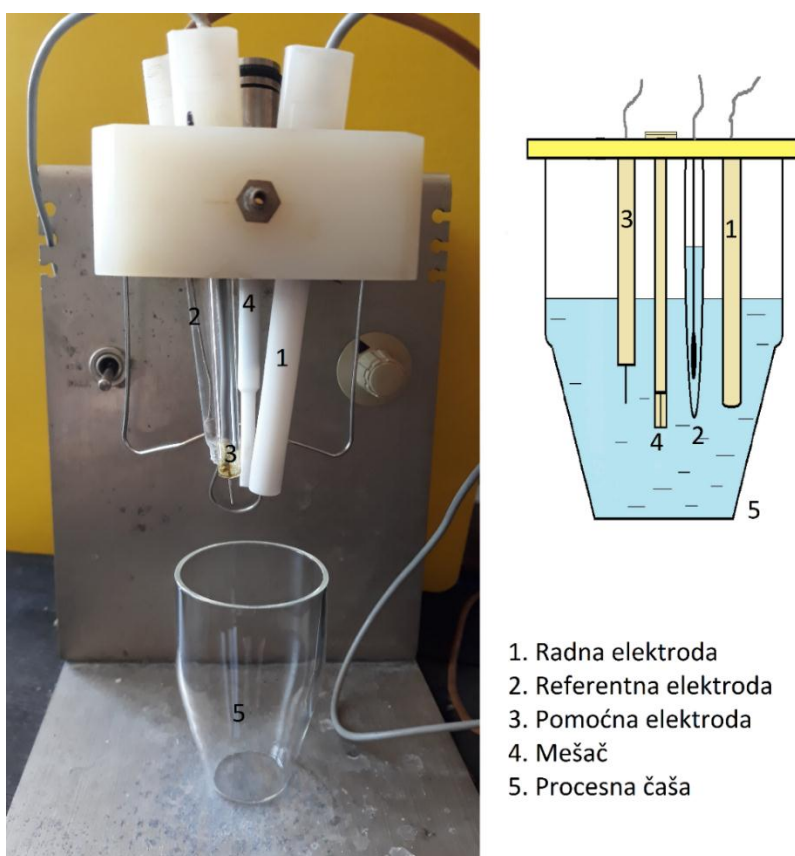


Slika 7. Sistem za elektrohemijsku analizu

Visokoautomatizovani elektrohemijski analizator M1, koji čini osnovni deo sistema, ima mogućnost izvođenja potenciometrijske i hronopotenciometrijske striping analize, hronopotenciometrije i elektrolize pri konstantnom potencijalu ili konstantnoj struji. Opseg potencijala analizatora je od -2 V do +2 V, a tačnost saopštavanja potencijala je definisana greškom od $\Delta E \leq \pm 2$ mV. Vrednost konstantne struje koja se može saopštiti kreće se u opsegu od -50 μ A do +50 μ A, sa tačnošću definisanom greškom $\Delta i \leq \pm 0,2$ μ A. Kalibracija vrednosti struja i potencijala se obavlja automatski.

Kvalitativna karakteristika analita je srednja vrednost potencijala platoa potenciograma ili hronopotenciograma. Rezolucija pri merenju potencijala iznosi $\Delta E \leq \pm 2$ mV. Kvantitativna karakteristika analita je tranziciono vreme (vreme oksidacije ili vreme redukcije analita), odnosno vreme između dve prevojne tačke signala odziva, a tačnost merenja tranzicionog vremena definisana je greškom $\Delta t = \pm 50$ ms. Analizator ima mogućnost memorisanja rezultata poslednje analize, a takođe upozorava na eventualne nepravilnosti u toku analize ili pogrešnog saopštavanja parametara analize. Po završetku analize, na displeju analizatora se pojavljuje informacija o ispravnosti iste, tj. vrsti i stepenu eventualne smetnje.

Procesni deo, odnosno elektrohemijsku ćeliju (Slika 8) čine mešalica sa teflonskim mešačem, procesna čaša i troelektrodni sistem. Ovaj deo može da sadrži i elektromagnetni ventil, čija je uloga uvođenje inertnog gasa u hermetički zatvorenu procesnu čašu, ukoliko analiza zahteva deaeraciju. U ovom radu deaeracija nije bila potrebna. Mehanička mešalica obezbeđuje reproduktivno mešanje ispitivanog rastvora brzinom od 1000 – 6000 obrtaja/min. Rad mehaničke mešalice i elektromagnetnog ventila u njenom kućištu u potpunosti je kontrolisan elektrohemijskim analizatorom.



1. Radna elektroda
2. Referentna elektroda
3. Pomoćna elektroda
4. Mešač
5. Procesna čaša

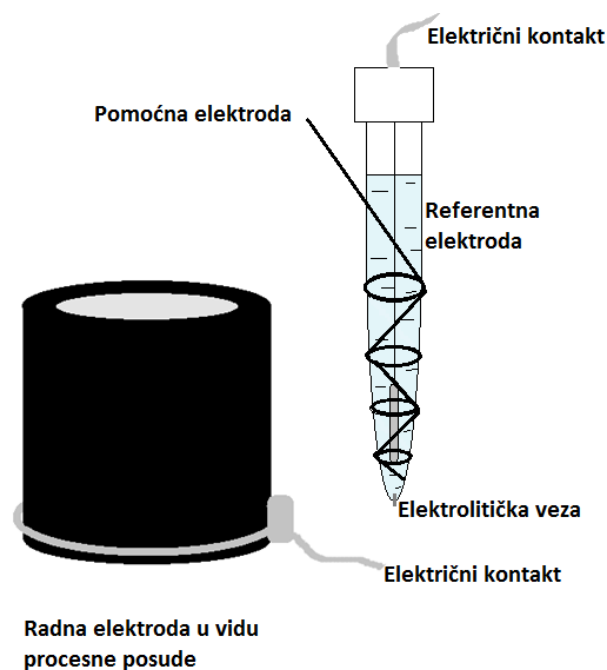
Slika 8. Elektrohemijska ćelija

Elektrodni sistem se sastoji od radne, referentne i pomoćne elektrode. U ovom radu kao radne elektrode korišćene su planarna disk elektroda od staklastog ugljenika (GCE – *Glassy Carbon Electrode*), elektroda u vidu procesne posude od staklastog ugljenika i tankoslojna živina elektroda. Elektroda od staklastog ugljenika ($A = 7,07 \text{ mm}^2$) proizvedena je utiskivanjem cilindra od staklastog ugljenika ('Sigradur' G, $D = 3 \text{ mm}$) u teflonsku cev spoljašnjeg prečnika $D = 8 \text{ mm}$, na $180 \text{ }^\circ\text{C}$. Ova elektroda je služila i kao inertni nosač tankoslojne živine elektrode. Elektroda u vidu procesne posude (Slika 9) je cilindar od staklastog ugljenika ('Sigradur' G), ukupne unutrašnje aktivne površine od $23,7 \text{ cm}^2$ ($D = 1,9 \text{ cm}$, $V = 9,92 \text{ cm}^3$). Električni kontakt sa ovom radnom elektrodom je ostvaren preko metalnog prstena koji okružuje posudu od staklastog ugljenika. Srebro/srebro-hloridna elektroda (Ag/AgCl , $3,5 \text{ mol/l}$, KCl) je korišćena kao referentna elektroda u svim ispitivanjima i sve vrednosti potencijala u ovom radu su date u odnosu na ovu elektrodu. Kao pomoćna elektroda je korišćena platinska žica ($D = 0,7 \text{ mm}$, $l = 0,7 \text{ cm}$) utopljena u stakleni nosač, sem u slučaju korišćenja procesne posude od staklastog ugljenika kao radne elektrode, gde je pomoćna elektroda, tj. platinska žica ($D = 0,7 \text{ mm}$, $l = 13 \text{ cm}$), obmotana oko referentne elektrode (Slika 9).

Zapisi analiza (parametri analize, kvalitativne i kvantitativne karakteristike, hronopotenciogrami) štampani su pomoću matričnog štampača Epson-570+.

Od dodatne opreme, u radu je korišćeno ultrazvučno kupatilo (Iskra, Šentjernej, Slovenija), pH metar MA 5705 (Iskra, Kranj, Slovenija), bidestilator (MonoDest 3000, Brand, Nemačka), tehnička i analitička vaga (Mettler Toledo, Kolambus, SAD).

Sve HPLC analize izvedene su na Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu (FINS), na 'Agilent 1200' tečnom hromatografu, opremljenom DAD detektorom (*Diode Array Detector*), 'Chemstation' softverom, binarnom pumpom, vakuum degazerom i Agilent kolonom (Eclipse XDB- C_{18} , $1,8 \mu\text{m}$, $4,6 \times 50 \text{ mm}$).



Slika 9. Elektroda u vidu procesne posude od staklastog ugljenika i odgovarajuća referentna i pomoćna elektroda

3.2. Pribor i posuđe

U radu je korišćeno uobičajeno laboratorijsko posuđe (normalni sudovi, levkovi, pipete, čaše, itd.) i pribor (propipete, mikropipete, avan sa tučkom i dr.). Za elektrohemijska merenja korišćene su procesne posude u vidu staklene čaše sa konusnim dnom, zapremine 50 ml, proizvođača Radiometer (Brønshøj, Danska). Svo stakleno posuđe je prano deterdžentom, ispirano česmenskom vodom, potom razblaženom azotnom kiselinom (1:1, v/v) i na kraju destilovanom i bidestilovanom vodom. Za filtriranje rastvora korišćena je filter hartija *Whatman no 1* (Whatman International, Maidstone, UK) i membranski filter prečnika pora 0,45 μm (Chromafil[®] Xtra PET-45/25, Macherey-Nagel, Düren, Nemačka).

3.3. Hemikalije i reagensi

U radu su korišćeni standardi vitamina B₁ (tiamin-hidrochlorid) čistoće ≥99%, vitamina B₂ (riboflavin) čistoće ≥98% i vitamina B₃ (nikotinamid) čistoće ≥ 99,5%, robne marke Sigma-Aldrich (Nemačka). Pored toga, korišćene su i sledeće hemikalije:

- Hlorovodonična kiselina 'suprapur' (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Limunska kiselina (Zorka Pharma, Srbija),
- Nitratna kiselina 'suprapur' (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Sumporna kiselina 'suprapur' (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Acetatna kiselina (Centrohem, Stara Pazova, Srbija),
- Borna kiselina (Lach-Ner, Brno, Češka),
- Ortofosforna kiselina (Lach-Ner, Brno, Češka),
- Natrijum-citrat u obliku dihidrata (Zorka Pharma, Srbija),
- Natrijum-hidroksid (Lach-Ner, Brno, Češka),
- Natrijum-acetat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija),
- Natrijum-hlorid (Centrohem, Stara Pazova, Srbija),
- Natrijum-karbonat (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Natrijum-hidrogenfosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Natrijum-dihidrogenfosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Kalijum-hlorid (Centrohem, Stara Pazova, Srbija),
- Askorbinska kiselina (Kemika, Hrvatska),
- Živa (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Aceton (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Etanol 96% (Zorka, Šabac, Srbija),
- Aluminijum-oksidi 0,05 μm (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Piridoksin-hidrochlorid (Sigma-Aldrich, Nemačka),
- D – glukoza (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Saharozna (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- Laktoza (Merck, Darmstadt, Nemačka).

Sve hemikalije koje su korišćene u radu bile su analitičkog ili višeg stepena čistoće.

Bidestilovana voda je korišćena za sva potrebna rastvaranja i razblaživanja hemikalija, kao i za ispiranje elektrohemijske ćelije. Osnovni standardni rastvori vitamina B₁ (1g/l), vitamina B₂ (1g/l) i vitamina B₃ (10 g/l) su pripremani svakodnevno rastvaranjem odgovarajuće mase čvrstog standarda (odmerene na analitičkoj vagi) u pomoćnom elektrolitu. Osnovni standardni rastvori su čuvani u normalnim sudovima u frižideru zaštićeni od svetlosti. Radni standardni rastvori su pripremani razblaživanjem osnovnih standardnih rastvora do odgovarajuće koncentracije u pomoćnom elektrolitu.

Rastvor Hg²⁺ jona, koji se koristio za formiranje tankoslojne živine elektrode, pripreman je rastvaranjem 2,00 g elementarne žive u 3 ml azotne kiseline, uz blago zagrevanje (digestor), i zatim razblaživanjem bidestilovanom vodom do koncentracije 2 g/l.

Citratni pufer (pH 6) pripreman je mešanjem 190 ml rastvora limunske kiseline koncentracije 0,1 mol/l i 810 ml rastvora natrijum-citrata iste koncentracije. Rastvor limunske kiseline je pripreman rastvaranjem 21,0 g limunske kiseline (C₆H₈O₇) u 1 l vode, dok je rastvor natrijum-citrata pripreman rastvaranjem 29,4 g natrijum-citrata u obliku dihidrata (C₆H₅O₇Na · 2H₂O) u 1l vode (Gomori, 1955). Vrednost pH pripremljenog pufera je proverena pH-metrom. Eventualne korekcije pH vrednosti su izvedene dodavanjem 0,1 mol/l hlorovodonične kiseline ili 0,2 mol/l natrijum-hidroksida. Po potrebi, pripremljeni pufer je razblaživan bidestilovanom vodom do koncentracije 0,1, 0,05, 0,025 i 0,01 mol/l.

3.4. Priprema radnih elektroda

Kao što je već rečeno, u radu su korišćene planarna disk radna elektroda od staklastog ugljenika, radna elektroda u vidu procesne posude od staklastog ugljenika i tankoslojna živina elektroda, koja je formirana elektrodepozicijom žive na inertni nosač od staklastog ugljenika.

Radne elektrode od staklastog ugljenika su polirane po potrebi, kada test elektrode nije bio zadovoljavajući, kada je opadala reproduktivnost analitičkog signala i kada je dolazilo do poteškoća u formiranju tankoslojne živine elektrode (mehanički nestabilan ili nehomogen film).

Poliranje planarne disk radne elektrode je izvođeno suspenzijom aluminijum-oksida različite gustine (veličina čestica 0,5 μm). Nakon poliranja, elektroda je ispirana bidestilovanom vodom i čišćena u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 10 minuta u 50% etanolu. Nakon tretmana, elektroda je ponovo ispirana bidestilovanom vodom. Kvalitet polirane površine je proveravan 'brzim' i 'pravim' testom elektrode. 'Brzi' test je podrazumevao elektrohemijski proces u rastvoru 0,005 mol/l sumporne kiseline, pri početnom potencijalu od -0,7 V, završnom potencijalu od 0,7 V i konstantnoj struji od 7 μA , u 10 ponavljanja. 'Pravi' test je rađen pri istim uslovima kao i brzi, ali sa vremenom elektrolize od 60 s, vremenom pauze 15 s i vremenom među-mešanja 5 s. Površina radne elektrode je dobro ispolirana ako se brzi test završi za nekoliko sekundi (do 3 s) i ako na hronopotenciogramu dobijenom nakon 'pravog' testa nema prevojnih tačaka. Ukoliko to nije slučaj, postupak poliranja se ponavlja.

Između analiza, planarna disk elektroda od staklastog ugljenika je čišćena filter hartijom nakvašenom acetonom, potom bidestilovanom vodom. Ceo elektrodni sistem je ispiran bidestilovanom vodom.

Poliranje radne elektrode u obliku procesne posude od staklastog ugljenika je takođe izvođeno suspenzijom aluminijum-oksida različite gustine, utrljane na pamučni tampon pričvršćen na osovinu elektromotora. Nakon poliranja, procesna posuda od staklastog ugljenika je ispirana najpre destilovanom, potom bidestilovanom vodom. Pre svake analize, elektroda u vidu procesne posude je aktivirana sapoštvanjem konstantne redukcionne struje od 50 μA , u 99 ciklusa, pri početnom potencijalu od 0,017 V i završnom potencijalu od -2 V u 0,018 mol/l H_2SO_4 . Aktiviranje radne elektrode je ujedno služilo i kao test elektrode u vidu procesne posude: ako se elektroliza pri navedenim uslovima odvijala dovoljno brzo (ceo postupak nije trajao duže od 1 min), površina radne elektrode je dobro ispolirana.

Živina radna elektroda je formirana elektrodepozicijom tankog sloja žive na planarnu elektrodu od staklastog ugljenika iz rastvora 0,2 mol/l Hg^{2+} jona u rastvoru hlorovodonične kiseline koncentracije 0,02 mol/l. Vreme deponovanja (debljina sloja) je optimizovano određivajem njegovog uticaja na analitički signal vitamina B_1 i B_3 . Za oba vitamina, usvojeno je vreme od 240 s, uz intenzivno i reproduktivno mešanje (4000 ob/min.), pri konstantnoj redukcionnoj struji od 50 μA . Nakon isteka vremena deponovanja, formirana elektroda je ispirana bidestilovanom vodom, jer u kiselim uslovima (hlorovodonična kiselina), u prisustvu hloridnih jona (bez sapoštenog potencijala), živa formira kalomel. Kvalitet sloja je ocenjivan

vizuelno, kroz kap bidestilovane vode koja ostaje na sloju nakon ispiranja, ali i test rastvorima vitamina B₁ i B₃, analizom u 7 ponavljanja kako bi se videla reproduktivnost vremena oksidacije i vrednost potencijala rastvaranja analita. Kvalitetan sloj žive je svetlosive boje i prekriva celu površinu staklastog ugljenika. Na ovakvom sloju moglo je da se izvede oko 30 analiza, što je važno i za određivanje vitamina B₁ i za određivanje vitamina B₃. Pre formiranja novog sloja, postojeći sloj je skidan filter hartijom nakvašenom najpre acetonom, potom bidestilovanom vodom, zatim je ceo elektrodni sistem ispiran bidestilovanom vodom.

3.5. Optimizacija i validacija metoda

Za određivanje vitamina B₂ kao radne elektrode su korišćene planarna disk elektroda od staklastog ugljenika i elektroda u vidu procesne posude od staklastog ugljenika, dok je za određivanje vitamina B₁ i B₃ korišćena tankoslojna živina elektroda. Optimizacija hronopotenciometrijske metode za određivanje vitamina B₂ i optimizacija metoda hronopotenciometrijske stripping analize za određivanje vitamina B₁ i B₃ obuhvatale su nekoliko koraka:

1. Ispitivanje reakcionog mehanizma (oksidacija/redukcija) određivanog vitamina na radnoj elektrodi,
2. Ispitivanje uticaja vrste i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina,
3. Ispitivanje uticaja vrednosti pH pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina,
4. Ispitivanje i definisanje odgovarajućeg potencijala elektrolize kod hronopotenciometrijske stripping analize i inicijalnog (početnog) potencijala kod hronopotenciometrije,
5. Ispitivanje uticaja adsorpcije na analitički signal u adsorpcionoj stripping analizi vitamina B₁ i B₃,
6. Ispitivanje uticaja debljine tankoslojne živine elektrode u adsorpcionoj stripping analizi vitamina B₁ i B₃,

7. Ispitivanje i definisanje odgovarajućeg opsega primenjenih struja tokom oksidacije i redukcije analita.

Validacija optimizovanih metoda je obuhvatala:

1. Ispitivanje i definisanje opsega linearnosti,
2. Određivanje granice detekcije i granice kvantitativnog određivanja,
3. Ispitivanje i definisanje preciznosti metode,
4. Provera tačnosti metode,
5. Selektivnost metode je definisana ispitivanjem potencijalnih interferencija pratećih supstanci u multivitaminskim preparatima, kao i međusobnih interferencija određivanih vitamina,
6. Definisanje odgovarajućeg postupka pripreme realnih uzoraka multivitaminskih preparata,
7. Određivanje vitamina B₁, B₂ i B₃ u uzorcima komercijalnih multivitaminskih dodataka ishrani, primenom razvijenih metoda.

3.5.1. Opšti postupak optimizacije i validacije

Sve analize primenom standardnog elektrodnog sistema izvođene su u 20 ml analiziranog rastvora, dok je kod primene procesne posude od staklastog ugljenika, zapreminu analiziranog rastvora bilo potrebno optimizovati. Kao odgovarajuća, usvojena je zapremina rastvora od 5 ml.

Na početku svakog eksperimenta, rađena je analiza 'slepe probe' (pomoćnog elektrolita), u koju je zatim dodavana odgovarajuća količina analita i izvođena analiza model sistema, pri istim uslovima. Na elektrodi od staklastog ugljenika analize su rađene u pet ponavljanja, dok su na tankoslojnoj živinoj elektrodi analize rađene u tri ponavljanja, zbog ograničenog broja analiza koje su se mogle izvesti na jednom sloju žive (oko 30 analiza).

Odabir odgovarajućih vrednosti eksperimentalnih parametara izveden je na osnovu veličine dobijenih analitičkih signala i njihove reproduktivnosti, tj. standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD).

Izgled hronopotenciograma je bio bitan kod određivanja svih eksperimentalnih faktora, ali je naročito bio važan kod odabira odgovarajućeg pomoćnog elektrolita i vrednosti pH, kao i kod ispitivanja interferencija.

Optimizovane metode su primenjene za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₃ u uzorcima komercijalno dostupnih multivitaminskih dodataka ishrani.

Opseg linearnosti je definisan sa minimum pet tačaka, a svaka tačka rađena je u tri (za tankoslojnu živinu elektrodu) i pet ponavljanja (za elektrode od staklastog ugljenika).

Vrednosti granice detekcije (*Limit of Detection – LOD*) i granice kvantitativnog određivanja (*Limit of Quantitation – LOQ*) računata su primenom kriterijuma (ICH, 1996):

$$LOD = \frac{3,3 \times S_b}{a} \quad (I)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_b}{a} \quad (II)$$

Gde su:

S_b – standardna devijacija odsečka kalibracione krive definisane za najniži koncentracioni opseg ($n = 3$),

a – srednja vrednost koeficijenta pravca kalibracione krive definisane za najniži koncentracioni opseg ($n = 3$).

Procena preciznosti metode je urađena na osnovu ponovljivosti i reproduktivnosti. Ponovljivost je u ovom radu predstavljena preciznošću u toku jednog dana, dok je reproduktivnost predstavljena preciznošću u toku više dana. Ponovljivost je, u ovom radu, izražena vrednošću RSD_r za 5 – 7 uzastopnih analiza identično pripremljenih rastvora vitamina u pomoćnom elektrolitu, u toku jednog dana, pri čemu je radna elektroda ispirana bidestilovanom vodom između analiza različitih rastvora. Reprodutivnost je izražena kao vrednost RSD_R rezultata analiza sprovedenih u toku 5 – 7 dana, u 5 – 7 identično pripremljenih rastvora. Eksperimenti su rađeni na dve ili tri koncentracije ispitivanih vitamina. Vrednosti $RSD < 5\%$ ukazuju na dobru preciznost metode.

Tačnost razvijenih metoda je ocenjena upoređivanjem rezultata sa deklariranim sadržajima vitamina u komercijalno dostupnim multivitaminским dodacima ishrani i paralelnim HPLC analizama istih uzoraka. Tačnost određivanja vitamina je dodatno proverena i 'testom povrata' (*recovery test*). Za statističko poređenje rezultata dobijenih razvijenim metodama sa rezultatima komparativne HPLC analize, primenjen je Studentov *t*-test uparenih vrednosti. Rezultati hronopotenciometrijske analize i hronopotenciometrijske striping analize poređeni su sa deklariranim sadržajima takođe primenom Studentovog *t*-testa uparenih vrednosti.

U multivitaminским preparatima, značajnu smetnju za određivanje ciljanog vitamina može da predstavlja prisustvo drugih vitamina i pomoćnih supstanci. Selektivnost razvijene metode je ocenjena dodatkom vitamina i drugih supstanci koje se uobičajeno nalaze u multivitaminским proizvodima u model sisteme određivanog vitamimina i određivanjem nivoa smetnje koju mogu da izazovu. Kriterijum za ocenu selektivnosti bila je veličina promene analitičkog signala: ukoliko promena analitičkog signala nije bila veća od 5%, smatralo se da je metoda dovoljno selektivna.

3.6. Uzorci i priprema uzoraka za analizu

Sadržaj vitamina B₁, B₂ i B₃ određivan je u komercijalno dostupnim multivitaminским dodacima ishrani, domaćih i stranih proizvođača, koji su nabavljeni u apotekama na teritoriji Novog Sada, metodom slučajnog izbora. Multivitaminški dodaci ishrani su bili u obliku tableta ili granula. Analizirane su dve vrste tableta: multivitaminški dodaci ishrani koji pored kompleksa vitamina B sadrže i vitamine A, D, E i K, kao i mineralne materije (oznake ovih uzoraka u radu su MVT1 i MVT2), i kompleksi vitamina B (BKT1, BKT2, BKT3 i BKT4). Sadržaj vitamina B₂ je, pored multivitaminških preparata u vidu tableta, određivan i u multivitaminским proizvodima u vidu granula (MVG1, MVG2 i MVG3), koje se pre upotrebe rastvaraju u vodi. Svi navedeni proizvodi, pored vitamina, sadrže i razne pomoćne supstance – punioce i aditive (talk, skrob, maltodekstrin, sećere, arome, želatin, prehrambene boje, stabilizatore, sredstva protiv zgrudnjavanja, zgušnjivače, sredstva za glaziranje i dr.).

Priprema uzoraka za hronopotenciometrijsku analizu i hronopotenciometrijsku striping analizu je podrazumevala prethodno usitnjavanje tableta u avanu i rastvaranje odgovarajuće količine usitnjenog praha u pomoćnom elektrolitu. Pripremljena suspenzija je ostavljena u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega je filtrirana kroz filter hartiju Whatman no.1. u normalni sud zapremine 50 ml. Talog koji je ostajao na filter hartiji ispiran je malim porcijama pomoćnog elektrolita pre dopunjavanja normalnog suda. Ovako pripremljeni rastvori su razblaživani do masene koncentracije 5 – 20 mg/l računajući u odnosu na deklarisanu sadržaj, a u slučaju primene procesne posude od staklastog ugljenika do 0,5 mg/l i analizirani primenom razvijene hronopotenciometrijske metode ili metode hronopotenciometrijske striping analize.

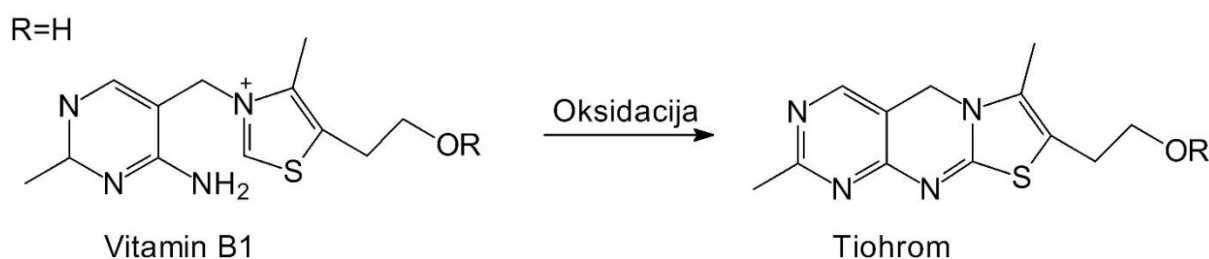
U slučaju granula, odgovarajuća masa uzorkovana iz homogenog uzorka rastvorena je u pomoćnom elektrolitu do koncentracija 5 – 10 mg/l vitamina B₂. Dobijeni rastvori su filtrirani, a filtrat je direktno analiziran razvijenom hronopotenciometrijskom metodom.

Za HPLC analizu, nakon usitnjavanja tableta, određena količina praha je rastvorena u bidestilovanoj vodi. Pripremljena suspenzija je ostavljena u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega je filtrirana kroz filter hartiju Whatman no.1. Talog koji je ostajao na filter hartiji ispiran je bidestilovanom vodom. Filtrat je propuštanjem kroz membranski filter prečnika pora 0,45 μm i prenošen u normalni sud od 50 ml, koji je potom dopunjavao bidestilovanom vodom.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Određivanje vitamina B₁ hronopotenciometrijskom striping analizom

Oksidacija tiamina u tiohrom odvija se u reakciji sa kalijum-heksacijanoferatom, dok blagom oksidacijom nastaje disulfid koji zadržava vitaminsku aktivnost (Ball, 2006). Elektroanalitičko određivanje ovog vitamina zasnovano na njegovoj oksidaciji primenom voltametrije sa pravugaonim impulsima i ciklične voltametrije uglavnom je izvođeno u veoma baznim uslovima, u puferima vrednosti pH > 10 (Westmacott i sar., 2018; Wan i sar., 2002; Oni i sar. 2001). Određivanje u rastvorima niže vrednosti pH je rađeno diferencijalno pulsnom adsorpcionom striping voltametrijom i adsorpcionom striping voltametrijom sa pravugaonim impulsima, ali uz elektoredukciju vitamina (Brahman i sar., 2013a; Brahman i sar., 2013b; Tyszczyk-Rotko, 2012). Aboul-Kasim je 2000. godine, razvio metodu za određivanje vitamina B₁ anodnom adsorpcionom striping voltametrijom na kapljućoj živinoj elektrodi, zasnovanu na elektrooksidaciji molekula vitamina u fosfatnom puferu pH 6,2, uz potencijal predelektrolize od -1,4 V i vremenu predelektrolize od 60 s, uz mešanje rastvora. Pri navedenim uslovima, odvijala se reakcija oksidacije tiamina u tiohrom:



Broj elektrona uključenih u oksidaciju je 1, a sama reakcija je ireverzibilna (Aboul-Kasim, 2000).

Elektroanalitičko određivanje vitamina B₁ u ovom radu, primenom adsorpcione hronopotenciometrijske striping analize i tankoslojne živine elektrode bazirano je na njegovoj elektrooksidaciji u blago kiselim uslovima, uz prethodno koncentrovanje na negativno polarizovanoj elektrodi. Za razliku od ranije objavljenih metoda (Aboul-Kasim,

2000; Brahman i sar., 2013a; Brahman i sar., 2013b) koje su uglavnom zahtevale deaeraciju, u ovom radu ona nije bila neophodna, što je skraćivalo vreme analize za 10 do 15 minuta.

4.1.1. Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsku stripping analizu vitamina B₁ na tankoslojnoj živinoj elektrodi

U preliminarnim ispitivanjima utvrđeno je da se analitički signal vitamina B₁ javljao kao oksidacioni signal u citratnom puferu pH 6, uz deponovanje (akumulaciju) na tankoslojnoj živinoj elektrodi. Kao odgovarajući potencijal akumulacije primenjen je potencijal od -1,405 V (Aboul-Kasim, 2000).

Utvrđeno je da se izvođenjem analize bez saopštenog potencijala tokom faze deponovanja (samo mešanje rastvora tokom 120 s) na hronopotenciogramu ne dobija analitički signal vitamina B₁. Pretpostavljeno je da se pri navedenim eksperimentalnim uslovima vitamin B₁ adsorpcijom izdvaja na tankoslojnoj živinoj elektrodi.

Pored toga, utvrđeno je da se veći i reproduktivniji analitički signal dobijao u uslovima difuzionog prenosa mase tokom faze deponovanja (bez primene mešanja analiziranog rastvora), nego u uslovima mešanja rastvora (forsirani konvektivni prenos mase). Povećanjem vremena akumulacije u mirnom rastvoru dolazilo je do postepenog povećanja analitičkog signala, dok je sa povećavanjem vremena akumulacije uz mešanje rastvora njegova vrednost opadala, kao i ponovljivost (za koncentrovanje bez mešanja, RSD = 1,84%, dok je za koncentrovanje uz mešanje RSD = 7,91%).

Pri analizi rastvora sa manjim sadržajem vitamina (< 10 mg/l), mešanje rastvora tokom deponovanja uzrokovalo je čak gubitak njegovog analitičkog signala. Verovatni razlog ovome je da pri mešanju rastvora dolazi do mehaničkog oštećenja izdvojenog sloja vitamina, odnosno odvajanja njegovih molekula od površine elektrode usled kavitacije.

S obzirom na navedeno, usvojeno je da se adsorpciona hronopotenciometrijska stripping analiza pri određivanju vitamina B₁, izvodi bez mešanja rastvora tokom koncentrovanja.

Analitički signal vitamina B₁ se javljao kao oksidacioni talas na oko -0,43 V. Najvažniji eksperimentalni parametri koji utiču na veličinu i reproduktivnost analitičkog signala, kao i oštrinu prevoja na hronopotenciogramu su ispitani i optimizovani. Oštrina prevoja na hronopotenciogramu je značajna zbog uticaja na tačnost i reproduktivnost merenja vremena rastvaranja. Nakon optimizacije, urađena je i validacija metode.

4.1.1.1. Ispitivanje uticaja vrste, koncentracije i vrednosti pH pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₁

U elektroanalitičkim ispitivanjima, izbor pomoćnog elektrolita je od izuzetnog značaja. Sastav, koncentracija i vrednost pH pomoćnog elektrolita mogu znatno uticati na termodinamičke i kinetičke procese na dodirnoj površini elektroda-ispitivani rastvor (Švorc i sar., 2013).

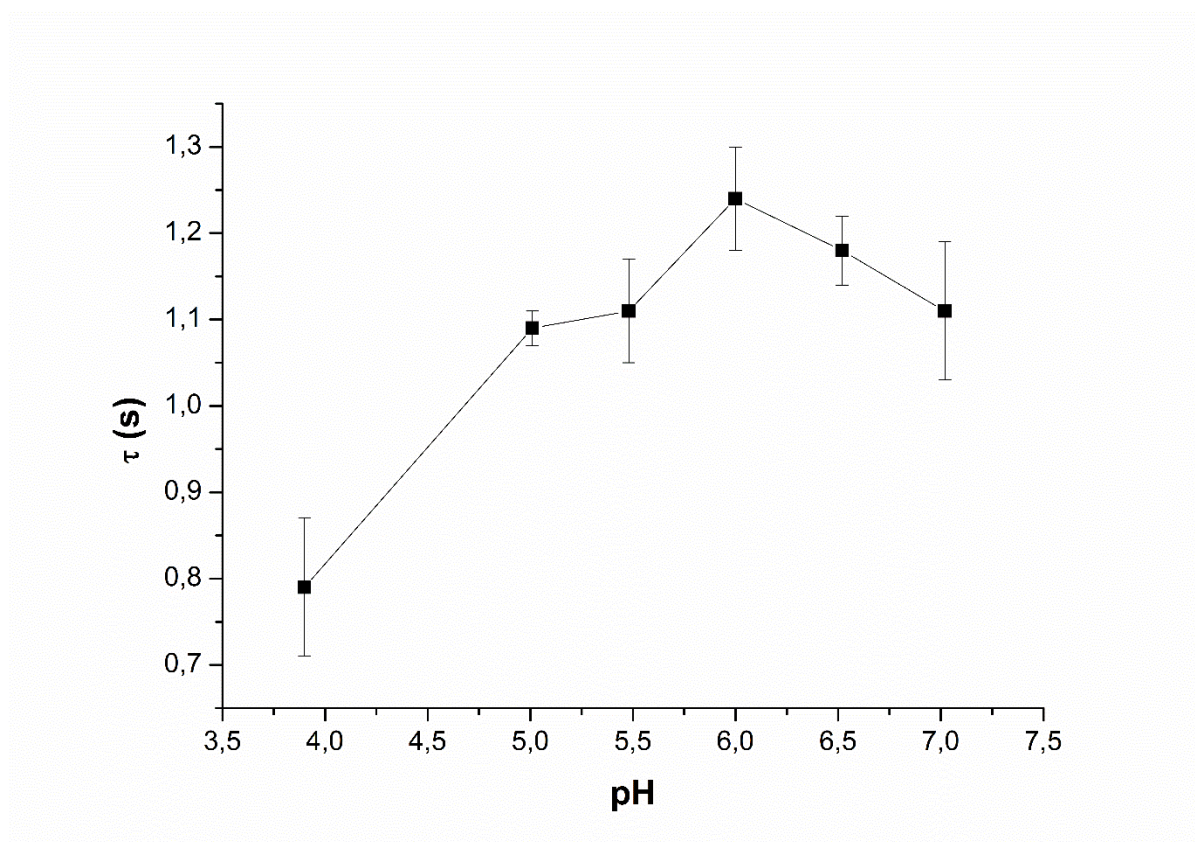
Prema podacima dostupne literature, za voltametrijsko određivanje kao i za određivanje vitamina B₁ adsorpcionom voltametrijskom stripping analizom korišćeni su acetatni, fosfatni i Britton-Robinson (BR) pufer različite koncentracije (0,01-0,2 mol/l), vrednosti pH 4-7 (Brahman i sar, 2013a; Brahman i sar., 2013b; Tyszczyk-Rotko, 2012). U nekoliko radova, ovaj vitamin je određivan voltametrijski u baznim uslovima (fosfatni pufer pH 11) (Westmacott i sar., 2018) i u BR-puferu, pH 11,40 (Wan i sar., 2002).

U ovoj doktorskoj disertaciji, uticaj vrste pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₁ ispitan je u sledećim puferima: 0,1 mol/l acetatni pufer pH 4, Britton-Robinson (BR) pufer pH 5,5 koncentracije 0,04 mol/l, 0,1 mol/l fosfatni pufer pH 6 i 0,01 mol/l citratni pufer pH 6. Ispitan je i uticaj rastvora KCl kao pomoćnog elektrolita (Sutton, 2004), u koncentraciji 0,025 mol/l, kao i rastvora HCl u istoj koncentraciji. Mogućnost primene askorbinske kiseline kao pomoćnog elektrolita je takođe ispitana u koncentraciji 3 g/l. Primenom hronopotenciometrijske stripping analize i usvojenih eksperimentalnih uslova rada, analitički signal vitamina B₁ se javljao u citratnom puferu, fosfatnom puferu i rastvoru askorbinske kiseline. Iako se u rastvoru askorbinske kiseline javljao oštar analitički signal vitamina B₁, usled neodgovarajuće vrednosti pH (suviše kisela sredina), dolazilo je do izdvajanja vodonika

na živinoj elektrodi, što je već nakon nekoliko analiza uzrokovalo oštećenje filma žive i značajno smanjenje ponovljivosti analitičkog signala. Signal vitamina B₁ je u citratnom puferu bio veće vrednosti nego u fosfatnom puferu, zbog čega je detaljno ispitan uticaj citratnog pufera kao pomoćnog elektrolita. Analizom 40 mg/l vitamina B₁ u 0,01 mol/l citratnom puferu pH 6, pri potencijalu akumulacije (E_{ak}) od -1,405 V, vremenu akumulacije (t_{ak}) od 50 s u mirnom rastvoru, oksidacionoj struji od 2,9 μ A i završnom potencijalu od -0,2 V, javljao se velik, ali razvučen i nedovoljno definisan signal analita (u slepoj probi, tj. pomoćnom elektrolitu, analitički signal se nije javljao). Vreme mešanja rastvora između uzastopnih analiza u istom rastvoru je iznosilo 5 s.

U cilju dobijanja bolje definisanog hronopotenciograma, sa oštrijim prevojima, ispitan je uticaj većih koncentracija citratnog pufera (pH 6): 0,025 mol/l; 0,05 mol/l; 0,1 mol/l i 0,2 mol/l. Sa porastom koncentracije pufera, uočen je značajan porast analitičkog signala vitamina B₁, uz poboljšanje njegove oštine i reproduktivnosti. Najveća osetljivost određivanja, uz najbolju reproduktivnost (RSD = 1,2%, n = 5) ostvarena je u 0,2 mol/l citratnom puferu (Slika 10), zbog čega je ova koncentracija pufera odabrana kao optimalna. Reproductivnost signala za ostale koncentracije pufera se kretala između 3,01% (za koncentraciju 0,1 mol/l) i 6,93% (za koncentraciju 0,025 mol/l) (n = 5). Vrednost potencijala rastvaranja se kretala oko -0,43 V.

ponovljivost, kao optimalni pomoćni elektrolit usvojen je 0,2 mol/l citratni pufer vrednosti pH 6.



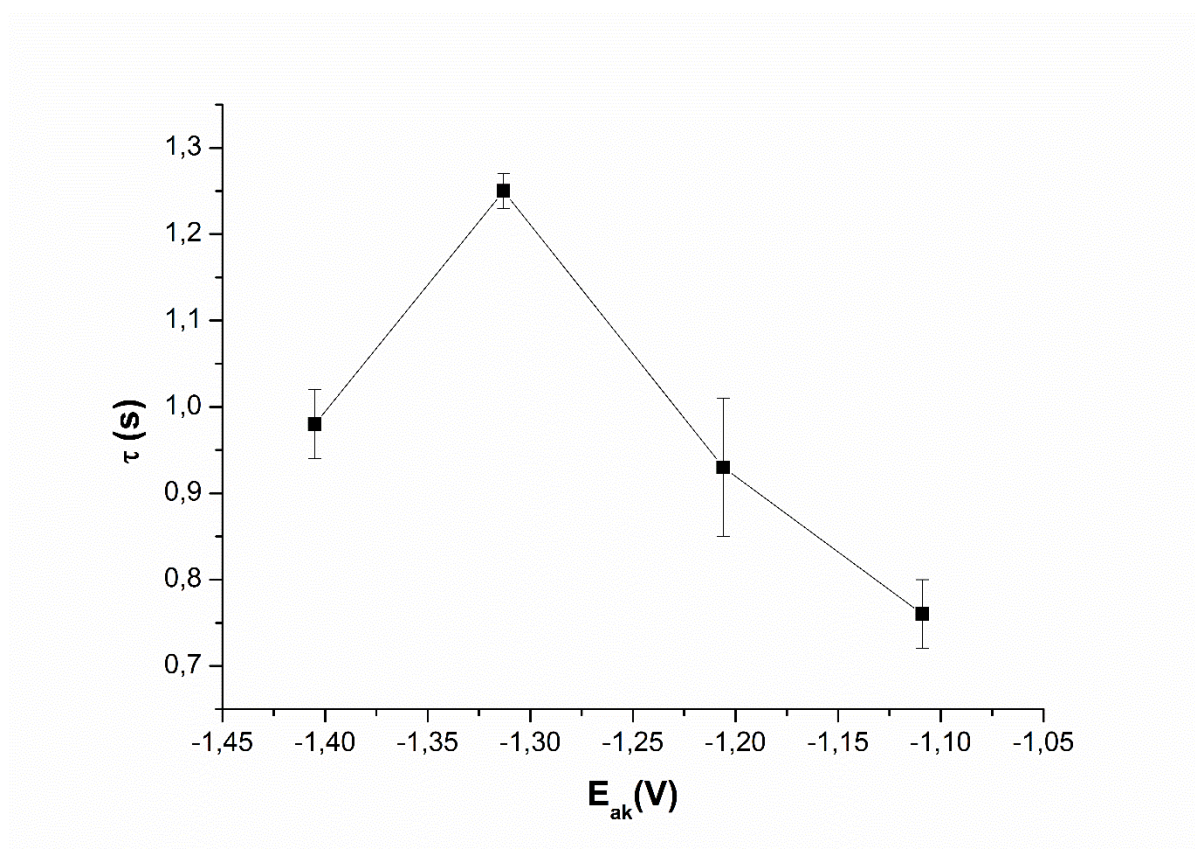
Slika 11. Uticaj vrednosti pH pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₁

$$C_m = 40 \text{ mg/l}; E_{ak} = -1,405\text{V}; t_{ak} = 50 \text{ s}; I = 2,9 \text{ }\mu\text{A}.$$

4.1.1.2. Ispitivanje uticaja potencijala akumulacije na analitički signal vitamina B₁

Ispitan je uticaj potencijala akumulacije od -1,405 V do -1,001 V, u rastvoru sadržaja 40 mg/l vitamina B₁ u 0,2 mol/l citratnom puferu pH vrednosti 6, pri sledećim uslovima: vreme akumulacije u mirnom rastvoru 50 s, oksidaciona struja 2,9 μA i završni potencijal -0,2 V. Zavisnost veličine analitičkog signala (τ) od saopštenog potencijala akumulacije (E_{ak}) prikazana je na Slici 12. Svaka tačka dijagrama predstavlja srednju vrednost za tri uzastopna merenja, dok je ponovljivost izražena kao $\pm 2\text{SD}$ odstupanja od srednje vrednosti. Pri potencijalu akumulacije -1,001 V, analitički signal vitamina B₁ se nije javljao, verovatno ovaj

potencijal nije bio dovoljno negativan da bi inicirao nespecifičnu adsorpciju molekula vitamina pri navedenim uslovima. Najveća vrednost analitičkog signala vitamina B₁ se javljala pri potencijalu akumulacije -1,313 V, uz najbolju reproduktivnost (RSD = 1,14%), zbog čega je ova vrednost odabrana kao optimalna. Takođe, analizom realnih uzoraka, kao i model-rastvora vitamin B₁ – interferirajuća supstanca, utvrđeno je da je selektivnost određivanja bila najbolja pri ovoj vrednosti potencijala akumulacije. Pri negativnijoj vrednosti potencijala (-1,405 V), dolazilo je do opadanja vrednosti analitičkog signala (Slika 12).



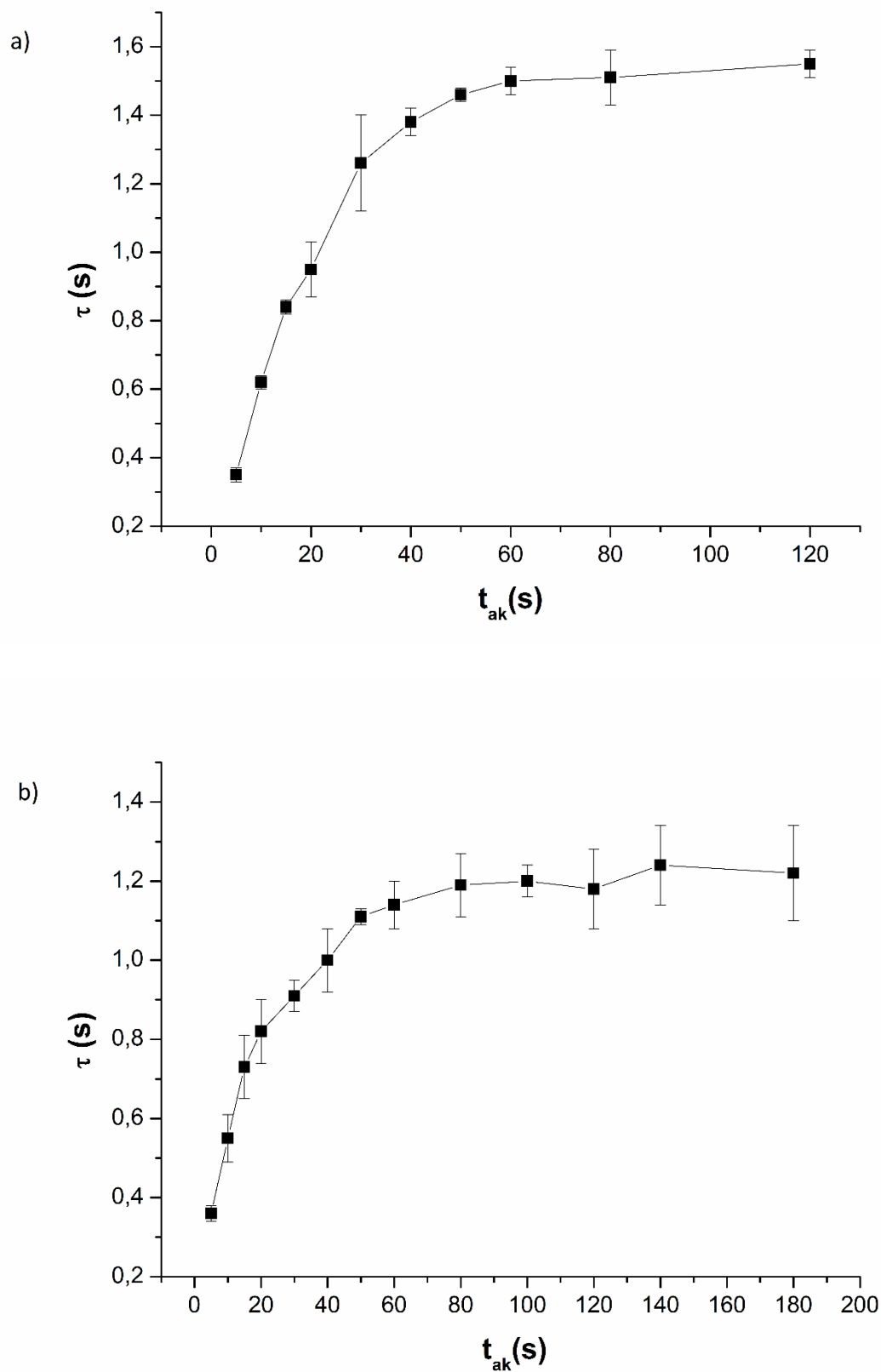
Slika 12. Zavisnost analitičkog signala vitamina B₁ od potencijala akumulacije. $C_m = 40$ mg/l;

$$t_{ak} = 50 \text{ s}; I = 2,9 \mu\text{A}.$$

4.1.1.3. Ispitivanje uticaja vremena akumulacije i uslova prenosa mase na analitički signal vitamina B₁

Uticao vremena akumulacije u difuzionim uslovima prenosa mase je ispitan u rastvorima sadržaja vitamina B₁ od 10 i 40 mg/l. Primenjeni potencijal akumulacije je iznosio -1,313 V, a završni potencijal -0,2 V. Za manji sadržaj vitamina saopštavana je struja oksidacije od 1,1 μA, a za veći, 2,9 μA. Sa porastom vremena akumulacije (t_{ak}), povećavalo se i vreme oksidacije vitamina B₁ (τ) (Slika 13). Analitički signal se povećavao do saopštenog vremena akumulacije od 50 s, za oba ispitana sadržaja vitamina, nakon čega je vrednost postajala približno konstantna. Zakrivljenje funkcije i ustaljenje analitičkog signala je verovatno posledica zasićenja površinskog sloja tankoslojne živine elektrode, pri dužim vremenima akumulacije, što ukazuje na to da je adsorpcija analita dominantan faktor pri njegovom izdvajanju na radnoj elektrodi. Kako je potencijal akumulacije imao uticaja na vrednost analitičkog signala, može se zaključiti da se vitamin B₁ deponuje na tankoslojnoj živinoj elektrodi kontrolisanom nespecifičnom adsorpcijom.

U daljim ispitivanjima primenjeno je vreme akumulacije od 50 s u mirnom rastvoru, nezavisno od koncentracije ispitivanog rastvora vitamina B₁. Ponovljivost analitičkog signala vitamina B₁ pri navedenom vremenu akumulacije, za obe ispitane koncentracije, bila je vrlo dobra (RSD ≤ 1,27%; n = 3).



Slika 13. Uticaj vremena akumulacije u mirnim uslovima na analitički signal vitamina B₁ za:
a) 10 mg/l ($I = 1,1 \mu\text{A}$) i b) 40 mg/l vitamina B₁ ($I = 2,9 \mu\text{A}$). $E_{ak} = -1,313 \text{ V}$.

4.1.1.4. Ispitivanje uticaja debljine tankoslojne živine elektrode na analitički signal vitamina B₁

Uticaj debljine tankoslojne živine elektrode na veličinu analitičkog signala vitamina B₁ ispitan je u rastvorima sadržaja 10 mg/l i 50 mg/l. Analize su izvedene pri potencijalu akumulacije od -1,313 V i vremenu akumulacije od 50 s. Za manji sadržaj vitamina, saopštena je oksidaciona struja od 1,1 μA, a za veći sadržaj, struja od 3,4 μA. Vreme deponovanja žive ispitano je u intervalu od 60 – 240 s, pri struji deponovanja od 50 μA, što je odgovaralo debljini tankoslojne živine elektrode od 32,5 nm – 129,8 nm. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 5, iz koje se može videti da debljina sloja živine elektrode nema značajnog uticaja na analitički signal vitamina B₁, što predstavlja još jednu potvrdu da efikasnost koncentrovanja vitamina, pre svega, zavisi od uslova bitnih za adsorpciju analita, odnosno, prvenstveno je bitna površina, dok zapremina filma žive ne utiče na osetljivost određivanja. Odabrano vreme deponovanja žive iznosilo je 240 s, zbog najbolje reproduktivnosti i nešto većeg analitičkog signala (verovatno zbog homogenosti sloja), u odnosu na ostale ispitane vrednosti.

Tabela 5. Uticaj debljine sloja žive na analitički signal vitamina B₁

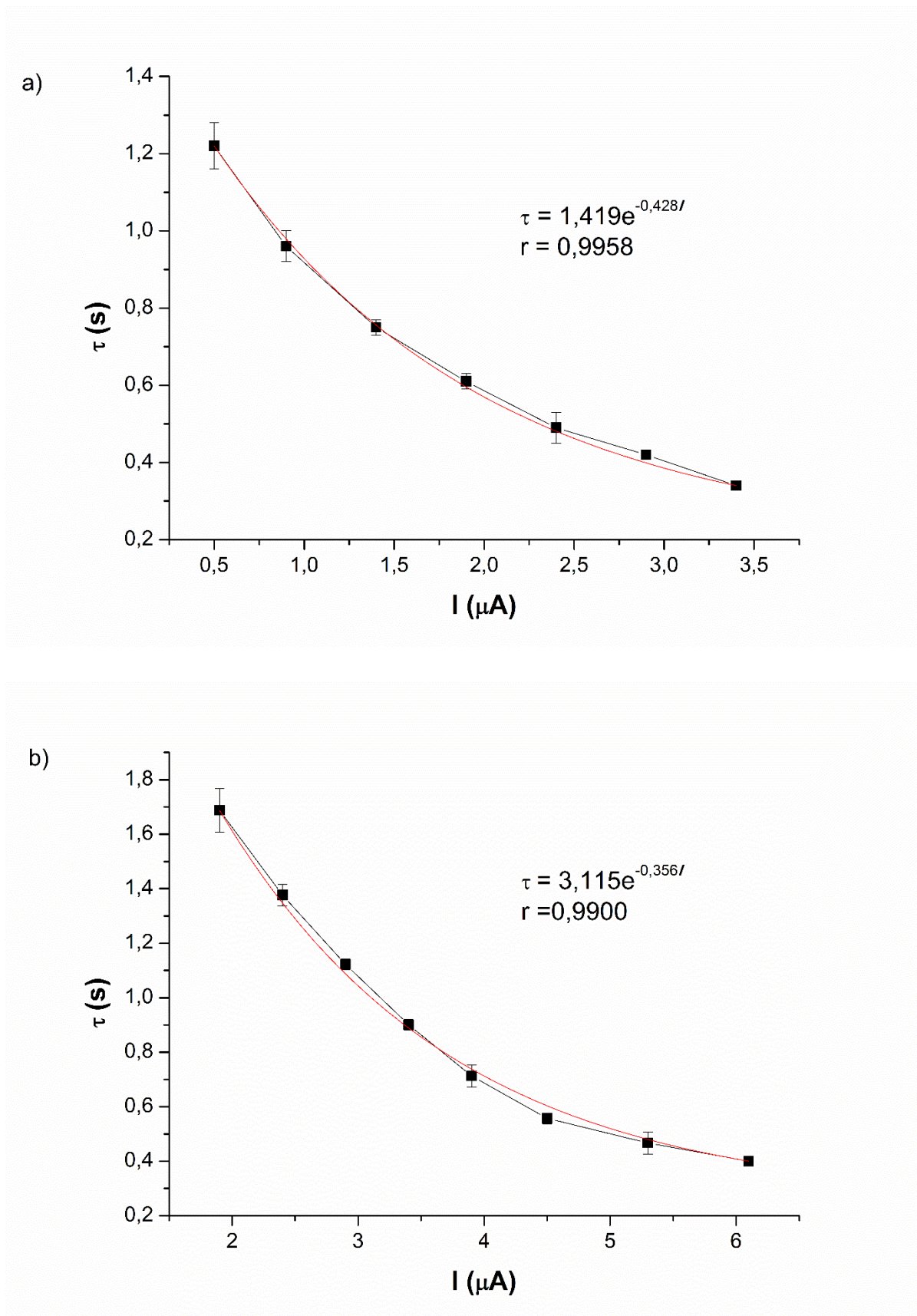
<i>Sadržaj vitamina B₁</i>	<i>Debljina sloja Hg (nm)</i>	<i>Vreme oksidacije vitamina B₁ (s)</i>	<i>RSD (%)</i>
10 mg/l	32,5 (60 s) ^a	1,01 ± 0,06 ^b	2,50
	64,9 (120 s)	0,99 ± 0,08	3,64
	97,4 (180 s)	0,99 ± 0,06	2,91
	129,8 (240 s)	1,02 ± 0,02	1,14
50 mg/l	32,5 (60 s)	1,13 ± 0,04	2,17
	64,9 (120 s)	1,12 ± 0,08	3,34
	97,4 (180 s)	1,14 ± 0,08	3,30
	129,8 (240 s)	1,16 ± 0,02	1,22

^aVreme deponovanja tankoslojne živine elektrode; ^bSrednja vrednost ± 2SD, n = 3.

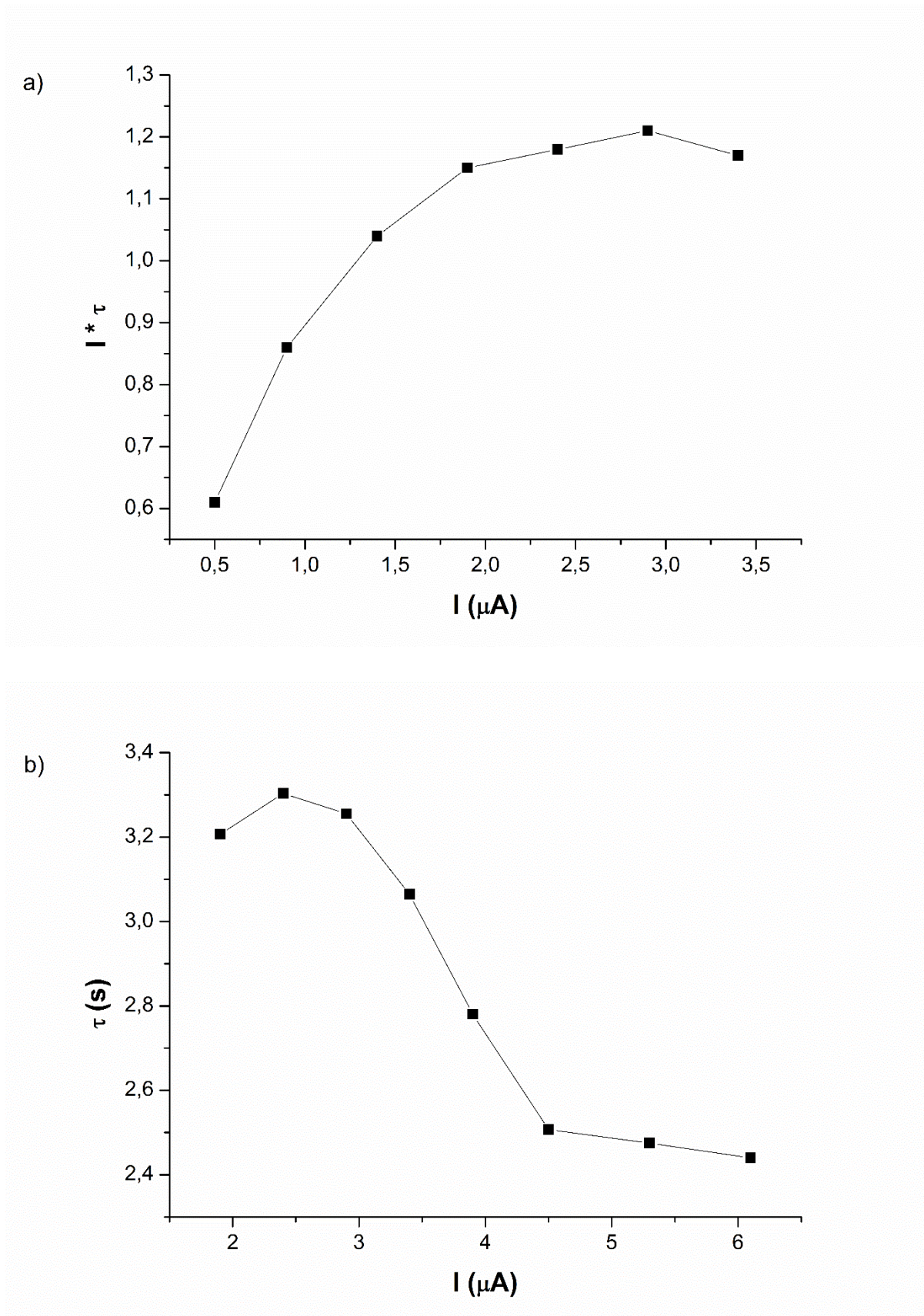
4.1.1.5. Ispitivanje uticaja struje rastvaranja na analitički signal vitamina B₁

Uticaj struje rastvaranja (struje oksidacije) ispitan je u rastvoru vitamina B₁ sadržaja 10 mg/l, u opsegu 0,5 – 3,4 μA i u rastvoru vitamina B₁ sadržaja 50 mg/l, u opsegu 1,9 – 6,1 μA, pri sledećim eksperimentalnim uslovima: potencijal akumulacije -1,313 V, vreme akumulacije u mirnom rastvoru 50 s i završni potencijal -0,2 V. Za oba sadržaja vitamina B₁ zavisnost vremena oksidacije (τ) od primenjene struje (I) bila je eksponencijalnog karaktera (Slika 14, a i b). Na istoj slici prikazana je i 'fitovana' zavisnost vremena oksidacije od primenjene struje (crvena linija), njen analitički oblik i koeficijent korelacije (r).

Za određivanje optimalnog intervala struje rastvaranja u HSA preporučuje se primena kriterijuma $I \cdot \tau = f(I)$ (Suturović i sar., 1992). Zaravnjeni deo na dijagramu $I \cdot \tau = f(I)$ predstavlja optimalni interval struje. Navedeni kriterijum je prikazan na Slici 15a i b, za masenu koncentraciju 10 mg/l i 50 mg/l vitamina B₁, redom. Na izbor odgovarajućeg intervala utiče osetljivost, veličina i reproduktivnost analitičkog signala. Za sadržaj vitamina od 10 mg/l optimalna vrednost struje nalazila se u intervalu 1,9 – 3,4 μA, dok se za sadržaj 50 mg/l, najpogodnija vrednost struje nalazila u opsegu od 4,5 – 6,1 μA, odnosno, za analizu rastvora niže masene koncentracije vitamina B₁ bilo je potrebno saopštiti niže vrednosti struje, i obrnuto. Sa povećanjem struje rastvaranja analita, potencijal oksidacije vitamina B₁ se pomerao u katodnom smeru, od -0,428 V do -0,51 V. Pri odgovarajućoj struji rastvaranja ponovljivost vrednosti potencijala rastvaranja je bila dobra, odnosno za obe ispitivane koncentracije vitamina srednja vrednost RSD je iznosila 2,7%.



Slika 14. Zavisnost analitičkog signala vitamina B₁ od struje oksidacije za a) 10 mg/l i b) 50 mg/l vitamina B₁. E_{ak} = -1,313 V; t_{ak} = 50 s.



Slika 15. Kriterijum $I \cdot \tau = f(I)$ za: a) 10 mg/l i b) 50 mg/l vitamina B₁

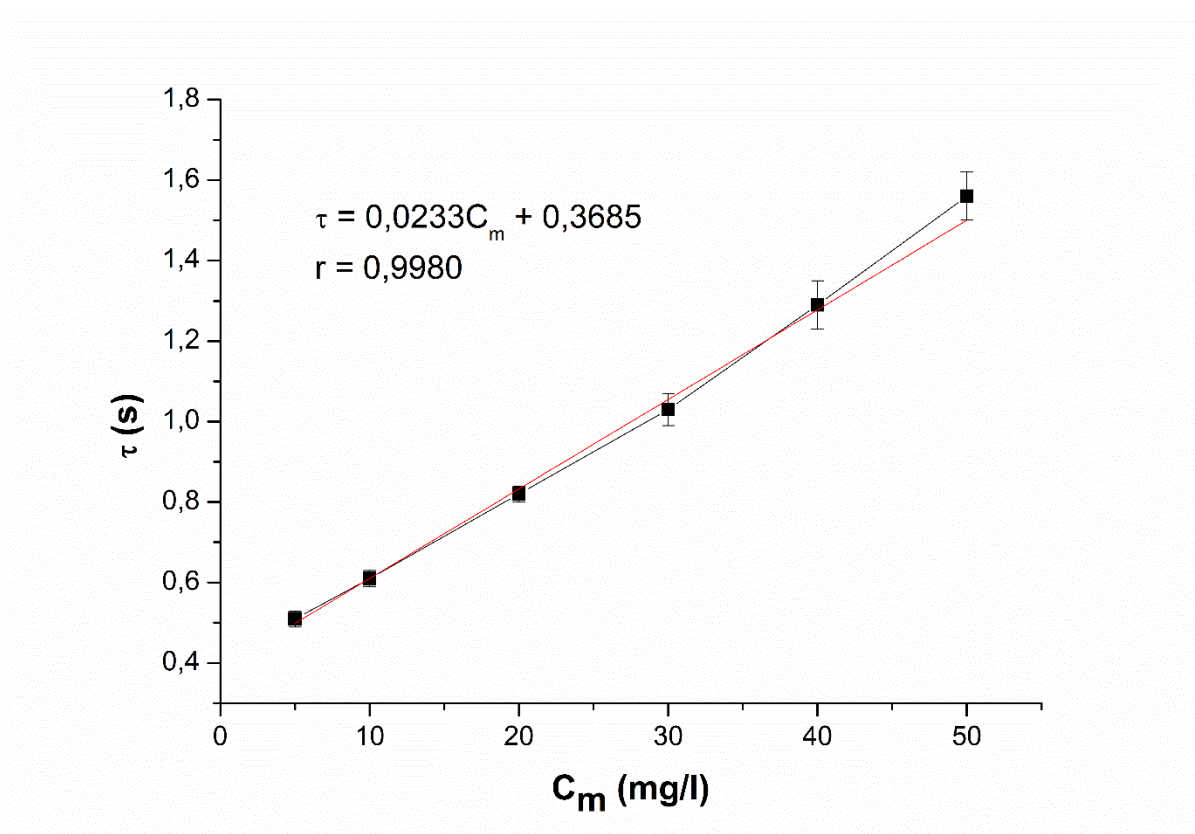
4.1.2. Validacija metode

4.1.2.1. Linearnost

Ispitivanje linearnosti metode izvedeno je u opsegu sadržaja vitamina B₁ od 5 – 50 mg/l, pri čemu je struja oksidacije iznosila 1,9 μA. Na izbor opsega sadržaja, najviše je uticao sadržaj vitamina B₁ u realnim uzorcima, odnosno multivitaminskim dodacima ishrani. Pri odgovarajućim eksperimentalnim uslovima utvrđena je veoma dobra linearna zavisnost merenog oksidacionog vremena (τ) od sadržaja vitamina B₁ (C_m), na šta ukazuje visoka vrednost koeficijenta korelacije ($r = 0,9980$), a koja je predstavljena jednačinom $\tau (s) = 0,0233 \cdot C_m (mg/l) + 0,3685$. Na Slici 16 prikazana je zavisnost vremena oksidacije od sadržaja vitamina B₁, kao srednja vrednost pet kalibracionih kriva.

Za sadržaje veće od 50 mg/l, zavisnost analitičkog signala od sadržaja vitamina odstupa od linearne, tj. dolazi do zakrivljena funkcije prema 'x'-osi, što ponovo ukazuje da je dominantan faktor adsorpcije, odnosno, pri većim koncentracijama analita, dolazi do zasićenja površine živine elektrode, analogno dužim vremenima akumulacije. Relativno velika vrednost odsečka kalibracione krive je najvećim delom nastajala zbog toga što je analizator u analitički signal uračunao i početak hronopotenciograma (baznu liniju), a ne samo širinu platoa koji pripada oksidaciji vitamina B₁.

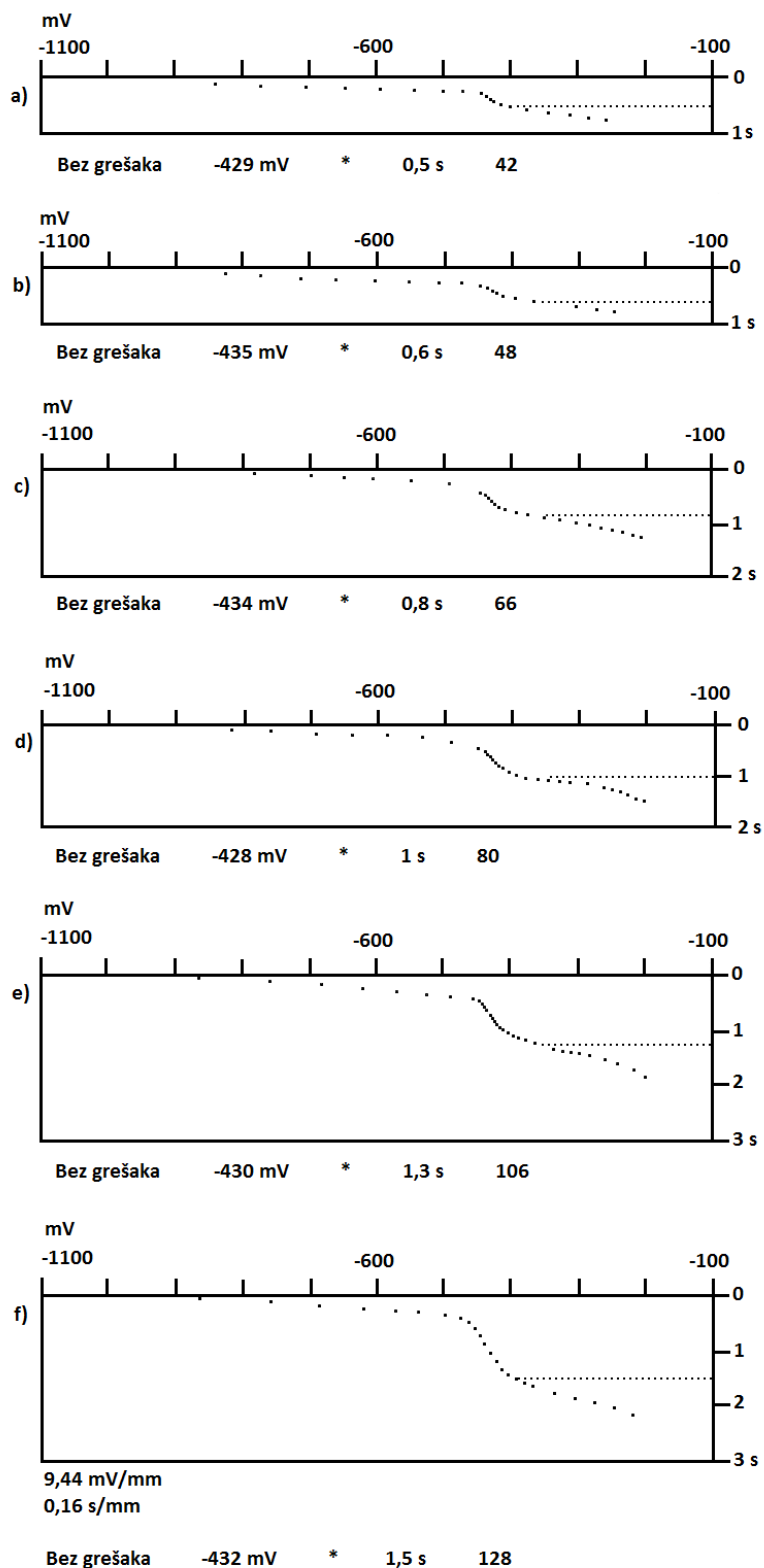
Zbog velike vrednosti odsečka, za kvantitativno određivanje vitamina u realnim uzorcima potrebno je primeniti metodu kalibracione krive, tj. ne preporučuje se primena metoda dodatka standarda. Vrednost standardne devijacije koeficijenta pravca iznosila je 0,0007 (s · mg/l), dok je vrednost standardne devijacije odsečka bila 0,0115 (s) (Slika 16).



Slika 16. Linearnost: zavisnost vremena oksidacije od sadržaja vitamina B₁ (5 – 50 mg/l).

$$E_{ak} = -1,313 \text{ V}; t_{ak} = 50 \text{ s}; I = 1,9 \mu\text{A}.$$

Hronopotenciogrami dobijeni analizom rastvora vitamina B₁ masene koncentracije 5 – 50 mg/l prikazani su na Slici 17.



Slika 17. Hronopotenciogrami dobijeni analizom rastvora vitamina B₁: a) 5 mg/l; b) 10 mg/l; c) 20 mg/l; d) 30 mg/l; e) 40 mg/l; f) 50 mg/l. $E_{ak} = -1,313$ V; $t_{ak} = 50$ s; $I = 1,9$ μ A. Pomoćni elektrolit: citratni pufer pH 6 (0,2 mol/l).

Na hronopotenciogramima se može uočiti veoma dobra ponovljivost potencijala rastvaranja vitamina B₁ (RSD = 0,71%), čime je potvrđeno da su odabrani odgovarajući eksperimentalni uslovi.

4.1.2.2. Granica detekcije i granica kvantitativnog određivanja

Granica detekcije i granica kvantitativnog određivanja su računane prema ranije navedenim kriterijumima za određivanje LOD i LOQ vrednosti (Izrazi I i II), pri čemu su korišćene vrednosti standardne devijacije odsečka i srednja vrednost nagiba kalibracione krive. Izračunate vrednosti LOD i LOQ su iznosile 1,64 mg/l i 4,97 mg/l, redom. Poređenjem razvijene metode sa ranije objavljenim elektroanalitičkim metodama za određivanje vitamina B₁, može se uočiti da je osetljivost predložene adsorpcione hronopotenciometrijske metode bila znatno manja od adsorpcionih voltametrijskih striping tehnika navedenih u Tabeli 6.

Najveća osetljivost određivanja vitamina B₁ je postignuta primenom diferencijalno pulsne adsorpcione striping voltametrije, diferencijalno pulsne anodne striping voltametrije, adsorpcione striping voltametrije i adsorpcione striping voltametrije sa pravougaonim impulsima. U kombinaciji sa navedenim tehnikama primenjivane su elektrode od ugljenične paste modifikovane nanocevčicama *višezidne* modifikacije, modifikovana grafitna elektroda, elektroda živine kapi i tankoslojna olovna elektroda. Cilj modifikacije radnih elektroda je povećanje osetljivosti određivanja, pri čemu se velika pažnja mora posvetiti postupku pripreme ovih elektroda, kako bi se dobila njihova reproduktivna površina i sastav, u cilju dobijanja odgovarajuće reproduktivnosti analiza. Aboul-Kasim (2000) je, primenjujući adsorpcionu striping voltametriju sa linearnom promenom potencijala na elektrodi živine kapi postigao izuzetno nisku granicu detekcije vitamina B₁, kombinujući efekat adsorpcije sa katalitičkim efektom.

Posmatrajući linearne opsege metoda prikazanih u Tabeli 6, može se uočiti da se striping tehnikama postizala linearnost u oblasti masenih koncentracija vitamina manjih od 1 mg/l.

Priprema tankoslojne živine elektrode, koja je primenjena u ovom radu, relativno je jednostavna, a površina elektrode je reproduktivna. Ostvarene vrednosti LOD i LOQ su bile dovoljne za praktičnu primenu, odnosno, za određivanje vitamina B₁ u uzorcima multivitaminskih dodataka ishrani.

Tabela 6. Poređenje razvijene metode sa ranije objavljenim elektroanalitičkim metodama za određivanje vitamina B₁.

Tehnika	Radna elektroda	Pomoćni elektrolit	Linearni opseg (mg/l)	LOD (mg/l)	Literatura
SWV	SPCE	Fosfatni pufer pH 11 + 0,1 mol/l NaCl	15-110	3,5	Westmacott i sar., 2018
DPASV	MIP-PGE	0,01 mol/l KCl pH 5,5	0,0006-0,0194	$1,7 \cdot 10^{-4}$	Prasad i sar., 2017
DPAdSV	MWCNTPE	Acetatni pufer pH 6,3	0,0337-0,3370	$3,71 \cdot 10^{-5}$	Brahman i sar., 2013a
DPV	DNK-modifikovana MWCNTPE	Acetatni pufer pH 6,3	1,0-80	0,44	Brahman i sar., 2013b
DPAdSV	MWCNTPE		0,0025-0,80	$1,1 \cdot 10^{-3}$	
SWAdSV	PbFE	Acetatni pufer pH 5,6	0,0133-0,265	$5,3 \cdot 10^{-3}$	Tyszcuk-Rotko, 2012
SWV	Cys/SAM/Au	BR-pufer pH 11,4	0,0037-0,742	$1,86 \cdot 10^{-3}$	Wan i sar., 2002
CV	MnPc-CPE	Tris pufer pH 10	3,37-337,27	3,37	Oni i sar., 2001
AdVSA	MDE	Fosfatni pufer pH 6,2	$3,37 \cdot 10^{-4}$ - 0,337	$3,37 \cdot 10^{-4}$	Aboul-Kasim, 2000
AdHSA	MFE	Citratni pufer pH 6	5-50	1,64	Ova doktorska disertacija

Skrtaćenice: SWV – voltometrija sa pravougaonim impulsima (Square-Wave Voltammetry); SPCE – štampana elektroda od ugljenične paste (Screen-Printed Carbon Electrode); DPASV – diferencijalno pulsna anodna striping voltometrija; MIP-PGE – grafitna elektroda modifikovana molekulski obeleženim polimerima (Molecularly Imprinted Polimers modified Pencil Graphite Electrode); DPAdSV – diferencijalno pulsna adsorpciona striping voltometrija; MWCNPE – elektroda od ugljenične paste modifikovana višezidnim ugljeničnim nanocevčicama (Multi Walled Carbon Nanotube Paste Electrode); DPV – diferencijalno pulsna voltometrija; SWAdSV – adsorpciona striping voltometrija sa pravougaonim impulsima; PbFE – tankoslojna olovna elektroda (Lead Film Electrode); Cys/SAM/Au – zlatna elektroda modifikovana spontano formiranim slojem L-cisteina (Self-Assembled Electrode of L-Cysteine); CV – ciklična voltometrija; MnPc-CPE – elektroda od ugljenične paste modifikovana mangan ftalocijaninom (Carbon Paste Electrode modified with manganese phthalocyanine); AdVSA – adsorpciona voltometrijska striping analiza (sa linearnom promenom potencijala); MDE – živina elektroda u obliku kapi (Mercury Drop Electrode); AdHSA – adsorpciona hronopotenciometrijska striping analiza; MFE – tankoslojna živina elektroda (Mercury Film Electrode).

4.1.2.3. Preciznost

Preciznost je ocenjena na osnovu ponovljivosti i reproduktivnosti za dve masene koncentracije vitamina B₁: 10 mg/l i 50 mg/l, pri čemu su saopštene oksidacione struje iznosile 0,9 μ A i 2,9 μ A, redom. Ponovljivost, izražena kao RSD, za 10 mg/l iznosila je 2,66%, dok je za 50 mg/l vitamina B₁ ova vrednost iznosila 1,98%. Reprodutivnost metode, izražena kao RSD, iznosila je 3,74% i 2,85% za 10 mg/l i 50 mg/l vitamina, redom. Dobijene vrednosti RSD ukazuju na veoma dobru eksperimentalnu preciznost i preciznost razvijene metode za određivanje vitamina B₁ hronopotenciometrijskom striping analizom.

4.1.2.4. Ispitivanje interferencija

Pri analizi multivitaminskih preparata, drugi prisutni vitamini, punioci, kao i pomoćne supstance mogu da izazovu interferencije. Proizvodi koji sadrže vitamin B₁ obično sadrže i vitamine A, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C, D₃, E, folnu kiselinu i aditive. Ispitan je uticaj vitamina B₂ i B₃ pojedinačno, kao i zajednički rastvor vitamina B₂ i B₃, uticaj vitamina B₆, vitamina C, limunske kiseline, dekstroze i saharoze, pri masenim koncentracijama vitamina B₁ od 10 mg/l i od 50 mg/l. Opsezi masenih koncentracija interferirajućih supstanci i njihov uticaj na analitički signal vitamina B₁ dati su u Tabelama 7 i 8. S obzirom na ostvarenu preciznost metode (RSD \leq 3,74%), supstanca je smatrana interferirajućom ukoliko dovodi do promene analitičkog signala vitamina B₁ koja je veća od 5%. Kao što se iz tabela može videti, interferencije su se javljale u prisustvu vitamina B₂, ali tek ako je njegov sadržaj bio 9 puta veći od sadržaja vitamina B₁, i u prisustvu vitamina B₃, ako je njegov sadržaj bio 12 puta veći (za sadržaj vitamina B₁ od 10 mg/l), odnosno, 15 puta veći (za sadržaj vitamina B₁ od 50 mg/l). Prisustvo ovako visokih sadržaja vitamina dovelo je, u slučaju vitamina B₂, do potpunog gubitka signala za vitamin B₁, dok 12, odnosno 15 puta veći sadržaj vitamina B₃ dovodi do smanjenja analitičkog signala vitamina B₁ za oko 20 – 30%. Zajednički rastvor vitamina B₂ i B₃ dovelo je do približno iste vrednosti promene analitičkog signala vitamina

B₁ kao i njihovi pojedinačni rastvori. U prisustvu šest puta većeg sadržaja vitamina B₂ (60 mg/l) i deset puta većeg sadržaja vitamina B₃ (100 mg/l) u smeši, analitički signal vitamina B₁ (10 mg/l) se nije značajnije menjao, dok je u prisustvu devet puta većeg sadržaja vitamina B₂ (90 mg/l) i istog sadržaja vitamina B₃ (100 mg/l), došlo do potpunog gubitka analitičkog signala vitamina B₁. U prisustvu 60 mg/l vitamina B₂ i 120 mg/l vitamina B₃ javljao se signal vitamina B₁ (umanjen za 26%), što predstavlja jasan dokaz da je gubitak analitičkog signala vitamina B₁ posledica prisustva devet puta većeg sadržaja vitamina B₂. Svakako da je smanjenje signala vitamina B₁ sa prihvatljivih 5,1% na 26%, uzrokovano uticajem vitamina B₃ (Tabela 7).

Analizom 50 mg/l vitamina B₁ (Tabela 8) u prisustvu duplo većeg sadržaja vitamina B₂ (100 mg/l) i deset puta većeg sadržaja vitamina B₃ (500 mg/l), nije došlo do značajnije promene analitičkog signala, međutim, u prisustvu istog sadržaja vitamina B₂ (100 mg/l) i 15 puta većeg sadržaja vitamina B₃ (750 mg/l), došlo je do pada veličine analitičkog signala za oko 30%. Pad analitičkog signala vitamina B₁ je posledica povećanja sadržaja vitamina B₃. Analitički signal vitamina B₂ se javljao pri sadržaju od 5 mg/l, na potencijalu od oko -0,16 V, a analitički signal vitamina B₃ se javljao pri sadržaju od oko 50 mg/l, na potencijalu od oko -0,25 V.

Uticaj vitamina B₆, vitamina C i limunske kiseline, kao i dekstroze i saharoze, na analitički signal vitamina B₁, nije bio značajan ni za jedan ispitivani sadržaj vitamina B₁. Limunska kiselina je ulazila u sastav pufera, ali je njen uticaj ipak ispitan s obzirom na veliku rasprostranjenost ove kiseline u prehrambenim proizvodima i multivitaminskim dodacima ishrani. Kako se u slepoj probi nije javljao signal analita, bilo je za očekivati da uticaj limunske kiseline na analitički signal vitamina B₁ nije značajan. S obzirom na rezultate prikazane u Tabelama 7 i 8, može se izvesti zaključak da je, u pogledu interferencija, za analizu vitamina B₁ primenom hronopotenciometrijske striping analize, bitan odnos vitamina B₁ i interferenta, nezavisno od koncentracije vitamina i interferirajućeg jedinjenja. I pored postojanja interferencija od strane vitamina B₂ i B₃, razvijena metoda se pokazala dovoljno selektivnom za određivanje vitamina B₁ u multivitaminskim dodacima ishrani, koji u većini slučajeva sadrže približno iste količine vitamina B₁ i B₂ i oko 5 – 10 puta veću količinu vitamina B₃.

Tabela 7. Uticaj ispitivanih interferenata na analitički signal vitamina B₁ sadržaja 10 mg/l.

Sadržaj vitamina B₁ : 10 mg/l		
Interferent	Sadržaj interferenta (mg/l)	Promena signala (%)
B₂	5 – 60	-3,1 ^a
	90	n.d.
B₃	5 – 100	-5,0
	120	-22,4
B₂ + B₃	5 – 60	-2,0
	60 mg/l B₂, 100 mg/l B₃	-5,1
	60 mg/l B₂, 120 mg/l B₃	-25,9
	90 mg/l B₂, 100 mg/l B₃	n.d.
B₆		5,1
C	5 – 100	5,0
Citratna kiselina		4,9
Interferent	Sadržaj interferenta (g/l)	Promena signala (%)
Dekstroza	5 - 50	5,0
Saharozna		4,1

^aVrednosti prikazane u tabeli su maksimalne promene signala za dati koncentracioni opseg ispitivane interferencije; n.d. – nije detektovan.

$$\text{Promena signala (\%)} = \frac{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)} - \text{vrednost signala sa dodatim interferentom (s)}}{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)}} \cdot 100$$

Tabela 8. Uticaj ispitivanih interferenata na analitički signal vitamina B₁ sadržaja 50 mg/l.

Sadržaj vitamina B₁ : 50 mg/l			
Interferent	Sadržaj interferenta (mg/l)	Promena signala (%)	
B₂	5 – 100	-4,7 ^a	
B₃	25 – 500	4,6	
	750	-27,4	
B₂ + B₃	10 – 100	0,9	
	100 mg/l B₂ +	250 mg/l B₃	-3,6
		500 mg/l B₃	-5,1
		750 mg/l B₃	-29,7
B₆		4,8	
C	20 – 200	-4,4	
Citratna kiselina		4,7	
Interferent	Sadržaj interferenta (g/l)	Promena signala (%)	
Dekstroza	5 - 50	4,9	
Saharozna		4,8	

^aVrednosti prikazane u tabeli su maksimalne promene signala za dati koncentracioni opseg ispitivane interferencije.

$$\text{Promena signala (\%)} = \frac{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)} - \text{vrednost signala sa dodatim interferentom (s)}}{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)}} \cdot 100$$

Prisustvo vitamin B₂ je uticalo na potencijal rastvaranja vitamina B₁, blago ga pomerajući u anodnom smeru (potencijal rastvaranja se kretao od -430 mV do -420 mV, RSD = 4,42%). Ostali ispitivani interferenti nisu imali značajnog uticaja na potencijal rastvaranja vitamina B₁, koji se kretao u opsegu od -428 mV do -434 mV.

Prisustvo retinola (vitamina A), holekalciferola (vitamina D₃) ili α-tokoferola (vitamin E) takođe nije uzrokovalo smetnje u ovim ispitivanjima, što se i očekivalo, s obzirom na njihovu malu rastvorljivost u vodi, tj. u primenjenom pomoćnom elektrolitu.

4.1.2.5. Primena i tačnost

Sadržaji vitamina B₁ u analiziranim realnim uzorcima, dobijeni primenom razvijene metode, upoređeni su i diskutovani sa vrednostima deklarisanim od strane proizvođača, a tačnost metode je proverena paralelnim analizama uzoraka primenom HPLC metode, kao i 'testom povrata' (*recovery testom*).

4.1.2.6. Određivanje vitamina B₁ u multivitaminским dodacima ishrani

Vitamin B₁ je određivan u multivitaminским dodacima ishrani pri usvojenim eksperimentalnim uslovima, koji su prikazani u Tabeli 9.

Tabela 9. Optimalni uslovi za određivanje vitamina B₁ hronopotenciometrijskom striping analizom.

Parametar	Vrednost
Pomoćni elektrolit	Citratni pufer pH 6, 0,2 mol/l
Potencijal elektrolize	-1,313 V
Struja oksidacije, opseg	1,9 – 6,1 μ A
Vreme predelektrolize	50 s u difuzionim uslovima prenosa mase

Uzorci i način pripreme uzoraka su opisani u poglavlju 3.6. *Uzorci i priprema uzoraka za analizu*. Sadržaj vitamina B₁ je određen metodom kalibracione krive. Srednje vrednosti sadržaja vitamina B₁, za tri ponavljanja, dobijene razvijenom i komparativnom HPLC metodom predstavljene su u Tabeli 10.

Tabela 10. Sadržaj vitamina B₁ u multivitaminским dodacima ishrani dobijen primenom razvijene HSA metode i komparativne HPLC metode.

Uzorak	Sadržaj vitamina B ₁ (mg/tableti)		
	HSA	HPLC	Deklarisani sadržaj
MVT1	1,00 ± 0,03 ^a	1,04 ± 0,04	1,50
MVT2	2,82 ± 0,05	3,21 ± 0,05	2,00
BKT1	2,72 ± 0,19	2,32 ± 0,01	5,00
BKT2	2,74 ± 0,02	2,82 ± 0,1	3,00
BKT3	7,63 ± 0,14	7,08 ± 0,04	10,00
BKT4	1,14 ± 0,08	1,20 ± 0,00	1,40

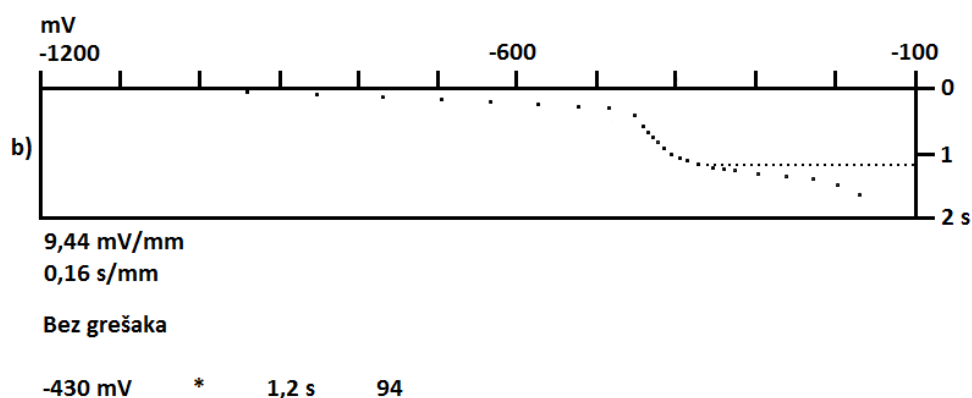
^asrednja vrednost ± 2SD (n = 3);

MVT1 i MVT2 – multivitaminски dodaci ishrani u vidu tableta, koji pored kompleksa vitamina B sadrže i vitamine A, D, E i K, kao i mineralne materije; BKT1, BKT2, BKT3 i BKT4 – kompleksi vitamina B, u vidu tableta.

Primenjeni *t*-test uparenih vrednosti je, uz 95% verovatnoću, pokazao je da nije bilo statistički značajnih razlika između rezultata hronopotenciometrijske striping analize i HPLC metode ($|t| = 0,45 < |t|_{\text{kritično}} = 2,57$). Takođe, *t*-test je pokazao da nisu postojale statistički značajne razlike ni između rezultata razvijene metode i deklariranih sadržaja vitamina B₁ ($|t| = 1,57 < |t|_{\text{kritično}} = 2,57$), iako su razlike uočljive. Rezultati dobijeni razvijenom metodom i metodom HPLC se relativno dobro slažu, iako razlike nisu bile jednoobrazne, tj. rezultati dobijeni primenom razvijene AdHSA metode nisu po pravilu bili veći ili manji od rezultata dobijenih primenom HPLC. Međutim, deklarirane vrednosti od strane proizvođača su bile značajno veće od određenih, bilo metodom AdHSA, bilo HPLC analizom. Dobijeni rezultati su

upozoravajući, ali ih ipak treba uzeti sa rezervom, jer analizirani uzorci nisu bili reprezentativni, odnosno, uzorkovani su metodom slučajnog izbora. Takođe, postoji mogućnost da je do razgradnje vitamina B₁ došlo i usled neadekvatnog skladištenja preparata. Ipak, s obzirom da je većina suplemenata, uključujući i vitaminske preparate, zakonskim propisima svrstana u hranu, sigurno je da je neophodna stroža kontrola sadržaja njihovih komponenti.

Hronopotenciogram dobijen pri analizi vitamina B₁ u uzorku BKT2 prikazan je na Slici 18.



Slici 18. Hronopotenciogram vitamina B₁ u uzorku BKT2. $E_{ak} = -1,313$ V, $t_{ak} = 50$ s, $I = 1,6$ μ A.

Ispravnost postupka pripreme uzoraka, kao i tačnost metode dodatno su provereni testom povrata (*recovery testom*), a rezultati su prikazani u Tabeli 11. Test povrata je urađen dvostrukim 'spajkovanjem' multivitaminskih preparata MVT2, BKT1 i BKT3. Vrednosti *recovery* testa su se kretale od 94,0% do 100,7%, ukazujući na to da je postupak pripreme uzoraka bio odgovarajući, odnosno da su primenjeni eksperimentalni uslovi rada omogućili analize bez značajnog uticaja matriksa uzoraka.

Tabela 11. Rezultati *recovery* testa vitamina B₁ u uzorcima multivitaminskih dodataka ishrani.

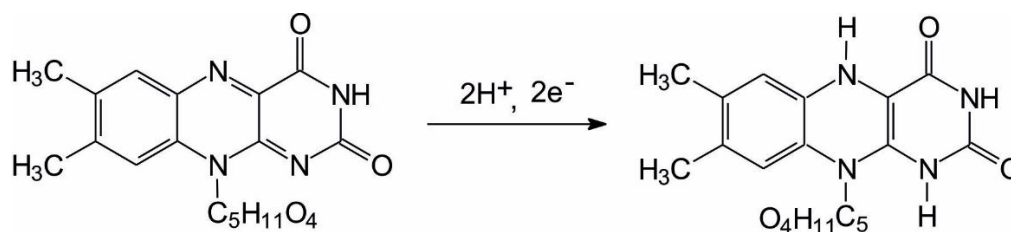
Uzorak	Sadržaj pre dodatka standarda (mg/tableti)	Dodati sadržaj standarda (mg/tableti)	Očekivani sadržaj (mg/tableti)	Sadržaj nakon dodatka standarda ^a (mg/tablet)	Recovery (%)
MVT1	2,82	1	3,82	3,76 ± 0,09	94,0
		3	5,82	5,73 ± 0,12	97,0
BKT1	2,72	1	3,72	3,68 ± 0,17	96,0
		3	5,72	5,74 ± 0,08	100,7
BKT3	7,63	1	8,63	8,60 ± 0,13	97,0
		3	10,63	10,58 ± 0,16	98,0

^asrednja vrednost ± 2SD, n = 3;

$$\text{Srednja vrednost recovery testa (\%)} = \frac{\text{sadržaj nakon dodatka standarda} - \text{sadržaj pre dodatka standarda}}{\text{dodati sadržaj}} \cdot 100$$

4.2. Hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂

Elektrohemijsko određivanje vitamina B₂ je moguće zahvaljujući elektrodukciji njegovog molekula na aktivnoj površini radne elektrode. Smatra se da se elektrodukcija vitamina B₂ odvija kao reverzibilni proces koji uključuje dva elektrona i dva protona (Qijin i sar., 2001; Safavi i sar., 2010):



U ovom radu razvijene su jednostavne hronopotenciometrijske metode određivanja vitamina B₂ na dvema geometrijski različitim elektrodama od staklastog ugljenika: planarnoj disk elektrodi i elektrodi u vidu procesne posude.

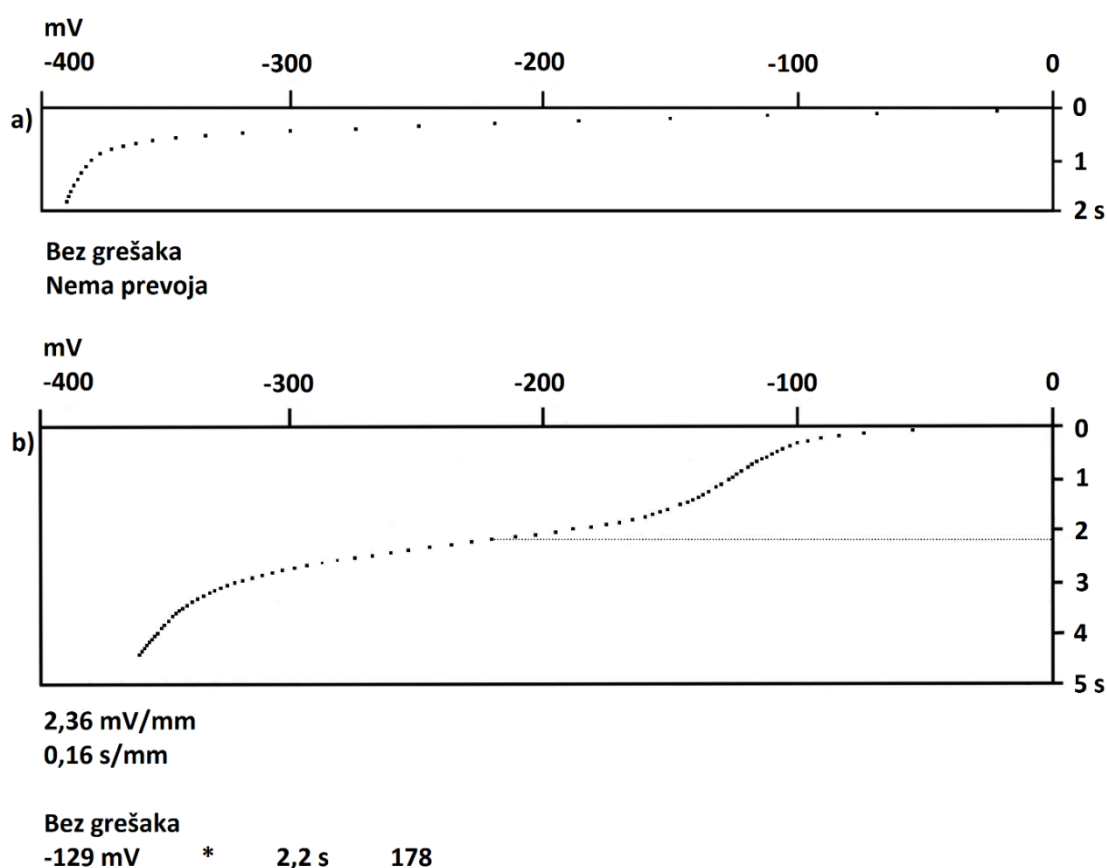
4.2.1. Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂ primenom planarne disk elektrode od staklastog ugljenika

Okvirni eksperimentalni uslovi koji omogućavaju dobijanje analitičkog signala vitamina B₂ ispitani su u rastvoru HCl koncentracije 0,01 mol/l. Sadržaj vitamina B₂ u ispitivanim rastvorima iznosio je 5 mg/l. Na elektrodi od staklastog ugljenika dolazilo je do redukcije ovog vitamina pri inicijalnom potencijalu od 0,1 V i saopštenoj konstantnoj struji reda veličine 2 μA. Dobijen je redukциони talas vitamina B₂ na potencijalu -0,12 V.

4.2.1.1. Ispitivanje uticaja vrste i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₂

U cilju izbora odgovarajućeg elektrolita za hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂, ispitani su uticaji rastvora hlorovodonične, nitratne i sumporne kiseline, natrijum-hlorida, kalijum-hlorida i natrijum-karbonata, u koncentracijama od 0,01 mol/l i 0,025 mol/l, ekvimolarne smeše NaCl + HCl (0,025 mol/l) i KCl + HCl (0,025 mol/l), kao i citratnog pufera (pH 4) i acetatnog pufera (pH 4,7) u koncentraciji od 0,1 mol/l. Koncentracija vitamina B₂ je iznosila 5 mg/l u svim ispitivanim rastvorima, pri čemu su primenjeni sledeći eksperimentalni uslovi: inicijalni potencijal 0,023 V, redukciona struja 1,3 μA i završni potencijal -0,4 V. Dobro definisani analitički signali vitamina B₂ su dobijeni u svim ispitivanim pomoćnim elektrolitima, izuzev u Na₂CO₃, u kome se signal vitamina B₂ nije javljao. Analitički signal riboflavina se javljao u relativno uskom opsegu potencijala od -0,115 V do -0,140 V u

rastvorima HCl, HNO₃, H₂SO₄, smeši 0,025 mol/l rastvora NaCl i HCl, kao i smeši 0,025 mol/l rastvora KCl i HCl. U rastvorima NaCl i KCl redukциони potencijal vitamina B₂ je bio pomeřen u katodnom smeru i kretao se u intervalima od -0,220 V do -0,245 V. U citratnom puferu signal se javljao u rasponu potencijala od -0,260 V do -0,275 V, dok je u acetatnom puferu signal uočen između -0,310 V i -0,330 V. Najveća vrednost analitičkog signala kao i hronopotenciogrami sa najbolje definisanim prevojnima tačkama ('najoštrij' signali), uz veoma dobru reproduktivnost (RSD = 2,43%, n = 5) dobijeni su u rastvoru HCl koncentracije 0,025 mol/l (Slika 19), zbog čega je ovaj pomoćni elektrolit usvojen kao optimalni u svim narednim eksperimentima (Brezo i sar., 2016). Ponovljivost signala u ostalim elektrolitima se kretala između 3,29% i 7,20% (n = 5).

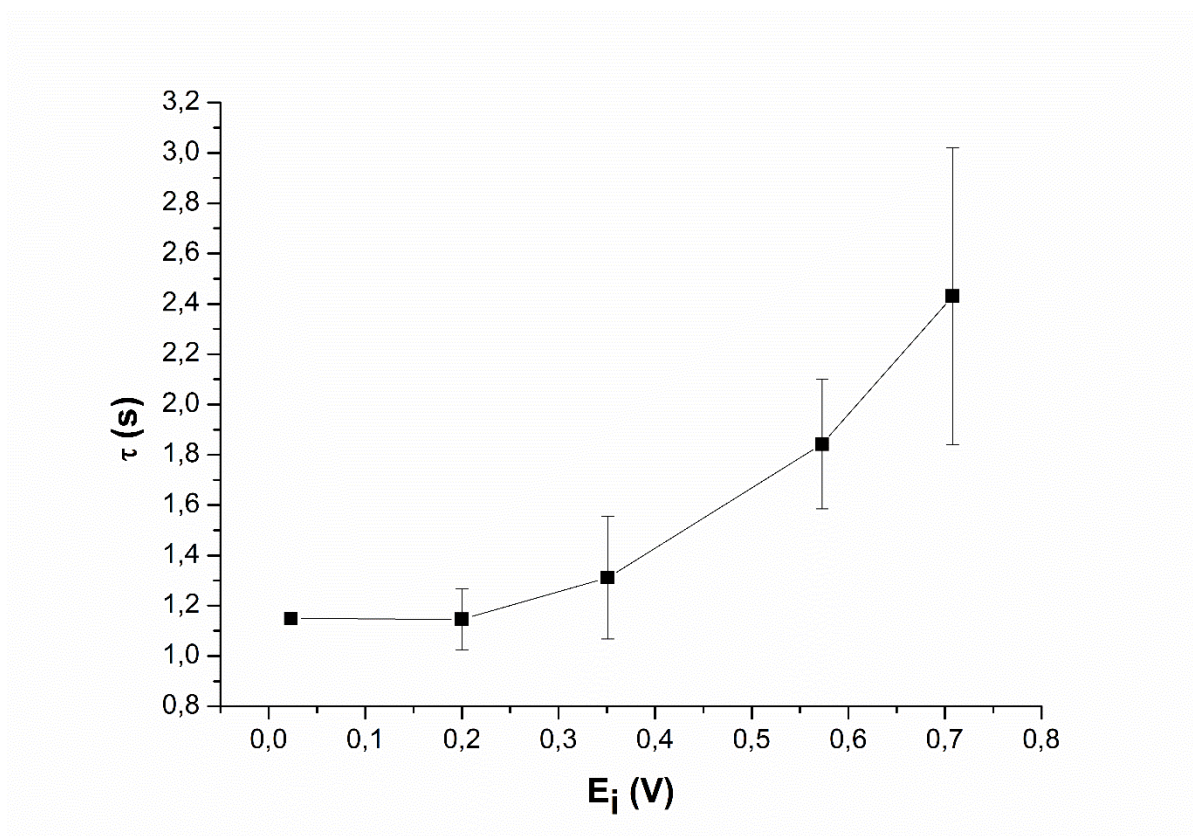


Slika 19. Hronopotenciogram dobijen analizom: a) 0,025 mol/l HCl kao pomoćnog elektrolita; b) model rastvora vitamina B₂ sadržaja 5 mg/l u pomoćnom elektrolitu.

$$E_i = 0,023 \text{ V}, I = 1,3 \text{ } \mu\text{A}.$$

4.2.1.2. Ispitivanje uticaja inicijalnog potencijala na analitički signal vitamina B₂

Uticaj inicijalnog potencijala (E_i) na analitički signal vitamina B₂ (τ) je ispitan u opsegu od 0,7 V do -0,1 V u rastvoru vitamina sadržaja 5 mg/l, prikazan je na Slici 20. Analize su izvedene u 0,025 mol/l HCl, uz struju redukcije od 0,8 μ A i završni potencijal od -0,4 V. Uočeno je da početni potencijali pozitivniji od 0,190 V dovode do razvlačenja hronopotenciograma (nedovoljno izražena prevojna tačka) koje je praćeno šumom visokog intenziteta. Primenom potencijala predelektrolize od -0,160 V analitički signal vitamina B₂ nije registrovan. Uzimajući u obzir vrednost i reproduktivnost analitičkog signala vitamina B₂ (RSD = 2,18%, n = 5), inicijalni potencijal od 0,023 V je usvojen kao optimalan.

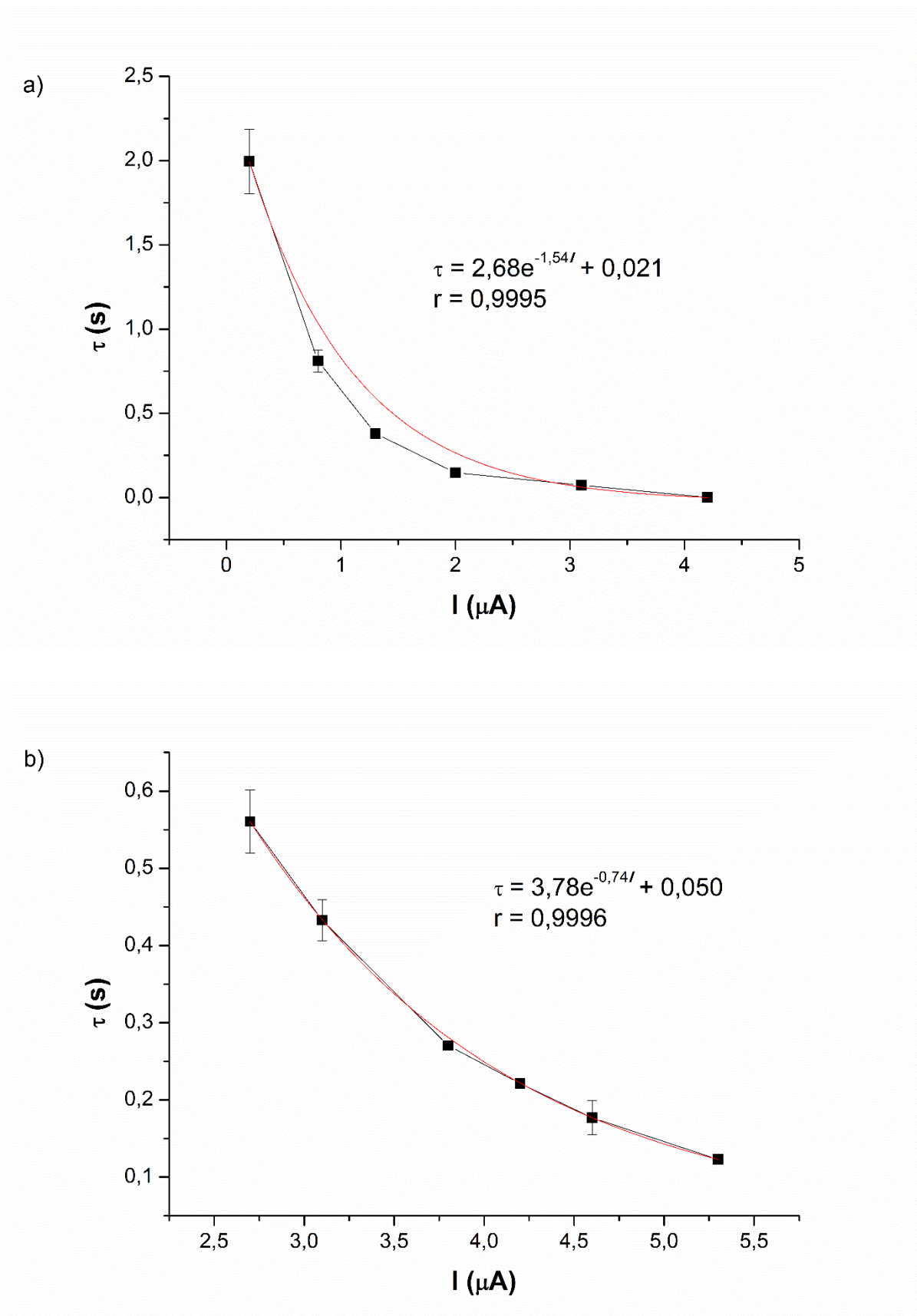


Slika 20. Uticaj početnog potencijala na analitički signal vitamina B₂ (± 2 SD, n = 5).

$$C_m = 5 \text{ mg/l}, I = 0,8 \text{ } \mu\text{A}.$$

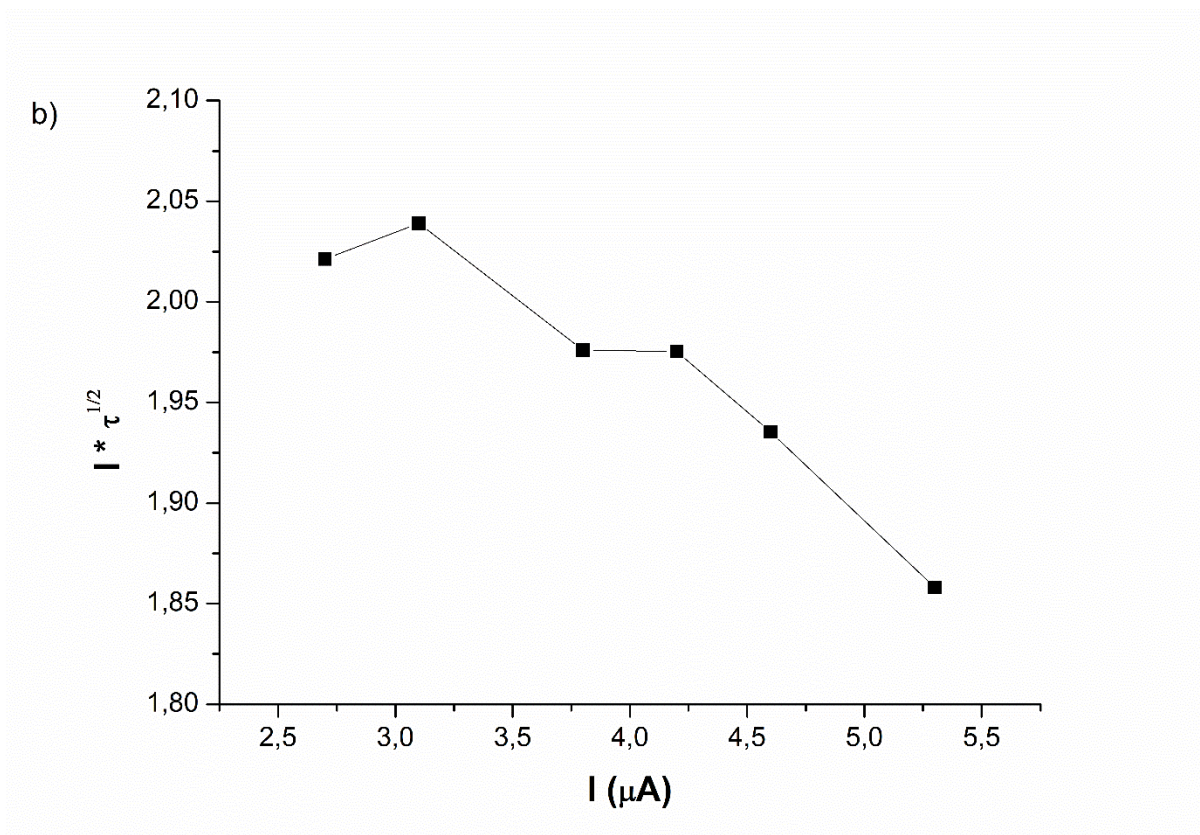
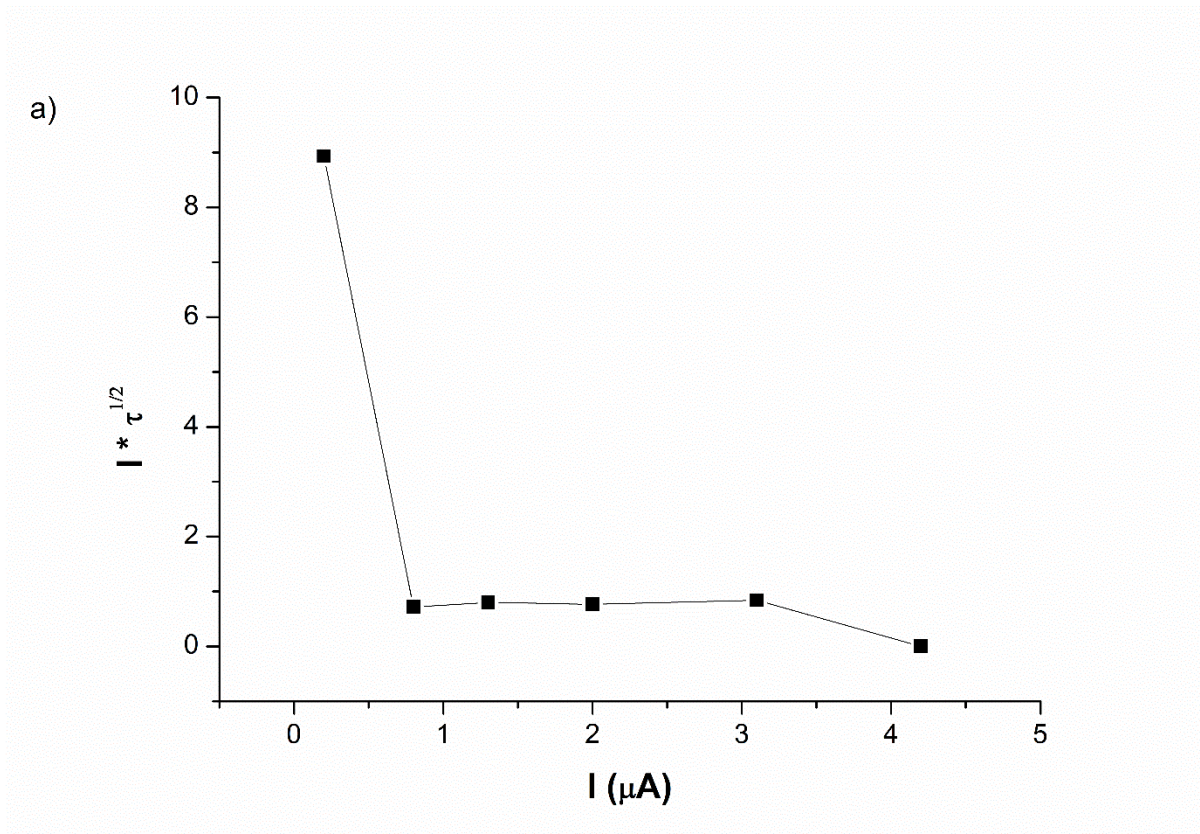
4.2.1.3. Ispitivanje uticaja struje redukcije na analitički signal vitamina B₂

Uticaoj struje redukcije na analitički signal vitamina B₂ u slučaju planarne disk elektrode je ispitan u model rastvorima vitamina B₂ sadržaja 5 mg/l i 20 mg/l. Za manju masenu koncentraciju vitamina B₂ ispitan je uticaoj redukcione struje u opsegu od 0,2 µA do 4,2 µA, dok je za rastvore veće koncentracije vitamina ovaj uticaoj ispitan u opsegu od 2,7 µA do 6,1 µA. Zavisnost analitičkog signala (τ) od struje redukcije (I) za manji sadržaj vitamina prikazana je na Slici 21a, a za veći na Slici 21b. Redukciono vreme vitamina B₂ eksponencijalno se smanjivalo sa povećanjem vrednosti redukcione struje, kako za manju ($\tau = 2,68e^{-1,54I} + 0,021$, $r = 0,9995$), tako i za veću koncentraciju vitamina B₂ ($\tau = 3,78e^{-0,74I} + 0,050$, $r = 0,9996$). U oba ispitivana slučaja (za 5 i 20 mg/l vitamina B₂), struje manje od ispitivanih intervala uzrokovale su veliko razvlačenje hronopotenciograma i smanjenje reproduktivnosti, a veće struje su dovodile do smanjenja osetljivosti određivanja. Odgovarajući interval struje redukcije za hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂ određen je primenom kriterijuma $I \cdot \tau^{1/2} = f(I)$ (optimalni intervali struje su predstavljeni zaravnjenim delovima prikazanih zavisnosti). Kriterijum $I \cdot \tau^{1/2} = f(I)$ za masenu koncentraciju od 5 mg/l dat je na Slici 22a, a za koncentraciju od 20 mg/l vitamina B₂ na Slici 22b. Optimalna vrednost redukcione struje za sadržaj vitamina od 5 mg/l kretala se u opsegu od 0,8 – 3,1 µA, koji se podudara sa zaravnjenim delom na Slici 22a. Zaravnjeni deo navedene zavisnosti za sadržaj od 20 mg/l se kretao od 3,8 µA do 4,2 µA, što predstavlja odgovarajući opseg struje redukcije za ovaj sadržaj vitamina. dodatno je odgovarajuća vrednost redukcione struje birana je u skladu sa potrebnom osetljivošću: manje vrednosti struje su primenjivane za manje sadržaje određivanog analita i obrnuto. Redukcioni potencijal vitamina B₂ nije značajno varirao sa promenom vrednosti struje i javljao se u opsegu potencijala od -0,12 V do -0,14 V (RSD = 1,84%, n = 5).



Slika 21. Uticaj redukcijske struje na analitički signal vitamina B₂ (± 2 SD, n = 5) za:

a) C_m = 5 mg/l i b) C_m = 20 mg/l. E_i = 0,023 V.



Slika 22. Kriterijum $I \cdot \tau^{1/2} = f(I)$ za: a) 5 mg/l, i b) 20 mg/l vitamina B₂.

4.2.2. Validacija metode

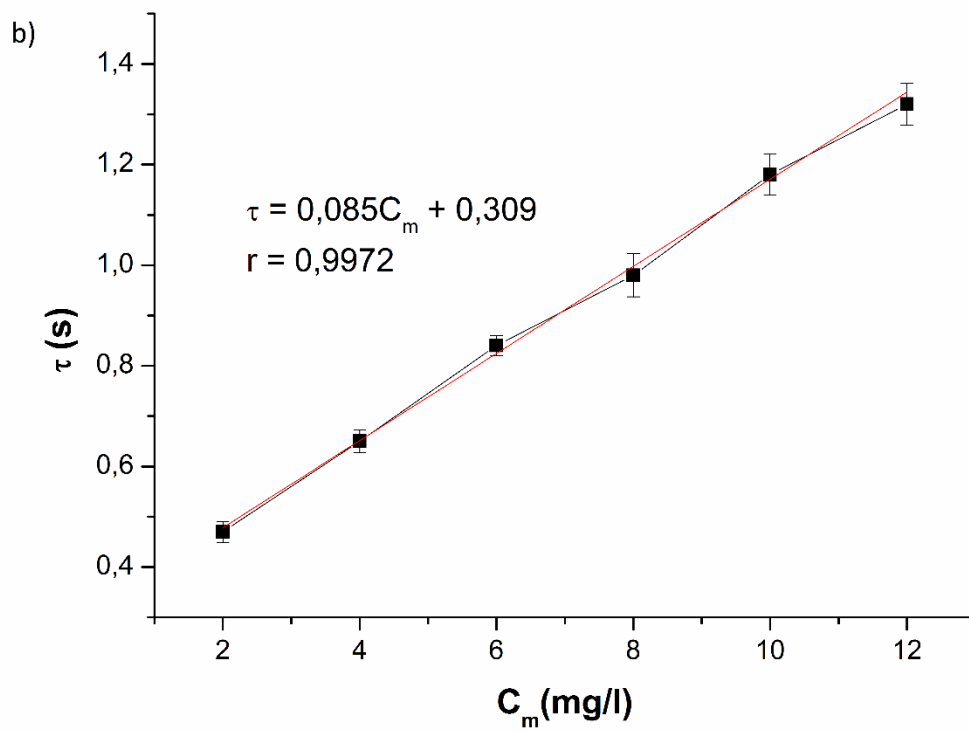
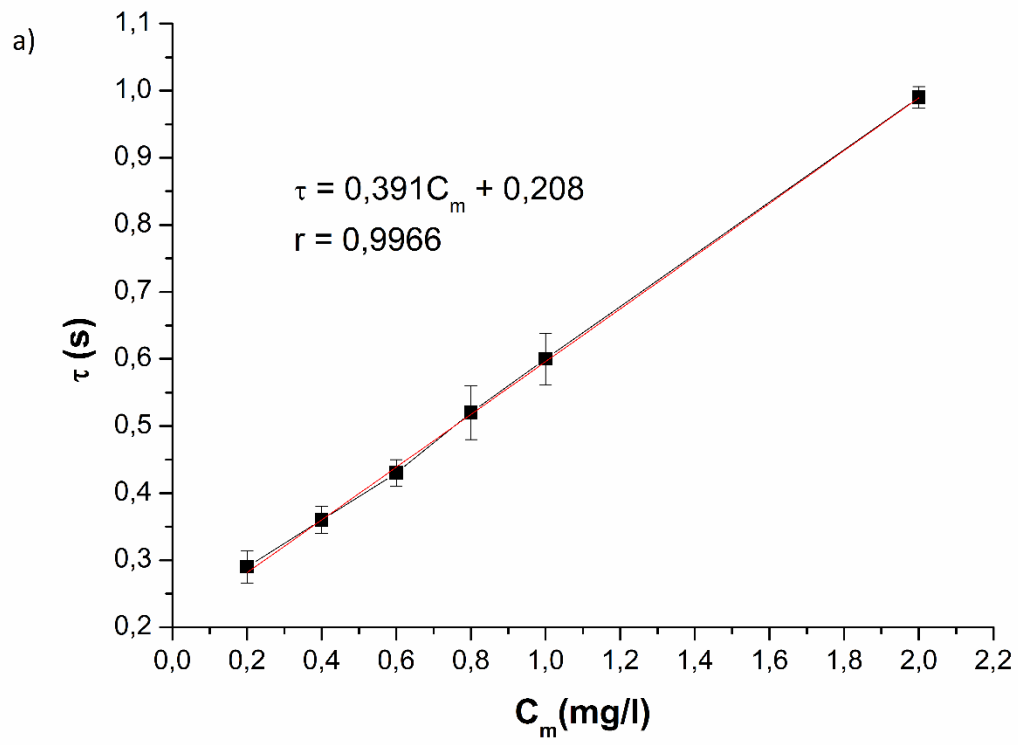
4.2.2.1. Linearnost

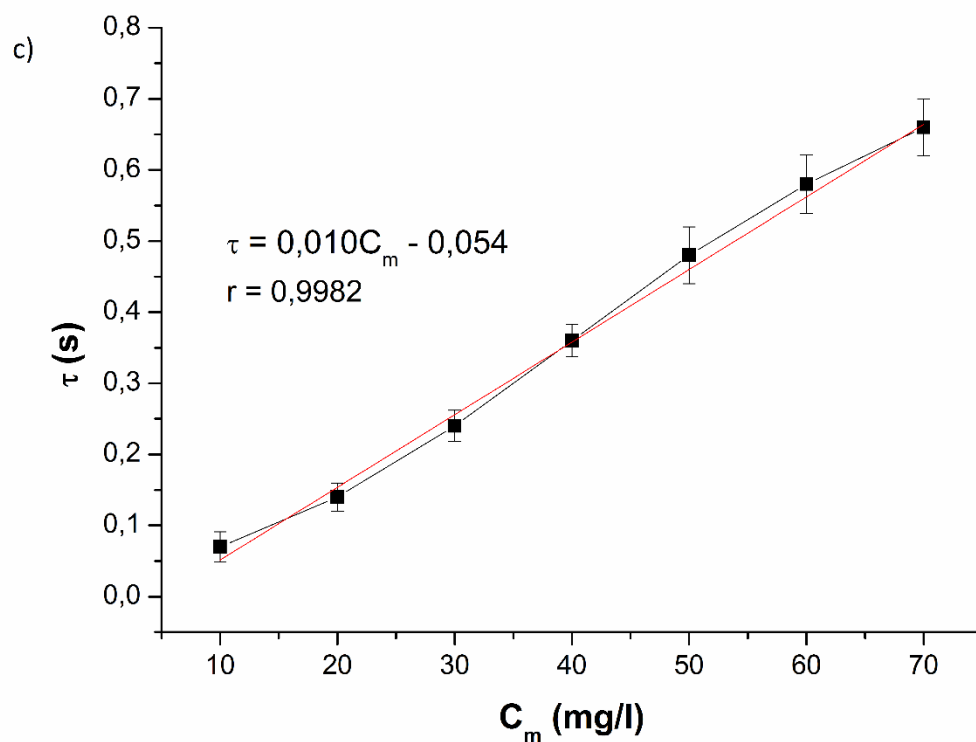
Linearnost metode je ispitana za tri opsega masene koncentracije vitamina B₂: 0,2 – 2 mg/l, 2 – 12 mg/l i 10 – 70 mg/l. Saopštene redukcione struje su iznosile 0,3 μA, 2,4 μA i 5,3 μA, redom. Eksperimenti su rađeni u pet ponavljanja za svaki koncentracioni opseg. Zavisnosti su prikazane na Slici 23, na kojoj su date i fitovane funkcije i analitički oblici funkcija, kao i koeficijenti korelacije. U hronopotencimetriji, zavisnost analitičkog signala i koncentracije analita nije linearna, tj. vrednost analitičkog signala (τ) raste sa kvadratom koncentracije, ali pri datim eksperimentalnim uslovima i za uže intervale koncentracija, ostvarena je linearna zavisnost. Za širi opseg koncentracija, u cilju izbegavanja rešavanja kvadratne jednačine, morala bi se raditi linearizacija kalibracione krive ($\sqrt{\tau} = a \cdot C + b$). U Tabeli 12 predstavljeni su parametri kalibracionih krivih, standardne devijacije nagiba (S_a) i odsečka (S_b), kao i koeficijenti korelacije definisanih zavisnosti. Pri definisanim eksperimentalnim uslovima uočena je veoma dobra linearna zavisnost merenog redukcionog vremena (τ) i masene koncentracije analita (C_m) za sva tri koncentraciona opsega, što se može videti na osnovu vrednosti koeficijenta korelacije ($r \geq 0,9966$).

Tabela 12. Parametri kalibracionih krivih pri određivanju vitamina B₂.

<i>Sadržaj (mg/l)</i>	<i>Zavisnost</i>	<i>S_a (s · l/mg)</i>	<i>S_b (s)</i>	<i>r</i>
0,2 – 2	$\tau = 0,391 \cdot C_m + 0,208$	0,016	0,009	0,9966
2 – 12	$\tau = 0,085 \cdot C_m + 0,309$	0,005	0,014	0,9972
10 – 70	$\tau = 0,010 \cdot C_m - 0,054$	0,0002	0,006	0,9982

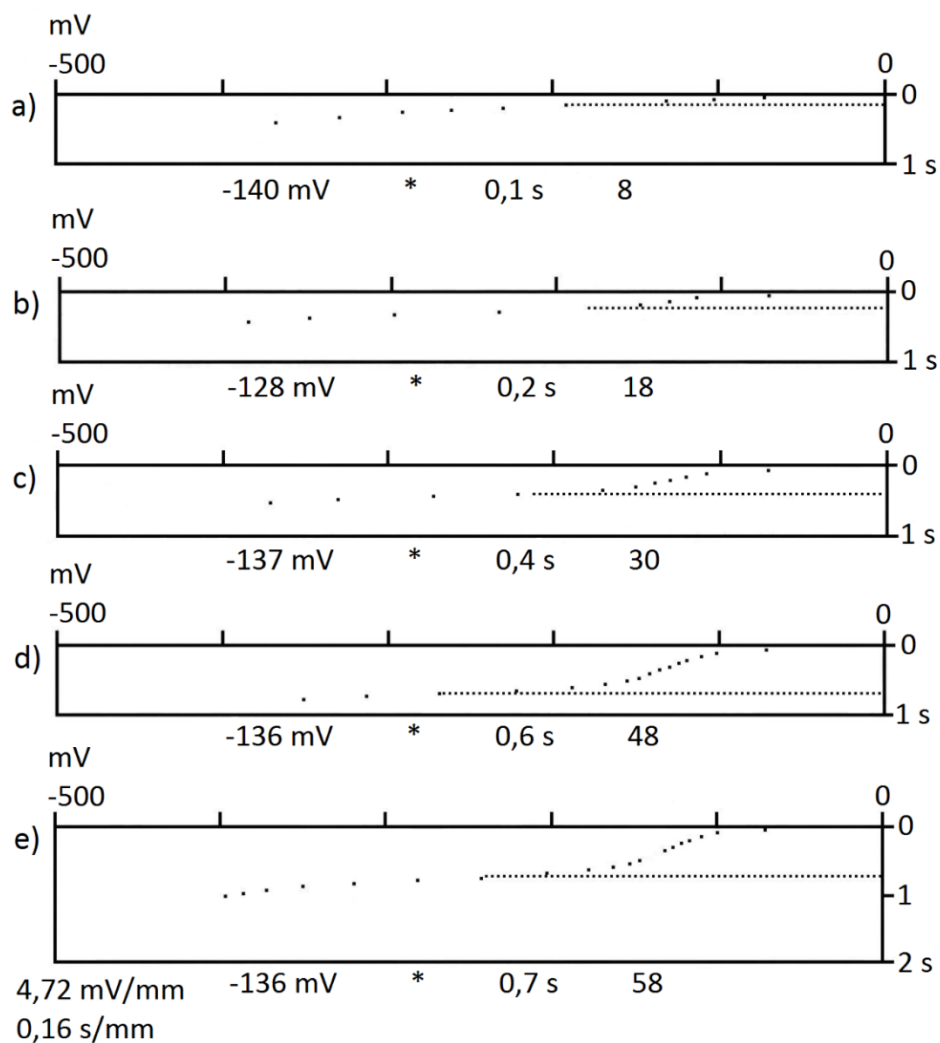
τ – vreme redukcije (s); C_m – sadržaj vitamina B₂ (mg/l); S_a – standardna devijacija nagiba ($n = 5$); S_b – standardna devijacija odsečka ($n = 5$), r – koeficijent korelacije kalibracione krive.





Slika 23. Linearnost: zavisnost redukcionog vremena od sadržaja vitamina B₂ za koncentracioni opseg od: a) 0,2 - 2 mg/l ($I = 0,3 \mu\text{A}$); b) 2 - 12 mg/l ($I = 2,4 \mu\text{A}$) i c) 10 - 70 mg/l ($I = 5,3 \mu\text{A}$). $E_i = 0,023 \text{ V}$.

Na Slici 24 prikazani su hronopotenciogrami za opseg od 10 - 70 mg/l vitamina B₂ u 0,025 mol/l HCl.



Slika 24. Hronopotenciogrami dobijeni analizom rastvora vitamina B₂: a) 10, b) 30, c) 40, d) 60 i e) 70 mg/l u 0,025 mol/l HCl. $E_i = 0,023$ V, $I = -5,3$ μ A.

Na Slici 24 može se uočiti veoma dobra ponovljivost potencijala rastvaranja vitamina B₂ (RSD = 3,29%), čime je potvrđeno da su odabrani odgovarajući eksperimentalni uslovi.

4.2.2.2. Granica detekcije i granica kvantitativnog određivanja

LOD i LOQ vrednosti su računane primenjujući ranije navedene kriterijume (Izrazi I i II), redom, koristeći standardnu devijaciju odsečka i nagib kalibracione krive definisane za oblast granice detekcije (0,2 – 2 mg/l). Izračunate vrednosti granice detekcije i granice

kvantitativnog određivanja su iznosile 0,076 mg/l i 0,23 mg/l vitamina B₂, redom, i, iako znatno veće od LOD vrednosti ranije objavljenih metoda (Tabela 13), bile su dovoljne za jednostavno, brzo i tačno hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂ u multivitaminskim dodacima ishrani.

Tabela 13. Poređenje razvijene metode sa ranije objavljenim elektroanalitičkim metodama za određivanje vitamina B₂.

Tehnika	Radna elektroda	Pomoćni elektrolit	Linearni opseg (mg/l)	LOD (mg/l)	Literatura
DPV	N-CQD/SnO ₂	Fosfatni pufer pH 7, 0,1 mol/l	18,82 · 10 ⁻³ – 115,16	3,01 · 10 ⁻³	Muthusankar i sar., 2019
SWAdSV	BISPE	Acetatni pufer pH 4,5	0,38 · 10 ⁻³ – 37,63 · 10 ⁻³	0,26 · 10 ⁻³	Sá i sar., 2015
CV	Co ²⁺ -Y zeolit-modifikovana CPE	0,1 mol/l KNO ₃ , pH 5,0	0,65 – 12,80	0,27	Nezamzadeh-Ejhien i Pouladsaz, 2014
SWASV	DNA-CNT	0,1 mol/l H ₃ PO ₄	1 · 10 ⁻⁶ – 10 · 10 ⁻⁶	0,2 · 10 ⁻⁶	Ly i sar., 2011
SWASV	Ciklam-modifikovana CPE	BR pufer pH 1,5	0,5 · 10 ⁻³ – 70	0,2 · 10 ⁻²	Kotkar i sar., 2007
HA	GCE	0,025 mol/l HCl	0,2 - 70	0,076	Ovaj rad

Skraćenice: DPV – diferencijalno pulsna voltametrijia; N-CQD/SnO₂ – 'Nitrogen doped Carbon Quantum Dots/SnO₂' nanokompozitna elektroda; SWAdSV – adsorpciona striping voltametrijia sa pravougaonim impulsima; BISPE – grafitna štampana elektroda modifikovana bizmutom (Bismut graphite Screen-Printed Electrode); CV – ciklična voltametrijia; CPE – elektroda od ugljenične paste (Carbon Paste Electrode); SWASV – anodna striping voltametrijia sa pravougaonim impulsima (Square-Wave Anodic Stripping Voltammety); DNA-CNT – elektroda od ugljenične paste modifikovana nanocevičicama i imobilisana sa DNK (DNA-immobilised Carbon Nanotube mixed paste elektrode); HA – hronopotenciometrijska analiza; GCE – elektroda od staklastog ugljenika (Glassy Carbon Electrode).

4.2.2.3. Preciznost

Preciznost je ispitana na osnovu ponovljivosti i reproduktivnosti za sadržaje vitamina B₂ od 5 mg/l i 20 mg/l, pri čemu su primenjene redukcione struje od 0,9 µA i 2,7 µA, redom. Ponovljivost, izražena kao RSD, iznosila je 2,05% i 1,76%, za masenu koncentraciju 5mg/l i 20 mg/l, redom. Reprodktivnost metode, izražena kao RSD vrednost bila je 3,84% za sadržaj vitamina B₂ od 5 mg/l, i 3,16% za sadržaj vitamina od 20 mg/l. Dobijene vrednosti RSD ukazivale su na veoma dobru preciznost metode za određivanje vitamina B₂.

4.2.2.4. Ispitivanje interferencija

Selektivnost razvijene metode je ispitana dodatkom 1, 2, 5, 10 i 100 mg/l interferirajuće supstance (vitamin B₁, B₆, B₁₂, nikotinamid, folna kiselina) u model rastvora vitamina B₂, sadržaja 1 i 5 mg/l, analizama pri definisanim eksperimentalnim uslovima. Uticaj saharoze, laktoze i glukoze je takođe ispitan, ali u znatno većim koncentracijama: 5, 10, 25 i 50 g/l. Rezultati ispitivanja interferencija su prikazani u Tabeli 14. Vrednosti u tabeli predstavljaju procenat promene analitičkog signala vitamina B₂ u prisustvu interferirajuće supstance, u odnosu na analitički signal bez dodatka te supstance. S obzirom na određenu preciznost metode (RSD ≤ 3,84%), supstanca se smatra interferirajućom ukoliko izaziva promenu analitičkog signala veću od 5%. Rezultati u Tabeli 14 ukazuju na činjenicu da čak ni 100 puta više koncentracije dodatih vitamina nemaju uticaja na analitički signal vitamina B₂. Pri datim eksperimentalnim uslovima, analitički signali interferirajućih vitamina se nisu javljali, niti je signal vitamina B₂ gubio na oštini. Iz Tabele 14 se može uočiti da su prihvatljive promene signala, nastale usled prisustva interferirajućih vitamina, bile pozitivne tj. dolazilo je do blagog uvećanja analitičkog signala vitamina.

U prisustvu svih ispitivanih šećera u koncentraciji od 5 g/l i 10 g/l, analitički signal vitamina se nije značajnije menjao. Sadržaj glukoze, saharoze i laktoze od 25 g/l dovodio je do potpunog gubitka analitičkog signala u rastvorima 1 mg/l vitamina B₂. U rastvorima 5 mg/l vitamina B₂ prisustvo saharoze, laktoze i glukoze ni u jednoj ispitivanoj masenoj koncentraciji nije dovodilo do značajne promene analitičkog signala. Može se zaključiti da šećeri, sadržaja većeg od 25 g/l, utiču na osetljivost metode. Uprkos ovoj činjenici, razvijena metoda je obezbeđivala dovoljnu selektivnost za određivanje vitamina B₂ u multivitaminским dodacima ishrani.

Tabela 14. Uticaj potencijalnih interferirajućih supstanci na analitički signal vitamina B₂

Interferirajuća supstanca	Sadržaj interferirajuće supstance (mg/l)	Promena signala (%)	
		C _m (B ₂) = 1 mg/l	C _m (B ₂) = 5 mg/l
B ₁ , B ₆ , B ₁₂ , C, nikotinamid, folna kiselina	1	0,3 ^a	0,6
	2	1,2	1,6
	5	1,3	1,9
	10	1,4	1,7
	100	2,8	2,2
Sadržaj interferirajuće supstance (g/l)			
Saharoza, glukoza, laktoza	5	-1,6	1,4
	10	-2,7	1,2
	20	-4,6	-1,8
	25	n.d.	-1,6
	50	n.d.	-2,8

^aVrednosti predstavljene u tabeli su maksimalne promene signala za dati koncentracioni opseg ispitivane interferencije; n.d. – nije detektovan;

$$\text{Promena signala (\%)} = \frac{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)} - \text{vrednost signala sa dodatim interferentom (s)}}{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)}} \cdot 100$$

4.2.2.5. Primena i tačnost

Sadržaji vitamina B₂, koji su dobijeni primenom razvijene hronopotenciometrijske metode u realnim uzorcima (multivitaminskim dodacima ishrani), upoređeni su sa vrednostima deklarisanim od strane proizvođača, dok je tačnost metode proverena paralelnim analizama istih uzoraka primenom HPLC, kao i testom 'povrata' (*recovery test*).

4.2.2.6. Određivanje vitamina B₂ u multivitaminским dodacima ishrani

U cilju ispitivanja primenljivosti razvijene analitičke metode, multivitaminски preparati su analizirani pod optimalnim eksperimentalnim uslovima, datim u Tabeli 15. Uzorci su pripremljeni kao što je navedeno u odeljku 3.6. *Uzorci i priprema uzoraka za analizu.*

Tabela 15. Optimalni eksperimentalni uslovi za određivanje vitamina B₂ hronopotenciometrijskom analizom

Parametar	Vrednost
Pomoćni elektrolit	HCl, C = 0,025 mol/l
Inicijalni potencijal	0,023 V
Struja redukcije, opseg	0,8 – 4,2 μ A

Primenjena je metoda višestrukog dodatka standarda (dva sukcesivna dodatka standarda).

Zbog značajno velikih odsečaka kalibracionih krivih za opsege sadržaja od 0,2 – 2 mg/l i od 2 – 10 mg/l, metoda dodatka standarda se morala primeniti u opsegu od 10 – 70 mg/l. Kako bi se uticaj interferencija matriksa smanjio u najvećoj mogućoj meri, analizirani rastvori su razblaživani do masene koncentracije vitamina B₂ od 15 mg/l.

Srednje vrednosti za pet ponavljanja dobijene hronopotenciometrijskom i HPLC analizom, prikazane su u Tabeli 16. Određeni sadržaji vitamina B₂ u multivitaminским preparatima su se dobro slagali sa sadržajima deklarisanim od strane proizvođača kao i sa rezultatima HPLC analize. Primenjeni *t*-test uparenih vrednosti je potvrdio da nema statistički značajnih razlika između rezultata dobijenih razvijenom hronopotenciometrijskom metodom i rezultata HPLC analize ($|t| = 0,38 < t_{\text{kritično}} = 2,36$), kao ni između deklarisanih vrednosti i onih dobijenih razvijenom metodom ($|t| = 1,15 < t_{\text{kritično}} = 2,36$) uz 95% verovatnoću. Pored velike tačnosti metode i ponovljivost rezultata je bila dobra (RSD = 4,08%, n = 5).

Tabela 16. Sadržaj vitamina B₂ u multivitaminским dodacima ishrani određen primenom razvijene HA metode i komparativne HPLC metode.

Uzorak	Sadržaj vitamina B ₂ ^a (mg/tableti)		
	Razvijena HA metoda	HPLC ^b	Deklarisani sadržaj
MVT1	5,02 ± 0,24	4,98 ± 0,16	5,00
MVT2	3,48 ± 0,06	3,46 ± 0,30	3,40
BKT1	3,45 ± 0,04	3,42 ± 0,08	3,40
BKT2	4,95 ± 0,36	5,08 ± 0,52	5,00
BKT3	1,57 ± 0,12	1,62 ± 0,10	1,60
	Sadržaj vitamina B ₂ ^a (mg/100 g)		
MVG1	3,68 ± 0,30	3,74 ± 0,36	3,70
MVG2	5,11 ± 0,28	5,09 ± 0,44	5,00
MVG3	3,72 ± 0,18	3,66 ± 0,48	3,70

^aSrednja vrednost ± 2SD, n = 5; ^breferentna metoda;

MVT – multivitaminske tablete, BKT – tablete kompleksa vitamina B, MVG – multivitaminske granule.

Kvantitativno određivanje vitamina B₂ u navedenim uzorcima je urađeno i metodom kalibracione krive ali su rezultati odstupali od sadržaja određenih metodom dodatka standarda i rezultata HPLC analize, najverovatnije usled uticaja matriksa uzoraka, tačnije, punilaca, boja i stabilizatora prisutnih u uzorcima, čiji uticaj na analitički signal nije ispitan u okviru ispitivanja interferencija. Sastav standardnih rastvora vitamina B₂ i rastvora uzoraka za analizu nije bio isti. Naime, standardni rastvori su pripremani rastvaranjem odgovarajuće mase vitamina B₂ u pomoćnom elektrolitu, dok su u rastvorima uzoraka, nakon pripreme za analizu, bile prisutne i boje, punioci i stabilizatori.

Tačnost metode, pre svega ispravnost pripreme uzoraka za analizu, je dodatno proverena testom povrata (*recovery testom*), trostrukim 'spajkovanjem' multivitaminskih preparata MVT 1, BCT 1 i MVG 1. Rezultati su dati u Tabeli 17. Vrednosti *recovery* testa su se kretale od 94 do 103,5%, ukazujući tako na ispravnost postupka pripreme uzoraka, odnosno, da nije bilo značajnog uticaja matriksa uzoraka na određivanje vitamina B₂, pri definisanim eksperimentalnim uslovima rada.

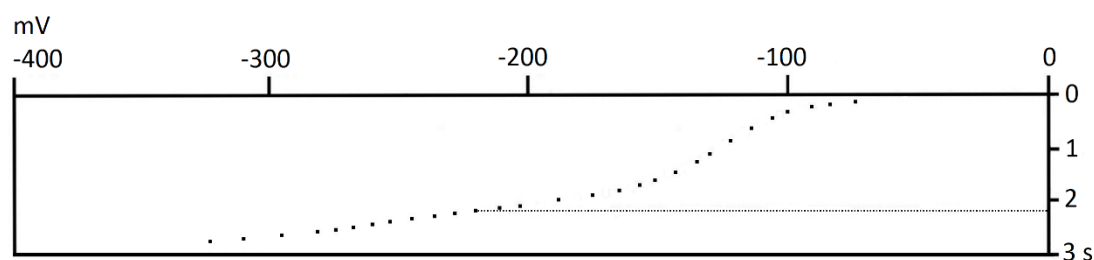
Tabela 17. Rezultati *recovery* testa vitamina B₂ u uzorcima multivitaminških dodataka ishrani.

Uzorak	Sadržaj pre dodatka standarda (mg/tableti)	Dodati sadržaj standarda (mg/tableti)	Očekivani sadržaj (mg/tableti)	Sadržaj nakon dodatka standarda ^a (mg/tablet)	Recovery (%)
MVT1	5,02	0,5	5,52	5,51 ± 0,16	98,0
		2,0	7,02	7,08 ± 0,32	103,0
		5,0	10,02	10,15 ± 0,52	102,6
BKT1	3,45	0,5	3,95	3,92 ± 0,18	94,0
		2,0	5,45	5,52 ± 0,36	103,5
		5,0	8,45	8,36 ± 0,24	98,2
MVG1	3,68	0,5	4,18	4,16 ± 0,28	96,0
		2,0	5,68	5,64 ± 0,52	98,0
		5,0	8,68	8,82 ± 0,44	102,8

^asrednja vrednost ± 2SD, n = 5;

$$\text{Srednja vrednost recovery testa (\%)} = \frac{\text{sadržaj nakon dodatka standarda} - \text{sadržaj pre dodatka standarda}}{\text{dodati sadržaj}} \cdot 100$$

Originalni hronopotenciogram vitamina B₂ dobijen analizom uzorka BKT1 predstavljen je na Slici 25.



2,36 mV/mm
0,16 s/mm

Bez grešaka
-133 mV * 2,2 s 182

Slika 25. Hronopotenciogram vitamina B₂ u uzorku BKT1. E_i = 0,023 V; I = 2,6 μA.

4.2.3. Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂ primenom elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika

U cilju povećanja osetljivosti već razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje vitamina B₂, korišćena je elektroda u vidu procesne posude od staklastog ugljenika. Zbog velike aktivne površine koju ima ova makroelektroda, a koja zavisi od zapremine analiziranog rastvora, postoji mogućnost povećanja apsolutne i relativne osetljivosti. Posmatrajući ranije navedenu *Sand*-ovu jednačinu: $\tau^{1/2} = \frac{\pi^{1/2} n F D_{ox}^{1/2} C_{ox}^0 A}{2i}$ (Jednačina 4), može se uočiti direktan uticaj površine radne elektrode na analitički signal u hronopotenciometrijskoj analizi.

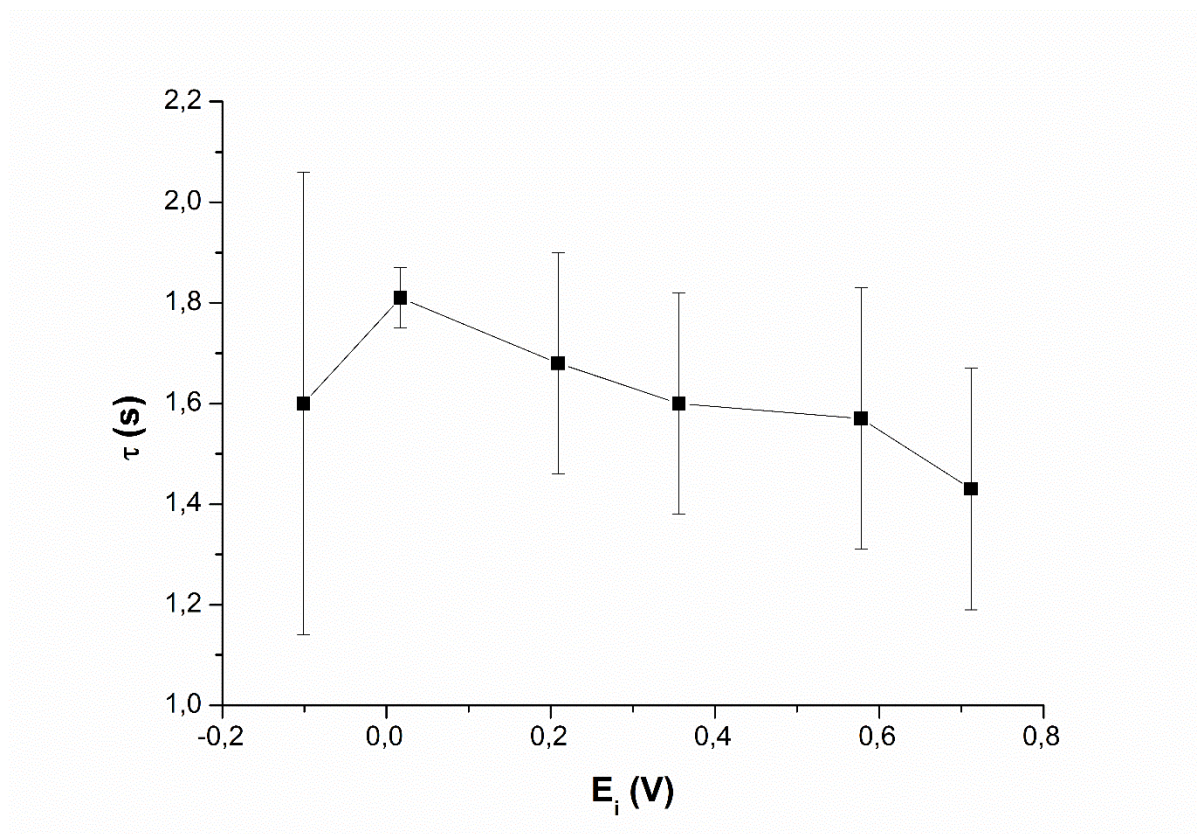
4.2.3.1. Ispitivanje uticaja vrste i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₂ primenom radne elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika

Postupak optimizacije, u smislu vrste i koncentracije pomoćnog elektrolita, izveden je u okviru optimizacije uslova hronopotenciometrijskog određivanja vitamina B₂ uz primenu planarne disk elektrode od staklastog ugljenika, te je rastvor HCl koncentracije 0,025 mol/l usvojen kao odgovarajući pomoćni elektrolit i za radnu elektrodu u vidu procesne posude. Analitički signal vitamina B₂ se javljao na potencijalu od oko -0,12 V, kao i u slučaju primene planarne disk elektrode.

4.2.3.2. Ispitivanje uticaja inicijalnog potencijala na analitički signal vitamina B₂ primenom radne elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika

Uticaj inicijalnog potencijala (E_i) na hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂ primenom procesne posude od staklastog ugljenika ispitan je u opsegu potencijala od 0,7 V

do $-0,1$ V u model rastvoru vitamina sadržaja 1 mg/l (Slika 26). Primenjena je redukciona struja od $48,2$ μ A, dok je završni potencijal iznosio $-0,21$ V. Zapremina ispitivanog rastvora je bila 5 ml, odnosno, površina radne elektrode je iznosila $13,36$ cm^2 . Uzimajući u obzir veličinu i reproduktivnost analitičkog signala (RSD = $1,73\%$, $n = 5$) inicijalni potencijal veoma blizak nuli ($0,017$ V) je usvojen kao optimalan, kao i u slučaju primene planarne disk elektrode.



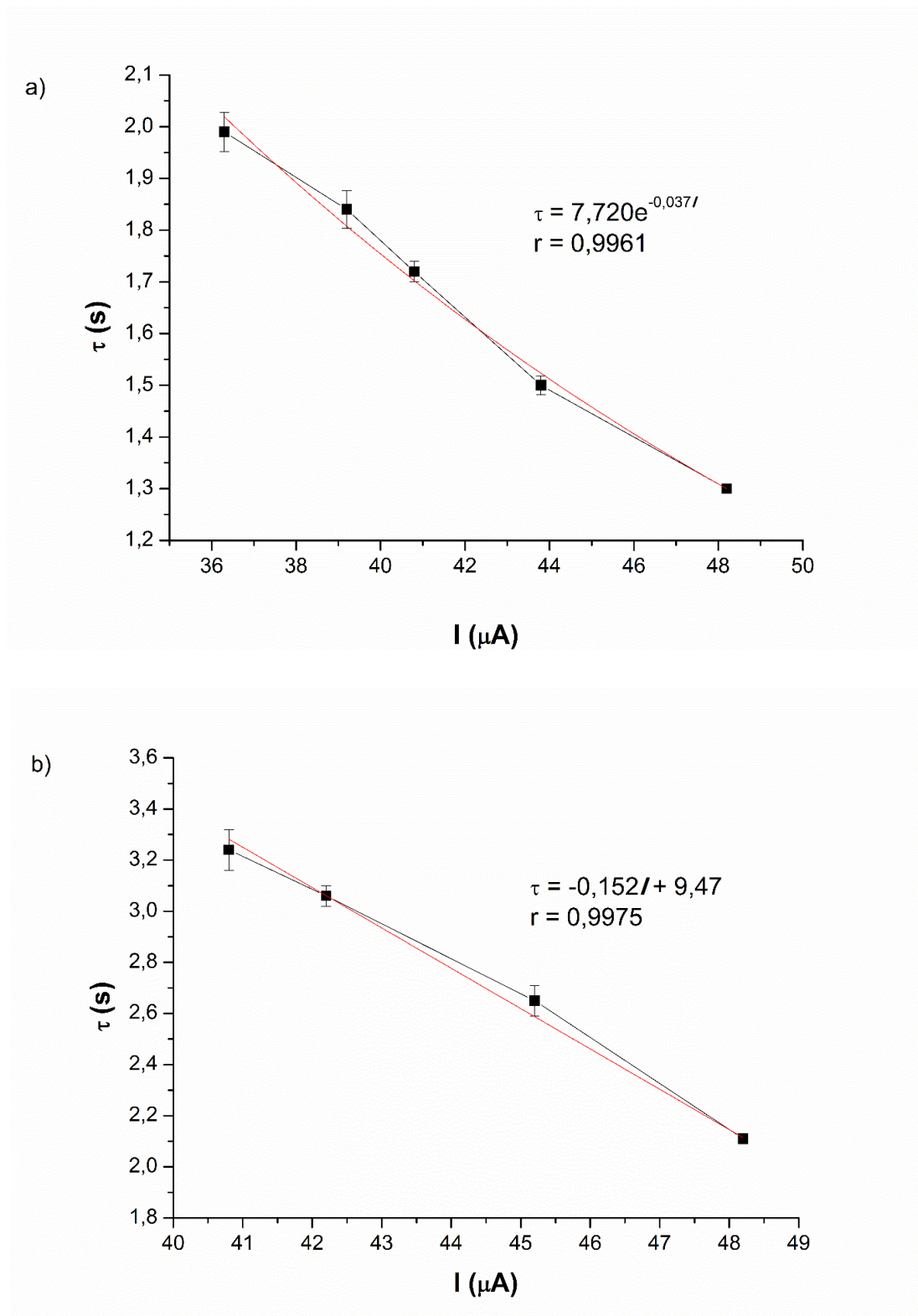
Slika 26. Uticaj inicijalnog potencijala na analitički signal vitamina B_2 pri primeni procesne posude od staklastog ugljenika kao radne elektrode. $C_m = 1$ mg/l; $I = 48,2$ μ A.

4.2.3.3. Ispitivanje uticaja redukcione struje na analitički signal vitamina B_2 primenom radne elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika

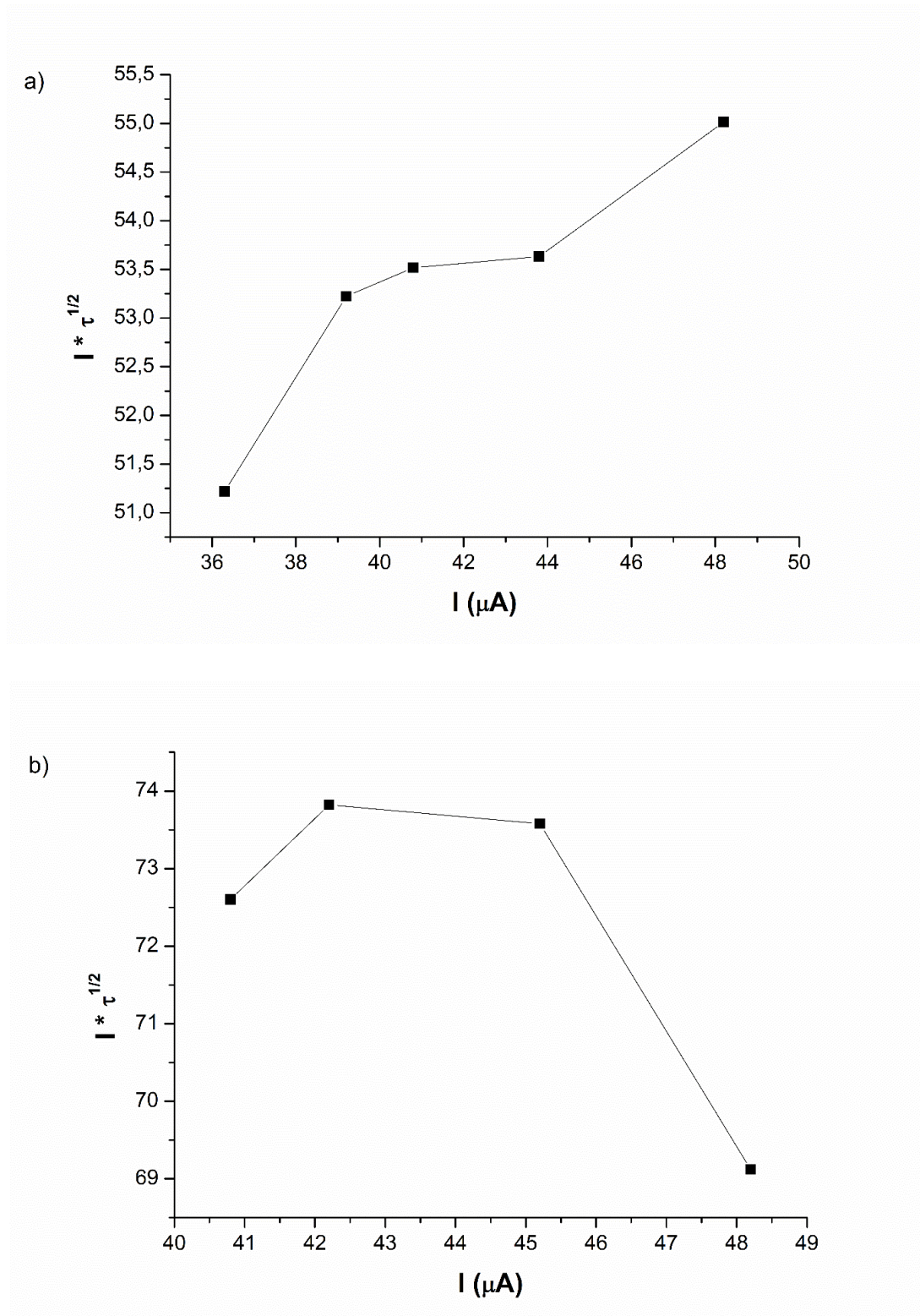
Uticaj redukcione struje ispitan je u opsegu od $36,3$ μ A do $48,2$ μ A za sadržaj vitamina B_2 od $0,5$ mg/l i u opsegu od $40,8$ μ A do $48,2$ μ A za sadržaj vitamina od 2 mg/l. Vreme redukcije analita (τ) se smanjivalo po eksponencijalnoj zavisnosti sa povećanjem redukcione struje (I),

za manji sadržaj vitamina ($\tau = 7,72 \cdot e^{-0,037I}$, $r = 0,9961$, $n = 5$), dok je za veći sadržaj ova zavisnost bila linearnog karaktera ($\tau = -0,152 \cdot I + 9,47$, $r = 0,9975$, $n = 5$) (Slika 27 a) i b)). Kriterijum $I \cdot \tau^{1/2} = f(I)$ za sadržaje vitamina B₂ od 0,5 mg/l i 2 mg/l prikazani su na Slici 28 a i b, redom. Odgovarajuća vrednost struje redukcije za sadržaj vitamina B₂ od 0,5 mg/l nalazila se u intervalu od 39,2 – 44 µA. Odgovarajuća vrednost za sadržaj vitamina B₂ od 2 mg/l nalazila se u intervalu od 42,2 – 45,2 µA. Svakako, u zavisnosti od potrebne osetljivosti određivanja, odgovarajuća vrednost redukcione struje je birana iz usvojenih intervala: naravno, manje vrednosti redukcione struje su primenljivane za određivanje manjeg sadržaja analita, i obrnuto.

Utvrđeno je da struja redukcije, u ispitivanom opsegu, nije imala značajan uticaj na potencijal redukcije vitamina B₂, koji se kretao u opsegu od -0,12 V do -0,14 V (RSD = 2,09%, $n = 5$).



Slika 27. Uticaj redukcione struje na analitički signal vitamina B₂ pri primeni procesne posude od staklastog ugljenika kao radne elektrode. Koncentracija vitamina B₂: a) 0,5 mg/l; b) 2 mg/l.



Slika 28. Odabir odgovarajuće redukcione struje (kriterijum: $I \times \tau^{1/2} = f(I)$) za: a) 0,5 mg/l i
b) 2 mg/l vitamina B₂

4.2.3.4. Ispitivanje uticaja aktivne površine radne elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika na analitički signal vitamina B₂

Uticaj površine radne elektrode na vreme redukcije vitamina B₂ ispitan je promenom zapremine analiziranog rastvora. Ispitane su zapremine rastvora od 3 ml do 8 ml, što je odgovaralo aktivnim površinama radne elektrode od oko 9,2 cm² do 16,6 cm². Sadržaj vitamina B₂ u ispitivanim rastvorima je iznosio 0,5 mg/l, a primenjena je redukciona struja od 48,2 µA. Ova vrednost predstavlja maksimalnu vrednost redukcione struje koja se primenjenom analizatoru mogla saopštiti (nakon automatske kalibracije vrednosti struje i napona). Za aktivnu površinu makroelektrode od 9,2 cm² do 13,4 cm² (3 – 5 ml analiziranog rastvora), analitički signal se povećavao sa povećanjem aktivne površine radne elektrode. U slučaju primene aktivne površine radne elektrode od oko 15,5 cm², što odgovara zapremini od 6 ml analiziranog rastvora, analitički signal je i dalje rastao, ali je došlo do znatnog pada ponovljivosti (RSD = 18,48%). Razlog tome je verovatno neodgovarajući odnos aktivne površine radne i pomoćne elektrode, tj. nedovoljno velika površina pomoćne elektrode. Pored toga, za aktivne površine radne elektrode od 15,5 cm² i veće, dolazilo je do smanjenja gustine primenjene struje, što je rezultiralo razvlačenjem hronopotenciograma i smanjenjem reproduktivnosti metode. Pri analizi 8 ml rastvora vitamina (aktivna površina od 19,6 cm²), hronopotenciogram je bio toliko razvučen da se vreme redukcije nije moglo izmeriti zbog nedovoljno izražene prevojne tačke. Površina radne elektrode od oko 13,4 cm² (zapremina rastvora 5 ml) usvojena je kao odgovarajuća za većinu analiza (RSD = 3,12%, n = 5). Uticaj aktivne površine makroelektrode (A) na analitički signal vitamina B₂ (τ) prikazan je u Tabeli 18. Važno je napomenuti da površina radne elektrode, kao i vrednosti primenjene struje moraju biti usklađene sa određivanim sadržajem analita.

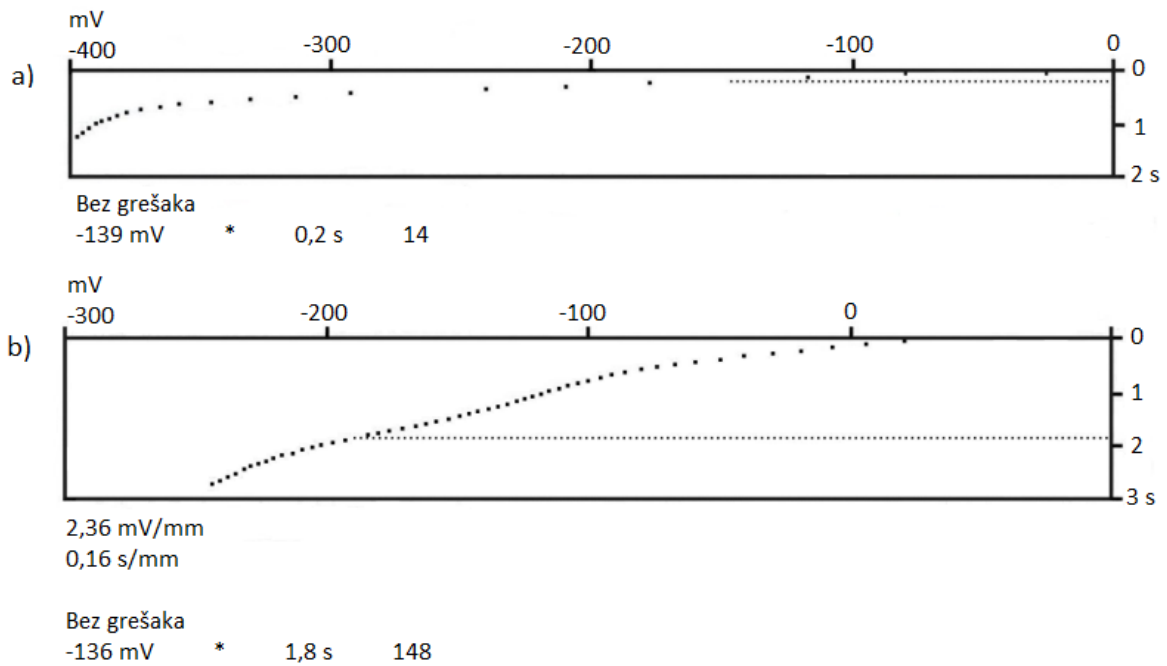
Tabela 18. Uticaj aktivne površine makroelektrode na analitički signal vitamina B₂.

$$C_m = 0,5 \text{ mg/l}; E_i = 0,017 \text{ V}; I = 48,2 \text{ } \mu\text{A}.$$

$V(\text{cm}^3)$	$A(\text{cm}^2)$	$\tau(\text{s})$	RSD (%)
3	9,2	0,44	4,99
5	13,4	0,89	3,12
6	15,5	1,03	18,48
8	19,6	n.d.	-

V – Odgovarajuća zapremina rastvora; A – aktivna površina radne elektrode; τ – srednje vrednosti vremena redukcije (n = 5); n.d. – nije detektovan.

Na Slici 29a prikazan je hronopotenciogram dobijen pri analizi rastvora vitamina B₂ sadržaja 0,5 mg/l, uz primenu planarne disk elektrode, dok je na Slici 29b predstavljen hronopotenciogram za isti sadržaj vitamina, dobijen uz primenu radne elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika. Primenom procesne posude kao radne elektrode, ostvareno je značajno povećanje relativne osetljivosti od oko 10 puta, u odnosu na planarnu disk elektrodu, što se na slici može i videti (vremena redukcije 4 i 148 internih jedinica analizatora). Pored toga, povećanje relativne osetljivosti omogućuje veće razblaživanje uzoraka, odnosno smanjenje potrebne mase uzorka, čime se značajno smanjuju interferencije od strane matriksa uzorka i pojednostavljuje i ubrzava njegova priprema za analizu.



Slika 29. Hronopotenciogram dobijen pri analizi rastvora vitamina B₂ sadržaja 0,5 mg/l uz primenu: a) planarne disk elektrode, $E_i = 0,023$ V; $I = 0,2$ μ A; $V = 20$ ml, i b) procesne posude od staklastog ugljenika, $E_i = 0,017$ V; $I = 48,2$ μ A; $V = 5$ ml.

4.2.4. Validacija metode

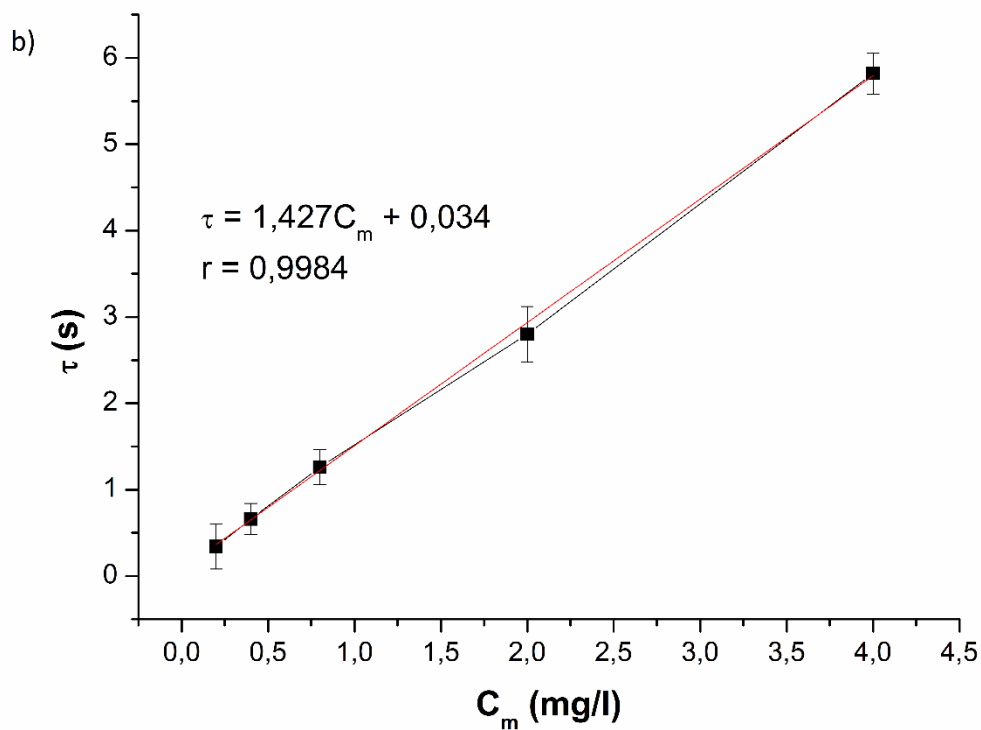
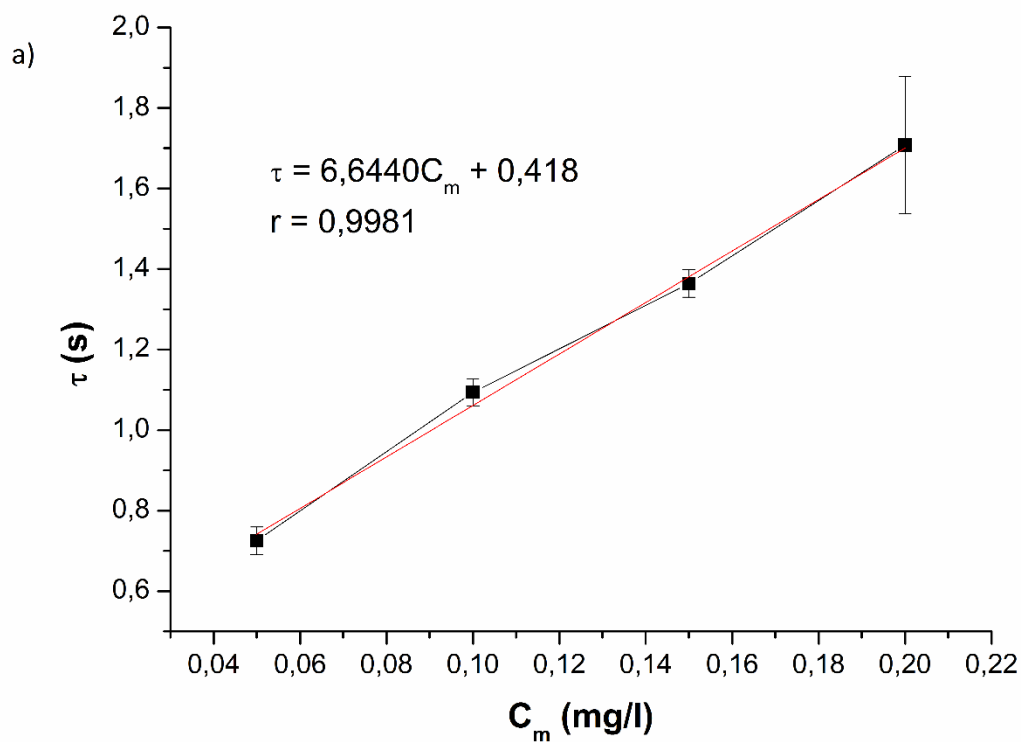
4.2.4.1. Linearnost

Ispitivanje linearnosti metode izvedeno je u dva opsega masene koncentracije: 0,05 – 0,2 mg/l i 0,2 – 4 mg/l, pri utvrđenim, optimalnim uslovima određivanja. Za niži koncentracioni opseg primenjena je redukciona struja od 40 μ A, a za viši struja od 45 μ A. Oba eksperimenta su urađena u 5 ponavljanja. Zavisnosti redukcionog vremena (τ) od sadržaja vitamina B₂ (C_m) prikazane su u Tabeli 19, zajedno sa standardnom devijacijom nagiba (S_a) i odsečka (S_b), i koficijentom korelacije (r). Visoke vrednosti koeficijenata korelacije ukazuju na veoma dobru linearnost analitičkog signala u oba koncentraciona opsega. Kalibracione krive za oba opsega masene koncentracije date su na Slici 30.

Tabela 19. Parametri kalibracionih krivih pri određivanju vitamina B₂ hronopotenciometrijskom analizom uz primenu procesne posude od staklastog ugljenika kao radne elektrode. $E_i = 0,017$ V.

Opseg masene koncentracije (mg/dm ³)	Zavisnost	S_a (s · l/mg)	S_b (s)	r
0,05 – 0,20	$\tau = 6,440 \cdot C_m + 0,418$	0,487	0,035	0,9981
0,20 – 4,00	$\tau = 1,427 \cdot C_m + 0,034$	0,033	0,004	0,9984

τ – vreme redukcije (s); C_m – masena koncentracija (mg/l); S_a – standardna devijacija nagiba ($n = 5$); S_b – standardna devijacija odsečka ($n = 5$); r – koeficijent korelacije.



Slika 30. Linearnost: kalibraciona kriva za opseg masene koncentracije od: a) 0,05 – 0,2 mg/l,

$I = 40 \mu\text{A}$ i b) 0,2 – 4,0 mg/l vitamina B_2 , $I = 45 \mu\text{A}$. $E_i = 0,017 \text{ V}$.

4.2.4.2. Granica detekcije i granica kvantitativnog određivanja

Vrednosti LOD i LOQ su računane prema ranije navedenim kriterijumima (Izrazi I i II), na osnovu vrednosti nagiba i standardne devijacije odsečka za kalibracionu krivu definisanu za oblast granice detekcije (0,05 – 2 mg/l) pri struji od 40 μ A. Izračunate vrednosti LOD i LOQ su iznosile 0,018 mg/l i 0,054 mg/l vitamina B₂, redom. U poređenju sa vrednosti LOD ostvarene primenom planarne disk elektrode, postignuta je 4 puta niža granica detekcije primenom elektrode u vidu procesne posude. Bitno je naglasiti da se vrednost LOD uz upotrebu procesne posude kao radne elektrode može dodatno, značajno sniziti primenom većih vrednosti redukcione struje, tj. većih vrednosti gustina struje, što bi razvlačenje hronopotenciograma svelo na minimum i omogućilo određivanje njegovih prevojnih tačaka, odnosno, merenje vremena redukcije. Međutim, uređaj koji je korišćen u svim istraživanjima nema mogućnost saopštavanja većih vrednosti struja od 50 μ A. Naime, analitički signal vitamina B₂ je pri analizi rastvora sadržaja manjih od 0,018 mg/l bio jasno vidljiv, ali zbog nedovoljno izražene prevojne tačke redukcionog talasa, analizator nije mogao izmeriti vreme redukcije.

Granica detekcije bi se takođe mogla sniziti automatskim oduzimanjem bazne linije (signal pomoćnog elektrolita) od analitičkog signala vitamina B₂, ali analizator koji nam je bio na raspolaganju ne poseduje tu mogućnost. Kao što je već istaknuto, primenom procesne posude od staklastog ugljenika, ostvareno je povećanje relativne osetljivosti od oko 10 puta ($C_m = 0,5$ mg/l vitamina B₂).

4.2.4.3. Preciznost

Preciznost je ocenjena za dve koncentracije vitamina B₂: 0,2 mg/l i 2 mg/l, kao ponovljivost i reproduktivnost određivanja. Redukcione struje koje su primenjene iznosile su 40 μ A za nižu koncentraciju i 45 μ A za višu koncentraciju analita. Ponovljivost određivanja, izražena kao RSD, iznosila je 3,16% i 2,08%, redom, za manji i veći sadržaj vitamina. Reprodutivnost određivanja, izražena kroz RSD vrednost, iznosila je 4,10% za sadržaj 0,2 mg/l i 3,51%, za

sadržaj 2 mg/l. Kako su sve vrednosti RSD bile manje od 5%, može se reći da razvijena metoda ima dobru preciznost.

4.2.4.4. Ispitivanje interferencija

Ispitivanje interferencija izvedeno je analiziranjem model rastvora vitamina B₂ sadržaja 0,5 mg/l i 1 mg/l, sa i bez dodatka vitamina B₁, vitamina B₃ (u formi nikotinamida), vitamina B₆, vitamina C, saharoze, laktoze i glukoze i upoređivanjem dobijenih analitičkih signala. Vitamini su dodavani u sadržajima od 0,5; 1; 5 i 10 mg/l, dok su saharoza, glukoza i laktoza dodavane u sadržajima od 5; 10; 15 i 20 g/l. Uticaj ispitivanih supstanci na analitički signal vitamina B₂ je prikazan u Tabeli 20. Redukciono vreme vitamina B₂ se nije značajnije menjalo sa dodatkom ispitivanih interferirajućih supstanci.

Za razliku od planarne disk elektrode, primenom procesne posude od staklastog ugljenika nije bilo interferencija od strane saharoze, glukoze i laktoze, čak ni u prisustvu 40000 puta većeg sadržaja ovih šećera, što se može objasniti većom osetljivošću metode uz primenu elektrode u vidu procesne posude i manjim sadržajem dodatih šećera, shodno manjem sadržaju vitamina B₂. Uzimajući u obzir preciznost metode (RSD ≤ 4,10%), supstanca je smatrana interferirajućom ukoliko je menjala veličinu analitičkog signala za više od 5 %. S obzirom da je RSD < 6,8%, u svim ovim ispitivanjima, primenjujući navedeni kriterijum, može se reći da je selektivnost dobra. Redukciono vreme se nije menjalo za više od 6,8% ni u jednom eksperimentu vezanom za ispitivanje interferencija, što svedoči o prihvatljivoj selektivnosti razvijene metode.

Tabela 20. Uticaj interferirajućih supstanci na hronopotenciometrijsko određivanje vitamina B₂ primenom procesne posude od staklastog ugljenika.

Interferirajuća supstanca	Sadržaj interferirajuće supstance (mg/l)	Promena signala (%)	
		C _m (B ₂) = 0,5 mg/l	C _m (B ₂) = 1 mg/l
B₁, B₃ (nikotinamid), B₆, C	0,5	2,8 ^a	2,4
	1	0,9	0,8
	5	2,1	1,9
	10	3,3	4,0
Sadržaj interferirajuće supstance (g/l)			
Saharoza, glukoza, laktoza	5	3,8	4,1
	10	2,7	2,4
	15	4,7	5,3
	20	6,8	5,7

^aVrednosti prikazane u tabeli su maksimalne promene signala za dati koncentracioni opseg ispitivane interferencije;

$$\text{Promena signala (\%)} = \frac{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)} - \text{vrednost signala sa dodatim interferentom (s)}}{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)}} \cdot 100$$

4.2.4.5. Primena i tačnost

Sadržaji vitamina B₂ u analiziranim multivitaminским dodacima ishrani, dobijeni primenom razvijene hronopotenciometrijske metode, upoređeni su sa vrednostima deklarisanim od strane proizvođača. Tačnost metode je proverena paralelnim analizama istih realnih uzoraka primenom visokopritisne tečne hromatografije i *recovery* testom.

4.2.4.6. Određivanje vitamina B₂ u multivitaminским dodacima ishrani primenom radne elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika

Elektroda u vidu procesne posude od staklastog ugljenika takođe je korišćena za određivanje vitamina B₂ u multivitaminским dodacima ishrani, a sadržaj je određivan metodom

dvostrukog dodatka standarda. Metoda kalibracione krive je takođe primenjena, ali rezultati nisu bili zadovoljavajući, tj. bili su manji od rezultata dobijenih metodom dodatka standarda, verovatno usled značajnog uticaja matriksa uzoraka. Rezultati analiza su prikazani u Tabeli 21. Za evaluaciju dobijenih rezultata primenjen je *t*-test uparenih vrednosti. Veoma dobro slaganje je uočeno između rezultata dobijenih razvijenom hronopotenciometrijskom metodom i paralelnom HPLC metodom, tj. nisu uočene statistički značajne razlike uz 95%-tnu verovatnoću ($|t| = 0,18 < t_{\text{kritično}} = 2,78$). Upareni *t*-test je takođe potvrdio dobro slaganje između dobijenih rezultata i sadržaja deklariranih od strane proizvođača ($|t| = 0,35 < t_{\text{kritično}} = 2,78$).

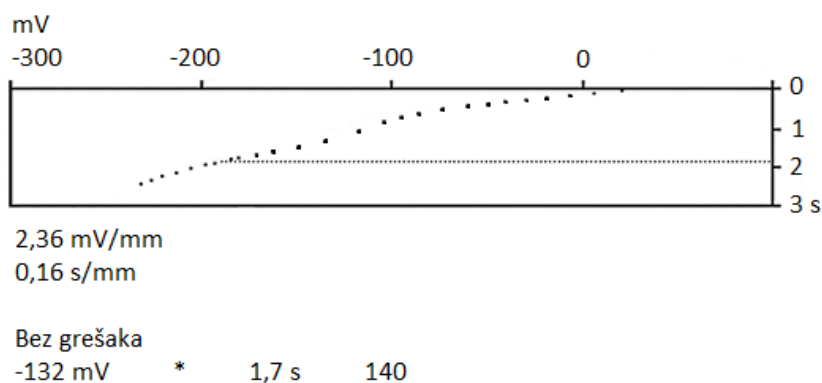
Tabela 21. Sadržaj vitamina B₂ u multivitaminskim dodacima ishrani određen primenom razvijene HA metode, uz primenu procesne posude od staklastog ugljenika i komparativne HPLC metode.

Sadržaj vitamina B ₂ (mg/tableti) ^a			
Uzorak	Razvijena HA metoda	HPLC ^b	Deklarisani sadržaj
BKT1	3,28 ± 0,08	3,42 ± 0,08	3,40
BKT3	1,48 ± 0,10	1,62 ± 0,10	1,60
MVT1	5,20 ± 0,06	4,98 ± 0,16	5,00
MVT2	3,50 ± 0,08	3,46 ± 0,30	3,40
Sadržaj vitamina B ₂ (mg/100 g)			
MVG2	5,05 ± 0,06	5,09 ± 0,44	5,00

^a srednja vrednost ± 2SD, n = 3; ^b referentna metoda.

MVT1 i MVT2 – multivitaminski dodaci ishrani u vidu tableta, koji pored kompleksa vitamina B sadrže i vitamine A, D, E i K, kao i mineralne materije; BKT1, BKT2, BKT3 i BKT4 – kompleksi vitamina B, u vidu tableta.

Hronopotenciogram vitamina B₂ dobijen analizom uzorka BKT1 prikazan je na Slici 31.



Slika 31. Hronopotenciogram vitamina B₂ dobijen analizom uzorka BKT1. $E_i = 0,017$ V;
 $I = 48,2$ μ A.

Tačnost razvijene metode, kao i ispravnost postupka pripreme uzoraka je proverena i testom povrata (*recovery testom*), dvostrukim 'spajkovanjem' uzoraka MVT1 i BKT1, a rezultati su prikazani u Tabeli 22. Vrednosti testa povrata su se kretale od 88% do 108%, čime je potvrđeno da matiks analiziranih uzoraka nije imao značajan uticaj na određivanje vitamina B₂ definisanom metodom, kao i da je postupak pripreme uzoraka ispravan.

Tabela 22. Rezultati *recovery* testa vitamina B₂ u uzorcima multivitaminskih dodataka ishrani.

Uzorak	Sadržaj pre dodatka standarda (mg/tableti)	Dodati sadržaj standarda (mg/tableti)	Očekivani sadržaj (mg/tableti)	Sadržaj nakon dodatka standarda (mg/tableti) ^a	Recovery (%) ^b
BKT1	3,28	0,5	3,78	3,72 ± 0,13	88,0
		1	4,28	4,14 ± 0,17	86,0
MVT1	5,20	0,5	5,70	5,74 ± 0,16	108,0
		1	6,20	6,23 ± 0,12	103,0

^asrednja vrednost ± 2SD, n = 5; ^bsrednja vrednost *recovery* testa (%), n = 5.

$$\text{Srednja vrednost recovery testa (\%)} = \frac{\text{sadržaj nakon dodatka standarda} - \text{sadržaj pre dodatka standarda}}{\text{dodati sadržaj}} \cdot 100$$

4.3. Određivanje vitamina B₃ hronopotenciometrijskom striping analizom

U ovom radu razvijena je veoma jednostavna metoda za određivanje vitamina B₃ hronopotenciometrijskom striping analizom na tankoslojnoj živinoj elektrodi.

4.3.1. Određivanje optimalnih uslova za određivanje vitamina B₃ hronopotenciometrijskom striping analizom

U okviru preliminarnih ispitivanja, analitički signal vitamina B₃ (40 mg/l) je registrovan u citratnom puferu pH 6 (0,2 mol/l), pri potencijalu akumulacije od -1,405 V i uz struju rastvaranja (oksidacije) od 6,1 μ A. Kao i pri određivanju vitamina B₁ hronopotenciometrijskom striping analizom, i pri određivanju vitamina B₃ istom tehnikom, depozit je stvaran na tankoslojnoj živinoj elektrodi nespecifičnom adsorpcijom, pri konstantnom potencijalu i uz difuzioni prenos mase (oko 15 s). Analitički signal vitamina B₃ dobijen je rastvaranjem depozita konstantnom strujom, kao oksidacioni talas na oko -0,25 V. Vreme mešanja između uzastopnih analiza u istom rastvoru iznosilo je 5 s, kroz ceo eksperiment.

4.3.1.1. Ispitivanje uticaja vrste, koncentracije i vrednosti pH pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₃

U ovom radu, uticaj vrste pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₃ ispitan je u citratnom puferu pH 6 (0,2 mol/l; 0,1 mol/l; 0,05 mol/l) i fosfatnom puferu pH 6 (0,1 mol/l; 0,05 mol/l). Sadržaj vitamina B₃ je iznosio 40 mg/l. Analize su izvođene pri potencijalu akumulacije od -1,405 V, vremenu akumulacije u mirnom rastvoru od 15 s i struji rastvaranja od 4,9 μ A.

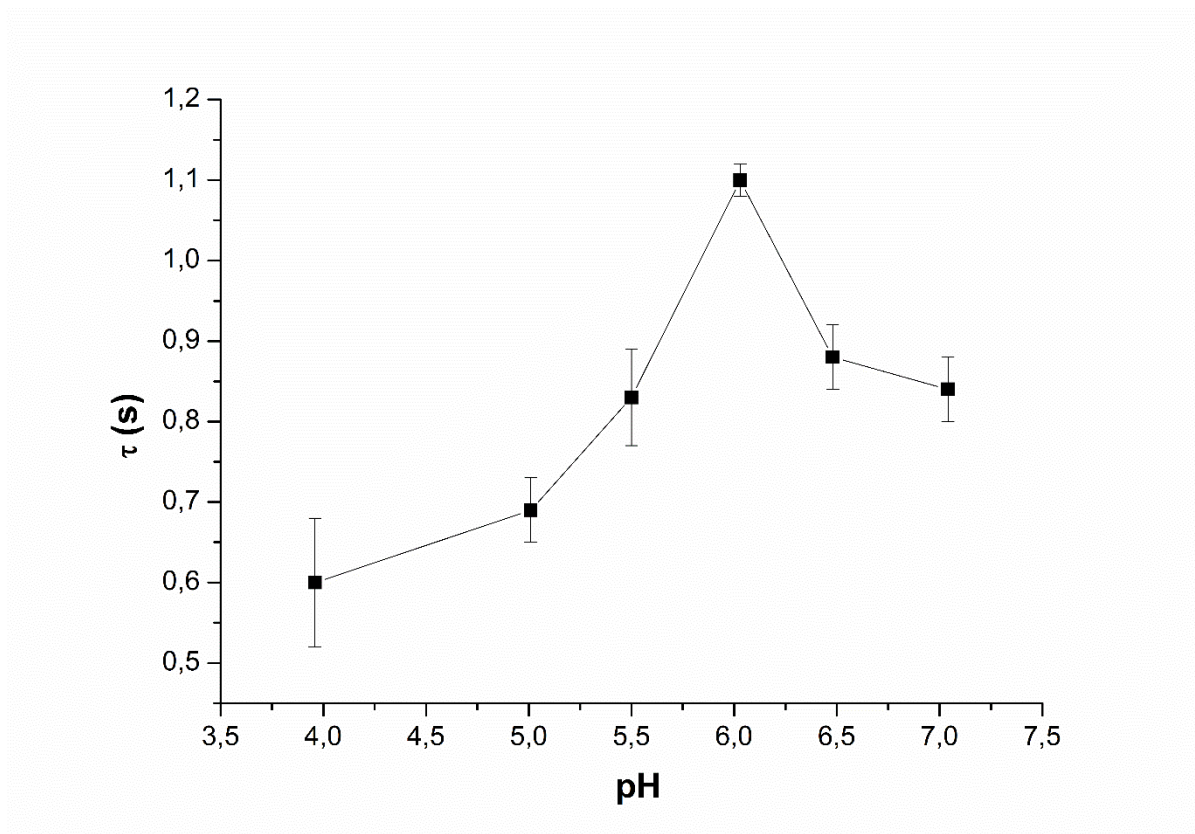
Najveća vrednost analitičkog signala (τ) dobijena je u citratnom puferu pH 6, koncentracije 0,05 mol/l (Tabela 23). U ovom puferu bila je i najbolja reproduktivnost analiza (RSD = 2,11%, n = 5), zbog čega je on odabran kao odgovarajući pomoćni elektrolit u svim daljim ispitivanjima.

Tabela 23. Uticaj vrste pomoćnog elektrolita na analitički signal vitamina B₃. C_m = 40 mg/l;

$$E_{ak} = -1,405 \text{ V}; t_{ak} = 15 \text{ s}; I = 4,9 \text{ } \mu\text{A}.$$

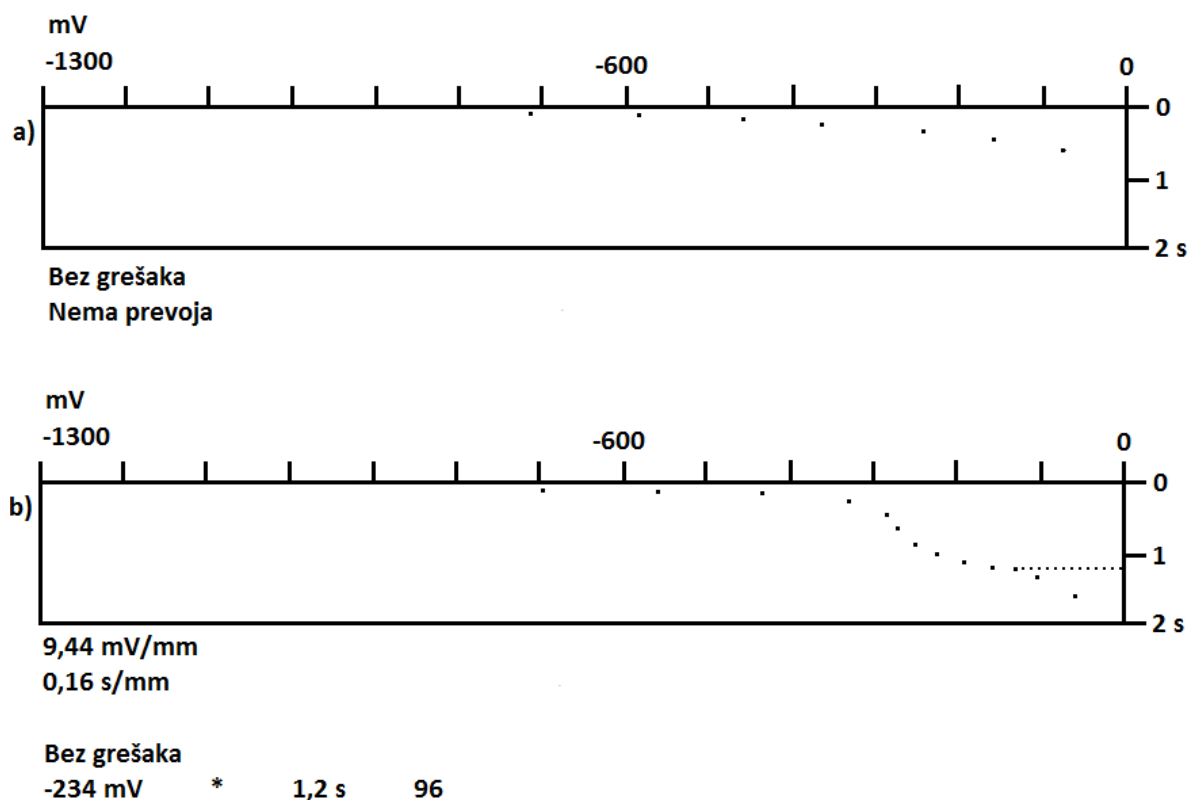
<i>Pomoćni elektrolit</i>	τ (s)	RSD (%)
Citratni pufer pH 6, 0,2 mol/l	0,68	4,53
Citratni pufer pH 6, 0,1 mol/l	0,99	3,13
Citratni pufer pH 6, 0,05 mol/l	1,17	2,11
Fosfatni pufer pH 6, 0,1 mol/l	1,00	2,47
Fosfatni pufer pH 6, 0,05 mol/l	1,03	5,14

Nakon odabira odgovarajućeg pomoćnog elektrolita i njegove koncentracije, pristupilo se optimizaciji vrednosti pH, koja je ispitana u opsegu 4 – 7. Vrednost pH 6 se pokazala najpogodnijom, uzimajući u obzir vrednost analitičkog signala (τ) i njegovu reproduktivnost (Slika 32).



Slika 32. Uticaj vrednosti pH na analitički signal vitamina B₃. $C_m = 40$ mg/l; $E_{ak} = -1,405$ V;
 $t_{ak} = 15$ s; $I = 4,9$ μ A.

Hronopotenciogrami, dobijeni analizom slepe probe (0,05 mol/l citratnog pufera pH 6) i rastvora 40 mg/l vitamina B₃ u istom puferu, prikazani su na Slici 33 a) i b).



Slika 33. Hronopotenciogram dobijen analizom: a) pomoćnog elektrolita, b) model rastvora 40 mg/l vitamina B₃. $E_{ak} = -1,405$ V; $t_{ak} = 15$ s; $I = 4,9$ μ A.

4.3.1.2. Ispitivanje uticaja potencijala akumulacije na analitički signal vitamina B₃

Uticaj potencijala akumulacije je ispitan u opsegu od -1,459 V do -1,001 V, pri vrednosti oksidacione struje od 4,9 μ A. Najveća vrednost analitičkog signala vitamina B₃ registrovana je pri potencijalu akumulacije od -1,313 V, međutim, kasnija ispitivanja kao i analize pri određivanju vitamina B₃ u realnim uzorcima, uticali su na izbor potencijala od -1,405 V, kao optimalnog. Naime, iako je visina analitičkog signala na potencijalu akumulacije -1,405 V bila za oko 30% manja, selektivnost određivanja je bila znatno bolja u odnosu na potencijal akumulacije od -1,313 V i -1,356 V. Analizom realnih uzoraka kao i smeše vitamina B₁, B₂ i B₃, pri potencijalu akumulacije od -1,313 V, kao i -1,356 V, javljale su se značajne interferencije izazvane prisustvom vitamina B₁ i B₂. Uticaj potencijala akumulacije (E_{ak}) na analitički signal vitamina B₃ (τ) prikazan je u Tabeli 24.

Tabela 24. Uticaj potencijala akumulacije na određivanje vitamina B₃. C_m = 40 mg/l;

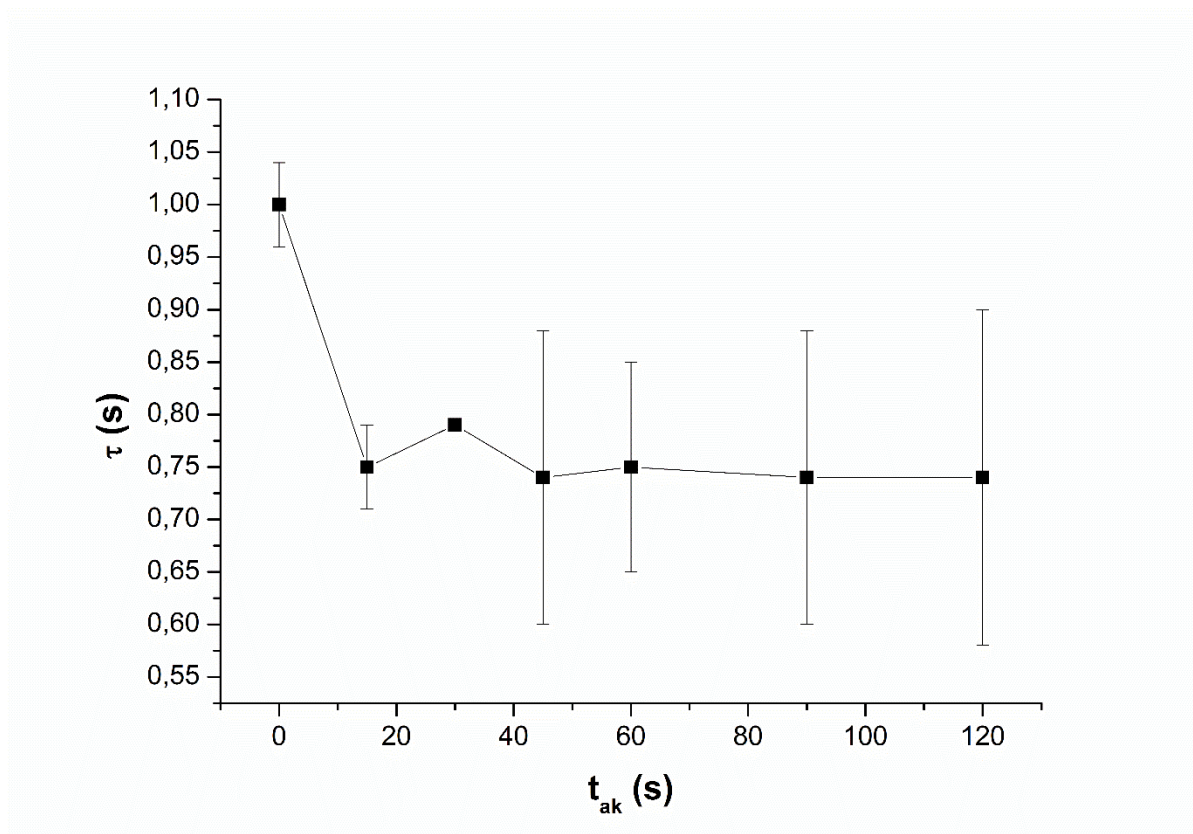
$$t_{ak} = 15 \text{ s}; I = 4,9 \mu\text{A}.$$

<i>E_{el}</i> (V)	τ (s) ^a	RSD (%)
-1,459	1,15 ± 0,06	2,69
-1,405	1,24 ± 0,02	1,14
-1,356	1,63 ± 0,10	3,11
-1,313	1,73 ± 0,12	3,57
-1,206	1,20 ± 0,16	6,87
-1,109	n.d.	-
-1,001	n.d.	-

^asrednja vrednost ± 2 SD, n = 5; n.d. – nije detektovan.

4.3.1.3. Ispitivanje uticaja vremena akumulacije i uslova prenosa mase na analitički signal vitamina B₃

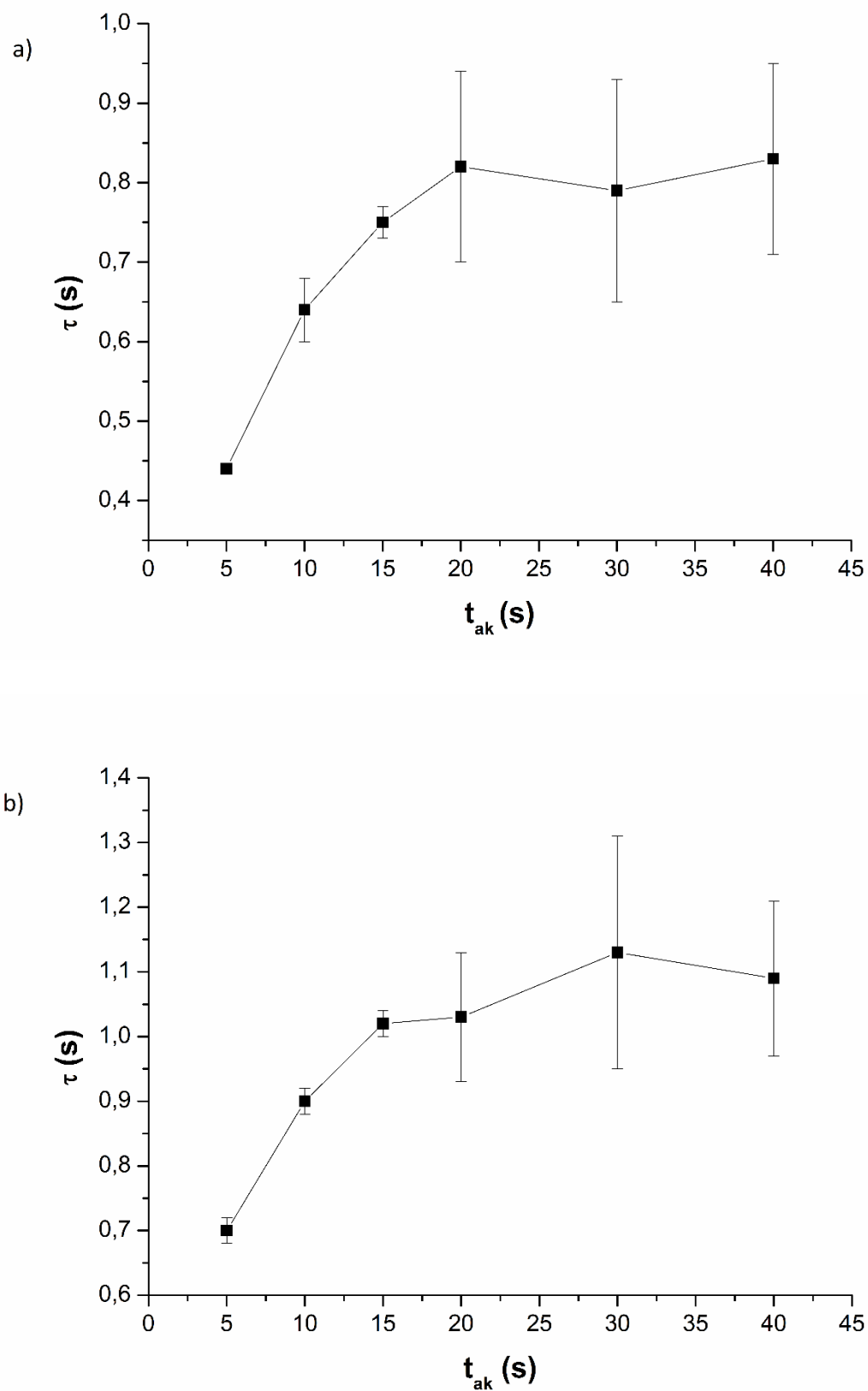
Slično kao kod određivanja vitamina B₁ primenom HSA i kod određivanja vitamina B₃ uočeno je da konvektivni prenos mase rastvora nepovoljno utiče na analitički signal vitamina, odnosno na stvaranje depozita na tankoslojnoj živinoj elektrodi. Uticaj vremena akumulacije uz mešanje (4000 ob/min.) ispitan je od 0 s do 120 s u rastvoru vitamina B₃ sadržaja 40 mg/l, uz saopšteno vreme pauze od 10 s (tokom pauze odvija se koncentrovanje analita na radnoj elektrodi u mirnom rastvoru). Pri vremenu elektrolize 0 s i vremenu pauze od 10 s javljao se najveći analitički signal, dok se pri vremenu akumulacije od 15 s javljao manji analitički signal koji se praktično nije menjao do 120 s, ali je reproduktivnost opadala sa porastom vremena akumulacije (Slika 34). Pri vremenu elektrolize od 0 s, koeficijent varijacije je bio 1,75%, a pri 120 s 10,81%.



Slika 34. Uticaj vremena akumulacije na analitički signal vitamina B₃ uz forsirani konvektivni prenos mase. $C_m = 40$ ppm B₃; $E_{ak} = -1,405$ V; $t_{ak} = 10$ s; $I = 4,9$ μ A.

Iz prethodnog ispitivanja, moglo se zaključiti da je bolje raditi koncentrovanje u mirnom rastvoru, tj. uz difuzioni prenos mase.

Ispitan je i uticaj vremena akumulacije (bez saopštenog vremena pauze) u difuzionim uslovima prenosa mase za dve masene koncentracije vitamina B₃: 40 mg/l i 10 mg/l (Slika 35). Ispitivano vreme elektrolize se kretalo u intervalu 5 – 40 s. Pri vremenu elektrolize od 5 – 15 s bio je primetan porast analitičkog signala vitamina B₃ za oba sadržaja vitamina, uz veoma dobru reproduktivnost (RSD < 3,85%, n = 3). Saopštavanjem vremena elektrolize od 30 s, signal je bio veći (za obe ispitivane masene koncentracije), ali je došlo do pada reproduktivnosti (RSD = 7,84% za 40 mg/l vitamina B₃, i RSD = 9,38% za 10 mg/l vitamina B₃). Pri vremenu elektrolize od 40 s, hronopotenciogrami su bili 'razvučeni', odnosno, prevojna tačka nije bila dovoljno izražena, što je onemogućavalo njeno reproduktivno određivanje (signal se javljao u jednoj od tri analize).



Slika 35. Uticaj vremena akumulacije u difuzionim uslovima prenosa mase na analitički signal vitamina B₃, za: a) 10 mg/l ($I = 2,6 \mu\text{A}$) i b) 40 mg/l ($I = 4,9 \mu\text{A}$). $E_{ak} = -1,405 \text{ V}$.

Imajući u vidu veličinu analitičkog signala i njegovu reproduktivnost, kao i trajanje elektrolize, utvrđeno je da se odgovarajuće vreme akumulacije nalazi u intervalu od 15 s do 30 s za obe koncentracije vitamina B₃. Zbog toga je, pri navedenim vrednostima vremena akumulacije, ispitana linearnost analitičkog signala vitamina B₃ u opsegu sadržaja 20 – 100 mg/l. Eksperiment je rađen pri potencijalu akumulacije od -1,405 V i struji rastvaranja od 6,9 μA. Određeni su koeficijenti pravca, tj. relativna osetljivost metode pri jednom i drugom vremenu akumulacije, kao i vrednosti odsečka kalibracionih kriva. Pri vremenu od 15 s, linearnost je bila veoma dobra, relativna osetljivost (odziv) je iznosila 0,0136 s·l/mg, a odsečak na 'y'-osi 0,068 s ($\tau = 0,0136 \cdot C_m + 0,068$; $r = 0,9997$). Pri vremenu akumulacije od 30 s dobijena je logaritamska zavisnost, sa većom relativnom osetljivošću (odzivom) od 0,4133 s·l/mg i odsečkom na 'y'-osi od 0,859 s ($\tau = 0,4133 \cdot \ln(C_m) - 0,859$; $r = 0,9973$). Logaritamska funkcija se postepeno zakrivljuje prema 'x'-osi, što je moguće objasniti zasićenjem sloja žive pri visokim masenim koncentracijama vitamina B₃, primenom vremena akumulacije od 30 s i dužim.

Može se zaključiti da je vreme akumulacije od 15 s, u mirnom rastvoru, dovoljno da se molekuli vitamina B₃ adsorbuju na površini radne elektrode i oksiduju u analitičkom koraku, a da pri tome ne dođe do zasićenja radne elektrode, za ispitivani opseg masenih koncentracija. Vreme akumulacije od 15 s u mirnom rastvoru je usvojeno kao najpovoljnije za određivanje vitamina B₃ primenom AdHSA.

4.3.1.4. Ispitivanje uticaja debljine tankoslojne živine elektrode na analitički signal vitaminima B₃

Uticaj debljine sloja žive na veličinu analitičkog signala vitamina B₃ ispitan je u rastvoru sadržaja 10 mg/l i 40 mg/l vitamina B₃, pri potencijalu akumulacije od -1,405 V i vremenu akumulacije od 15 s. Struja oksidacije je za veći sadržaj vitamina iznosila 4,9 μA, a za manji 1,4 μA. Vreme deponovanja sloja žive je ispitano u intervalu od 60 – 240 s, što je odgovaralo debljini sloja od 32,5 nm – 129,8 nm. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 25, iz koje se može videti da debljina sloja živine elektrode nema značajnog uticaja na analitički signal vitamina B₃. Kao optimalna vrednost vremena deponovanja žive ipak je odabrano vreme od 240 s,

zbog najbolje ponovljivosti analiza, i nešto većeg analitičkog signala u odnosu na ostale ispitane vrednosti.

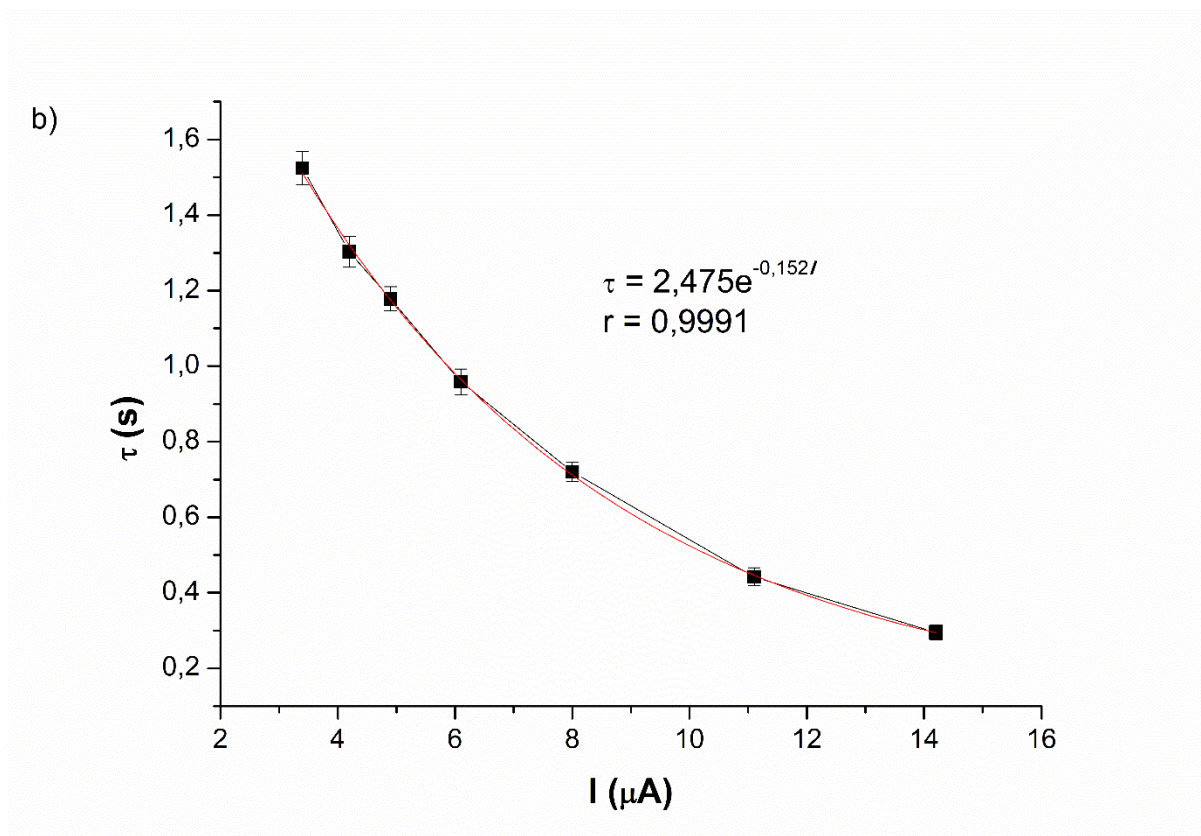
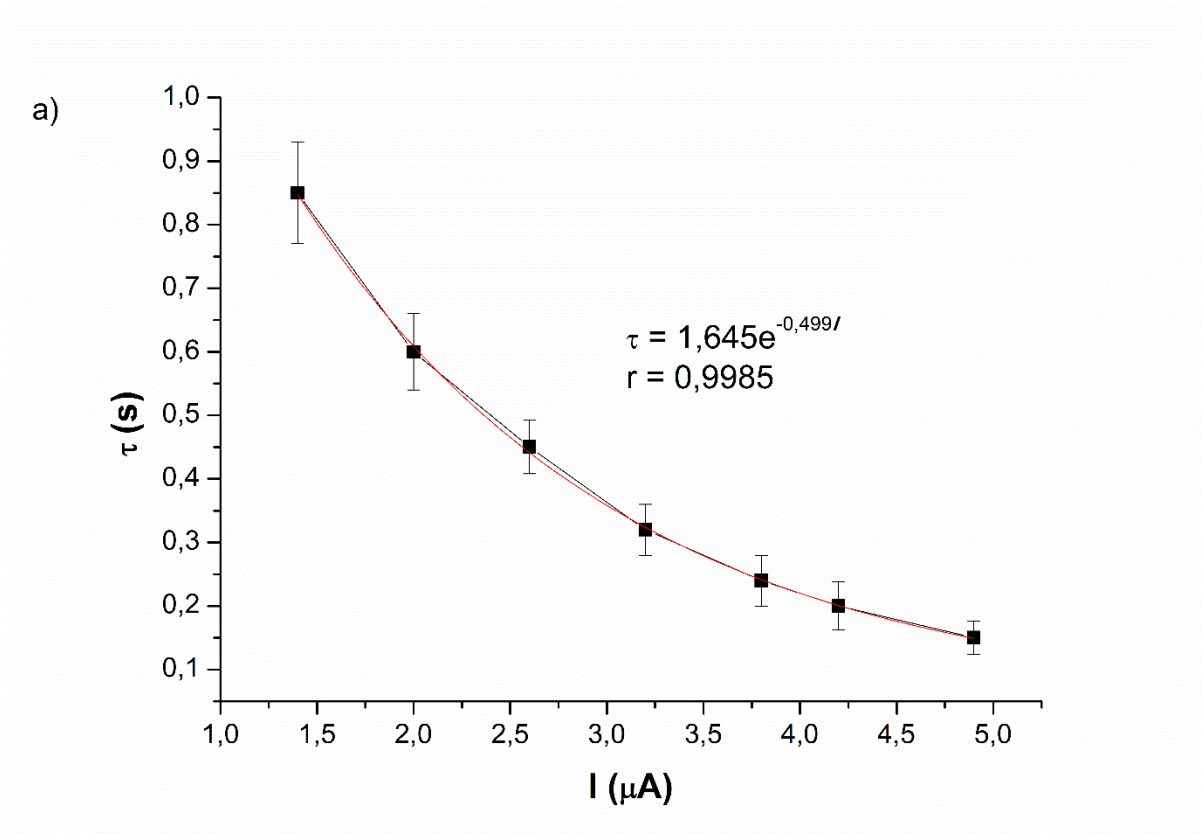
Tabela 25. Uticaj debljine sloja žive na analitički signal vitamina B₃ u rastvoru sadržaja 10 mg/l (I = 1,4 μA) i 40 mg/l (I = 4,9 μA). E_{ak} = -1,405 V; t_{ak} = 15 s.

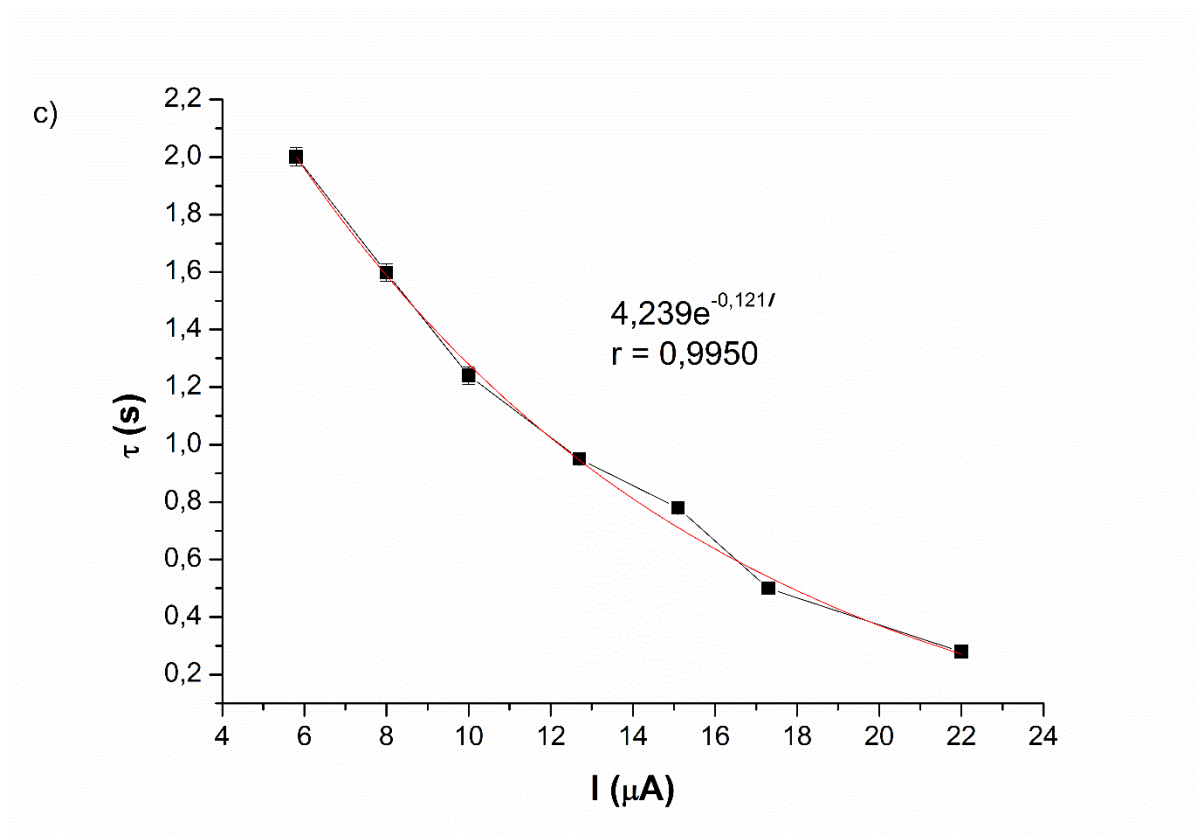
	<i>Debljina sloja Hg (nm)</i>	<i>Vreme oksidacije vitamina B₁ (s)</i>	<i>RSD (%)</i>
10 mg/l B₁	32,47 (60 s) ^a	0,60 ± 0,08 ^b	6,28
	64,94 (120 s)	0,61 ± 0,08	6,19
	97,38 (180 s)	0,61 ± 0,04	4,00
	129,82 (240 s)	0,62 ± 0,02	2,28
50 mg/l B₁	32,47 (60 s)	0,93 ± 0,04	2,63
	64,94 (120 s)	0,93 ± 0,06	3,07
	97,38 (180 s)	0,95 ± 0,08	3,95
	129,82 (240 s)	0,97 ± 0,02	1,47

^aVreme u zagradi predstavlja vreme deponovanja tankoslojne živine elektrode; ^bSrednja vrednost ± 2SD, n = 3.

4.3.1.5. Ispitivanje uticaja struje oksidacije na analitički signal vitamina B₃

Uticaj struje rastvaranja na analitički signal je ispitan na tri masene koncentracije vitamina B₃ (10 mg/l, 50 mg/l i 100 mg/l), uz saopštavanje oksidacionih struja u opsezima od 1,4 – 4,9 μA, 3,4 – 14,2 μA i 5,8 – 22 μA, redom. Potencijal akumulacije je iznosio -1,405 V, vreme akumulacije u mirnom rastvoru 15 s i završni potencijal -0,01 V. Za sva tri sadržaja vitamina, zavisnost vremena oksidacije (τ) od saopštene struje (I), bila je eksponencijalnog karaktera, uz visoku vrednost koeficijenta korelacije (r): za 10 mg/l: τ = 1,645 · e^{-0,499I} (r = 0,9985), za 50 mg/l: τ = 2,475 · e^{-0,152I} (r = 0,9991) i za 100 mg/l vitamina B₃: τ = 4,239 · e^{-0,121I} (r = 0,9950) (Slika 36).





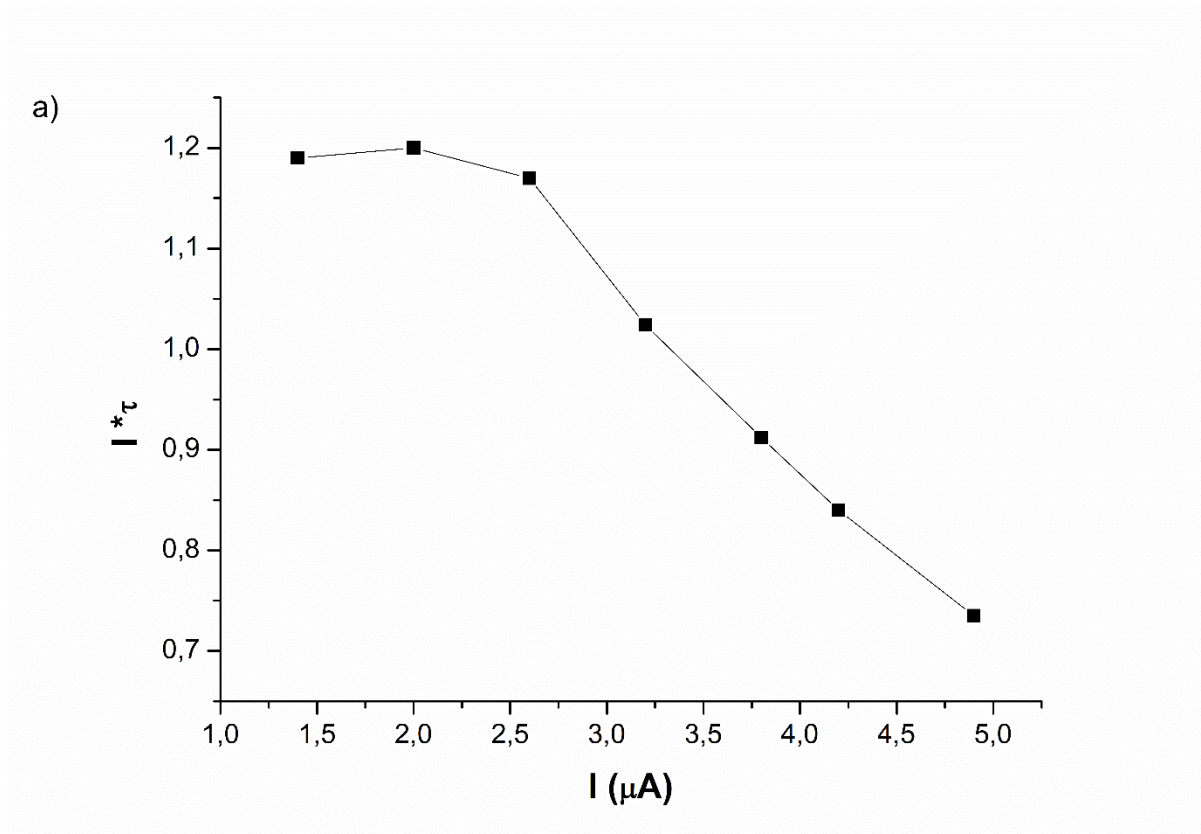
Slika 36. Zavisnost analitičkog signala vitamina B₃ od saopštene struje oksidacije za:
a) 10 mg/l, b) 50 mg/l i c) 100 mg/l vitamina B₃. $E_{ak} = -1,405 \text{ V}$; $t_{ak} = 15 \text{ s}$.

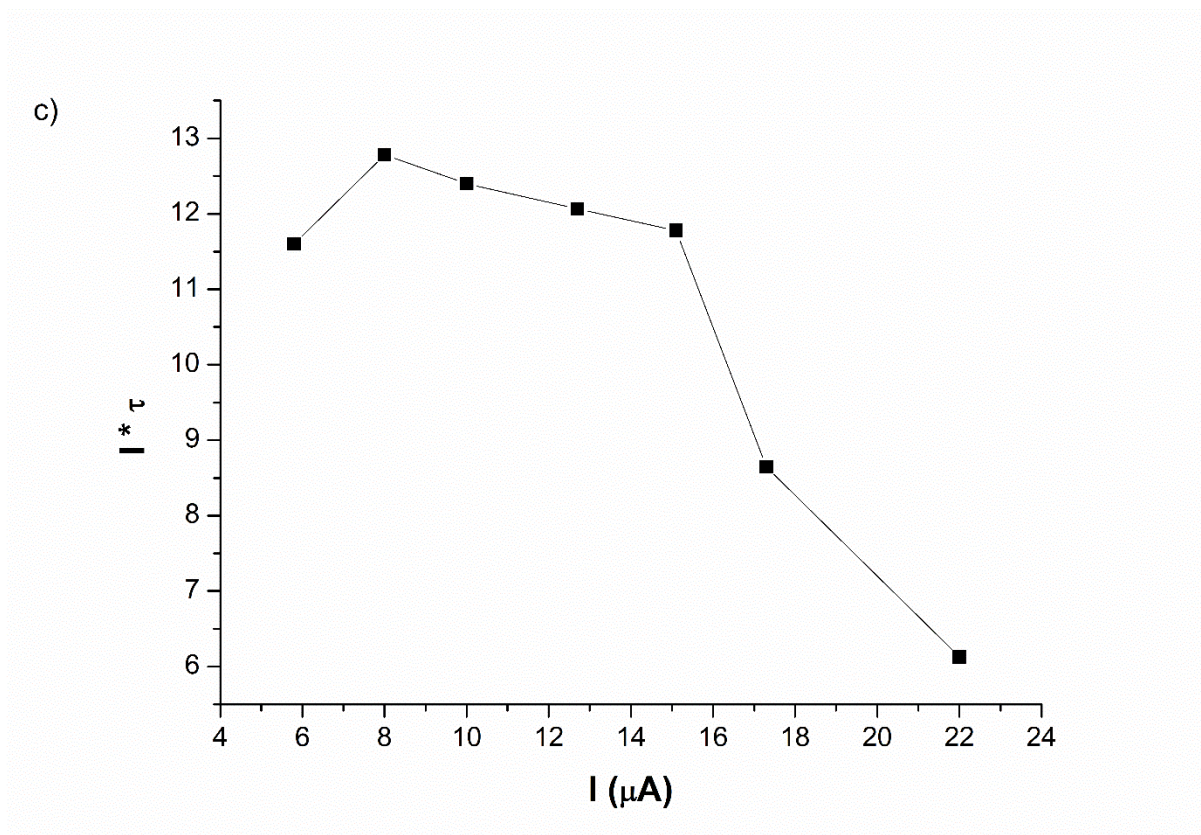
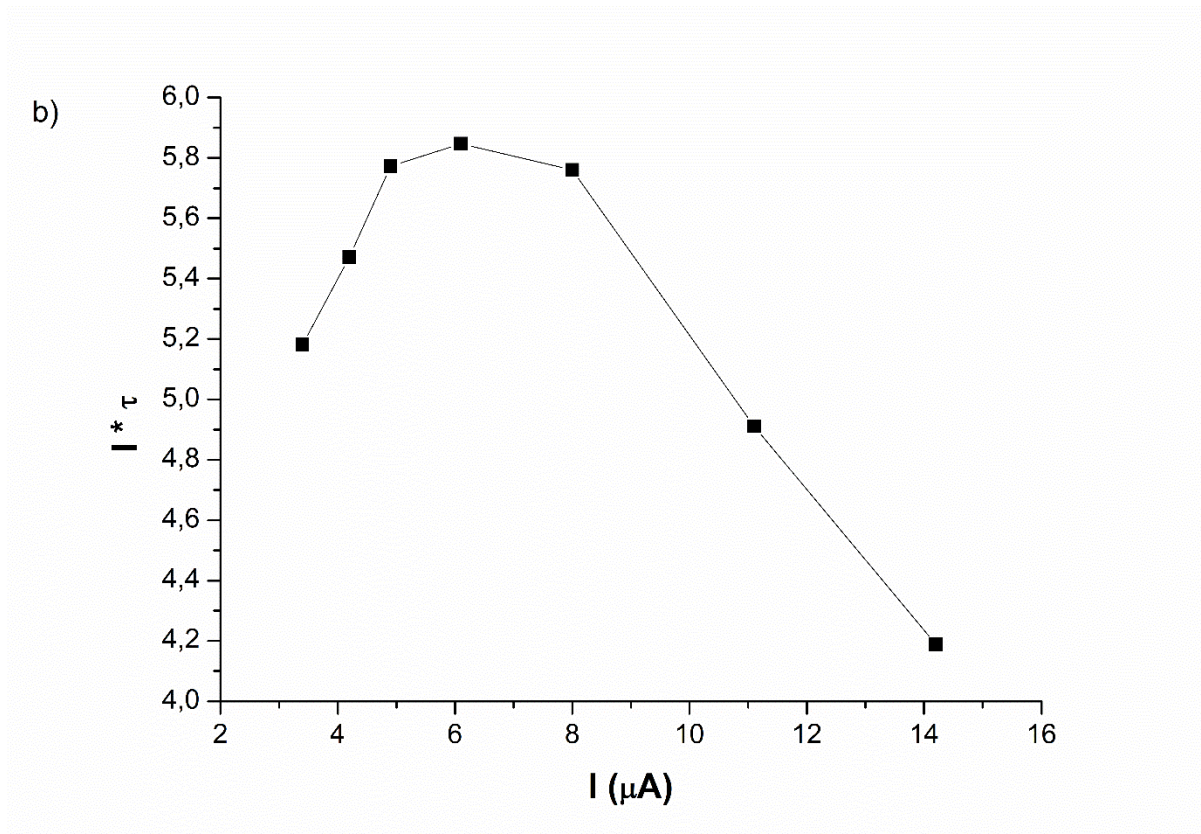
(Srednja vrednost \pm 2SD; $n = 3$).

Kao što je ranije već pomenuto, za određivanje odgovarajućeg intervala struje rastvaranja u HSA preporučuje se kriterijum $I \cdot \tau = f(I)$, odnosno, optimalni intervali struje su predstavljeni oblastima navedene zavisnosti gde je proizvod $I \cdot \tau$ praktično konstantan. Navedeni kriterijum je prikazan na Slici 37a, b i c za 10 mg/l, 50 mg/l i 100 mg/l vitamina B₃, redom. Za sadržaj vitamina B₃ od 10 mg/l optimalna vrednost struje rastvaranja se nalazila u intervalu od 1,4 – 2,6 μA , za sadržaj vitamina od 50 mg/l odgovarajuća vrednost struje se nalazila u opsegu od 4,9 – 8,1 μA , dok se za sadržaj od 100 mg/l vitamina optimalna vrednost struje nalazila u intervalu od 8,1 – 15,1 μA . Kao što se na slikama može videti, navedeni intervali predstavljaju zaravnjenje delove odgovarajuće zavisnosti. Generalno, za opseg sadržaja B₃ od 10 – 100 mg/l, odgovarajuće struje oksidacije su bile u intervalu od 1,4 μA – 15,1 μA . Za manje sadržaje, saopštavane su struje manje vrednosti, dok je za rastvore

većeg sadržaja, saopštavana struja veće vrednosti. Za određene opsege koncentracija, struja se bira tako da se ostvari odgovarajuća reproduktivnost.

Potencijal oksidacije vitamina B₃ nije značajno varirao sa promenom vrednosti struje i kretao se u opsegu potencijala od -0,23 V do -0,26 V (RSD = 4,20%, n = 3).





Slika 37. Kriterijum $I \cdot \tau = f(I)$ za: a) 10 mg/l; b) 50 mg/l i c) 100 mg/l vitamina B₃.

4.3.2. Validacija metode

4.3.2.1. Linearnost

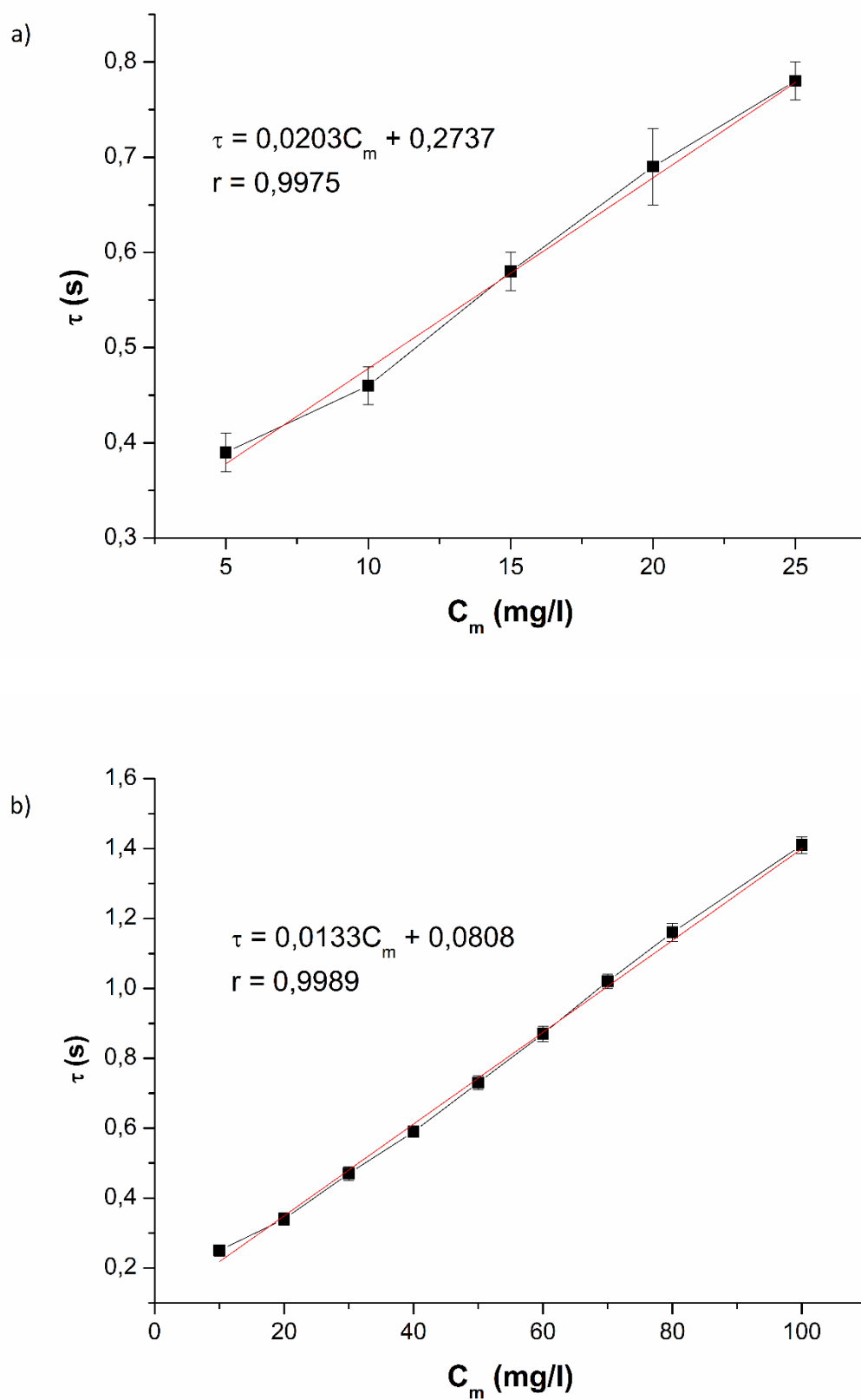
Linearnost analitičkog signala je ispitana za dva opsega masene koncentracije vitamina B₃: 5 – 25 mg/l, uz primenjenu oksidacionu struju od 2,6 μA, i 10 – 100 mg/l B₃ uz struju oksidacije od 6,9 μA, pri prethodno usvojenim optimalnim uslovima analize. Na osnovu visokih vrednosti koeficijenta korelacije (*r*) (Tabela 26), može se zaključiti da je linearnost analitičkog signala vitamina B₃ za oba koncentraciona opsega bila veoma dobra. U Tabeli 26 dati su i parametri regresionih pravih i standardna devijacija nagiba (*S_a*) i odsečka (*S_b*). Kalibracione krive za ispitane opsege masene koncentracije prikazane su na Slici 38.

Tabela 26. Opsezi linearnosti za određivanje vitamina B₃ hronopotenciometrijskom striping analizom.

Opseg sadržaja (mg/l)	Funkcija prave	<i>S_a</i> (s·l/mg)	<i>S_b</i> (s)	<i>r</i>
5 – 25	$\tau = 0,0203 \cdot C_m + 0,2737$	0,0002	0,0135	0,9971
10 – 100	$\tau = 0,0133 \cdot C_m + 0,0808$	0,0002	0,0052	0,9989

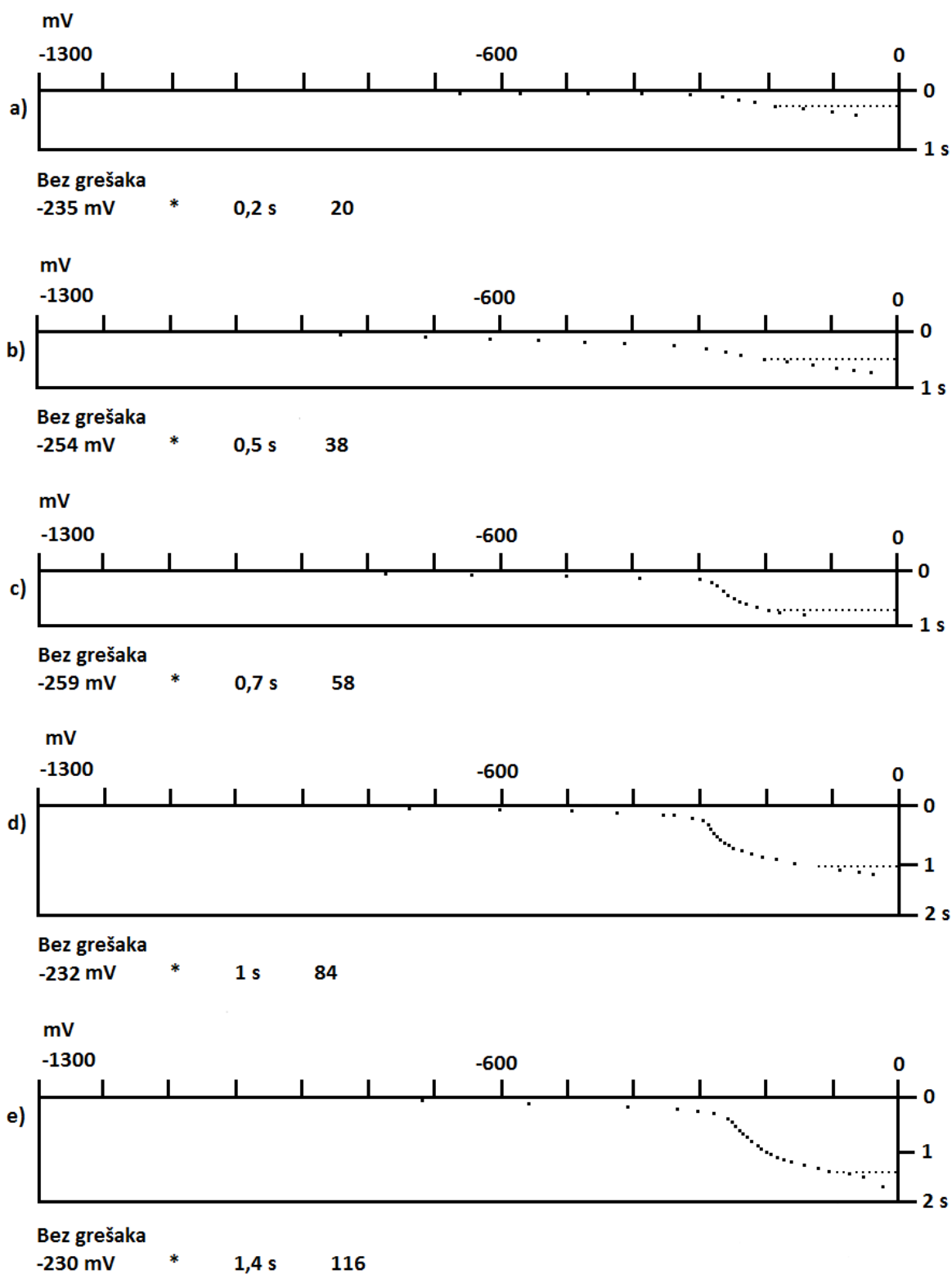
τ – vreme oksidacije (s); C_m – sadržaj vitamina B₃ (mg/l); *S_a* – standardna devijacija nagiba (*n* = 5); *S_b* – standardna devijacija odsečka (*n* = 5); *r* – koeficijent korelacije regresione prave.

Za opseg masene koncentracije od 5 – 25 mg/l, može se uočiti da je odsečak kalibracione krive bio relativno velik (0,2737 s). Ukoliko bi se kvantitativno određivanje radilo u ovoj oblasti koncentracija, morala bi se primeniti metoda kalibracione krive. Odsečak kalibracione krive za opseg sadržaja od 10 – 100 mg/l je bio znatno manji, što omogućava primenu metode dodatka standarda za taj interval sadržaja.



Slika 38. Linearnost: kalibraciona kriva za opseg masene koncentracije od: a) 5 – 25 mg/l ($I = 2,6 \mu A$) i b) 10 – 100 mg/l vitamina B₃ ($I = 6,9 \mu A$). $E_{ak} = -1,405 V$; $t_{ak} = 15 s$.

Hronopotenciogrami različitih sadržaja vitamina B₃ u opsegu od 10 – 100 mg/l predstavljeni su na Slici 39. Kao što se može videti sa slike 39, potencijal rastvaranja vitamina B₃ se kretao u intervalu od -230 mV do -259 mV, uz ponovljivost od 5,56% (RSD), što potvrđuje da su odabrani eksperimentalni uslovi bili odgovarajući.



Slika 39. Hronopotenciogrami dobijeni analizom rastvora vitamina B₃ sadržaja: a) 10 mg/l; b) 30 mg/l; c) 50 mg/l; d) 70 mg/l; e) 100 mg/l. $E_{el} = -1,405$ V; $t_{el} = 15$ s; $I = 6,9$ μ A. Pomoćni elektrolit: citratni pufer pH 6 (0,05 mol/l).

4.3.2.2. Granica detekcije i granica kvantitativnog određivanja

Za definisanje granice detekcije (LOD) i granice kvantitativnog određivanja (LOQ) primenjeni su isti kriterijumi kao i kod određivanja vitamina B₁ i B₂ u ovom radu (Izrazi I i II). Izračunate vrednosti LOD i LOQ su iznosile 2,20 mg/l i 6,66 mg/l, redom. Granica detekcije vitamina B₃, postignuta ovom metodom upoređena je sa vrednostima LOD postignutim u ranije objavljenim radovima (Tabela 27). LOD vrednost razvijene metode bila je veća od ranije postignutih vrednosti, što se može objasniti manjom osetljivošću hronopotenciometrijskih tehnika u odnosu na voltometrijske. Važno je naglasiti da su hronopotenciometrijske tehnike nešto selektivnije od voltometrijskih, što predstavlja značajnu prednost u analizama realnih uzoraka složenog matriksa.

Metoda razvijena u ovom radu bila je dovoljna za kvantitativno određivanje vitamina B₃ u realnim uzorcima multivitaminskih dodataka ishrani.

Tabela 27. Poređenje razvijene metode sa ranije objavljenim elektroanalitičkim metodama za određivanje vitamina B₃.

Tehnika	Radna elektroda	Pomoćni elektrolit	Linearni opseg (mg/l)	LOD (mg/l)	Literatura
CV	Au radna elektroda	Fosfatni pufer pH 5,0	NAC: 0,33 – 295,46	0,033	Wang i sar., 2006
			NA: 0,403 – 293,112	0,040	
AdVSA	Au-MA	Fosfatni pufer pH 7,54	0,0554 – 98,49	0,0172	Yang i Wang, 2008
AdHSA	MFE	Citratni pufer, pH 6, 0,2 mol/l	5 – 100	2,20	Ovaj rad

CV – ciklična voltometrija; *NAC* - nikotinska kiselina; *NA* – nikotinamid; *AdVSA* – adsorpciona voltometrijska striping analiza; *Au-MA* – zlatna elektroda modifikovana merkptoacetatnom kiselinom; *AdHSA* – adsorpciona hronopotenciometrijska striping analiza; *MFE* – tankoslojna živina elektroda (Mercury Film Electrode).

4.3.2.3. Preciznost

Preciznost, odnosno ponovljivost i reproduktivnost metode, je ispitana za tri sadržaja vitamina B₃: 10 mg/l, uz struju od 3,4 μA, 50 mg/l, uz oksidacionu struju od 4,9 μA i 100 mg/l, uz primenjenu struju oksidacije od 10 μA, pri optimalnim uslovima određivanja. Ponovljivost, izražena kao RSD, iznosila je 1,75%, za sadržaj 100 mg/l, 2,31%, za sadržaj 50 mg/l i 2,91%, za sadržaj vitamina B₃ od 10 mg/l. Reprodutivnost metode, izražena vrednošću RSD, iznosila je 2,21%, 3,44% i 3,90%, za 100 mg/l, 50 mg/l i 10 mg/l, redom. Kako ni jedna vrednost relativne standardne devijacije nije veća od 3,90%, može se zaključiti da je preciznost razvijene metode bila veoma dobra.

4.3.2.4. Ispitivanje interferencija

Selektivnost razvijene metode je ispitana na tri masene koncentracije vitamina B₃: 10 mg/l, 50 mg/l i 100 mg/l, dodatkom potencijalnih interferirajućih jedinjenja, kao što su vitamini B₁ i B₂, zajednički rastvor vitamina B₁ i B₂, vitamin B₆, vitamin C, limunska kiselina, dekstroza i saharoza. U Tabelama 28, 29 i 30, dati su opsezi masenih koncentracija interferirajućih supstanci, kao i njihov uticaj na analitički signal vitamina B₃. Ukoliko se sa dodatkom ispitivane supstance signal vitamina B₃ menjao za više od 5%, smatralo se da interferencija postoji.

Tabela 28. Uticaj potencijalnih interferirajućih supstanci na analitički signal vitamina B₃ za koncentraciju 10 mg/l.

Sadržaj vitamina B₃: 10 mg/l		
Interferencija	Sadržaj interferencije (mg/l)	Promena signala (%)
B₁	1 – 2	-2,1 ^a
	3	-38,3
B₂	1 – 2	2,3
	3	-38,1
B₁ + B₂	1 – 2	4,6
	3	-37,2
B₆		-4,5
C	2 – 100	-4,9
Limunska kiselina		-5,1
Interferencija	Sadržaj interferencije (g/l)	Promena signala (%)
Saharoz		2,1
Dekstroza	5 – 50	-2,4

^aVrednosti prikazane u tabeli su maksimalne promene signala za dati koncentracioni opseg ispitivane interferencije.

$$\text{Promena signala (\%)} = \frac{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)} - \text{vrednost signala sa dodatim interferentom (s)}}{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)}} \cdot 100$$

Tabela 29. Uticaj potencijalnih interferirajućih supstanci na analitički signal vitamina B₃ za koncentraciju 50 mg/l.

Sadržaj vitamina B₃: 50 mg/l		
Interferencija	Sadržaj interferencije (mg/l)	Promena signala (%)
B₁	3 – 10	2,1 ^a
	15	-21,0
B₂	3 – 10	-3,2
	15	-24,5
B₁ + B₂	3 – 10	3,1
	15	-22,4
B₆		4,9
C	10 – 150	-4,4
Limunska kiselina		-5,1
Interferencija	Sadržaj interferencije (g/l)	Promena signala (%)
Saharoz		-1,9
Dekstroza	5 – 50	-4,7

^aVrednosti prikazane u tabeli su maksimalne promene signala za dati koncentracioni opseg ispitivane interferencije.

$$\text{Promena signala (\%)} = \frac{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)} - \text{vrednost signala sa dodatim interferentom (s)}}{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)}} \cdot 100$$

Tabela 30. Uticaj potencijalnih interferirajućih supstanci na analitički signal vitamina B₃ za koncentraciju 100 mg/l.

Sadržaj vitamina B₃: 100 mg/l		
Interferencija	Sadržaj interferencije (mg/l)	Promena signala (%)
B₁	5 – 20	-3,3 ^a
	30	-22,5
B₂	5 – 20	3,4
	30	-20,5
B₁ + B₂	5 – 20	-5,3
	30	-22,1
B₆		-4,6
C	10 – 200	-3,7
Limunska kiselina		-4,7
Interferencija	Sadržaj interferencije (g/l)	Promena signala (%)
Saharoz		-0,9
Dekstroza	5 – 50	-1,1

^aVrednosti prikazane u tabeli su maksimalne promene signala za dati koncentracioni opseg ispitivane interferencije.

$$\text{Promena signala (\%)} = \frac{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)} - \text{vrednost signala sa dodatim interferentom (s)}}{\text{vrednost signala bez dodatog interferenta (s)}} \cdot 100$$

Kao što se iz tabela može videti, vitamini B₆ i C, limunska kiselina, saharoza i dekstroza nemaju uticaja na analitički signal vitamina B₃ u ispitivanom opsegu masenih koncentracija.

Sa druge strane, vitamini B₁ i B₂, kao i zajednički rastvor ovih vitamina, smanjuju analitički signal vitamina B₃. Sadržaji vitamina B₁ i B₂, koji dovode do smanjenja analitičkog signala vitamina B₃ su 3,33 puta manji od sadržaja vitamina B₃. Analitički signali vitamina B₁ se prvi put javlja pri sadržaju 30 mg/l, na potencijalu od oko -0,43 V, a vitamin B₂ se javlja pri sadržaju od 5 mg/l, na potencijalu od oko -0,16V.

Posmatrajući rezultate predstavljene u Tabelama 28, 29 i 30, može se zaključiti da je za određivanje vitamina B₃ u realnim uzorcima bitan odnos masenih koncentracija vitamina B₁, B₂ i B₃, a ne koncentracija ovih vitamina. Sadržaj vitamina B₃ mora da bude bar 4 puta veći od sadržaja vitamina B₁ i B₂, di bi mogao da se odredi razvijenom metodom. S obzirom da je sadržaj vitamina B₃ u multivitaminским dodacima ishrani, u većini slučajeva, pet do deset puta veći od sadržaja vitamina B₁ i B₂, selektivnost predložene metode je dovoljna za brzo i tačno određivanje vitammina B₃ u navedenim proizvodima.

4.3.2.5. Primena i tačnost

Sadržaji vitamina B₃ koji su dobijeni primenom razvijene metode za analizu realnih uzoraka (multivitaminskih dodataka ishrani), upoređeni su sa deklarisanim sadržajima, dok je tačnost metode ispitana analizama istih uzoraka primenom HPLC. Tačnost metode je dodatno proverena testom povrata (*recovery testom*).

4.3.2.6. Određivanje vitamina B₃ u multivitaminskim dodacima ishrani

Vitamin B₃ je određivan u multivitaminskim dodacima ishrani pri usvojenim eksperimentalnim uslovima rada, koji su predstavljeni u Tabeli 31.

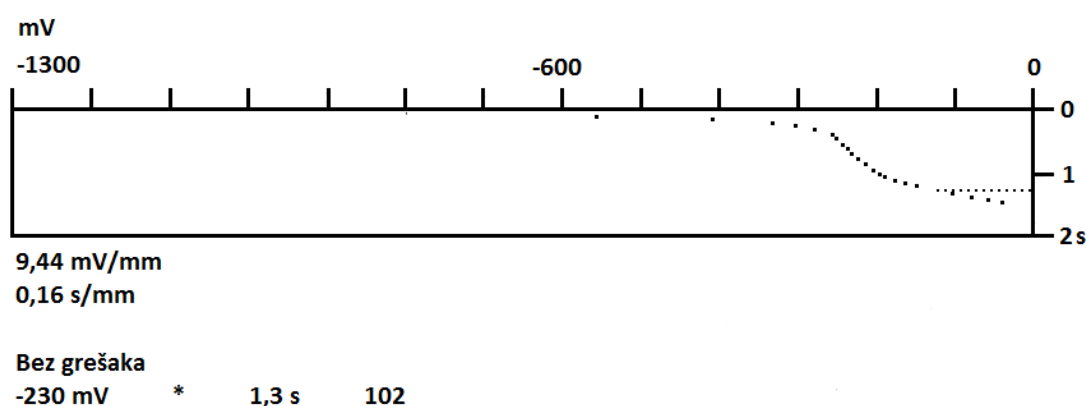
Tabela 31. Optimalni eksperimentalni uslovi za određivanje vitamina B₃ adsorpcionom hronopotenciometrijskom striping analizom.

Parametar	Vrednost
Pomoćni elektrolit	Citratni pufer pH 6, 0,05 mol/l
Potencijal elektrolize	-1,405 V
Struja oksidacije, opseg	1,4 – 15,1 μ A
Vreme elektrolize	15 s u difuzionim uslovima prenosa mase

Uzorci i priprema uzoraka opisani su u poglavlju 3.6. *Uzorci i priprema uzoraka za analizu*. Sadržaj vitamina B₃ je određen metodom kalibracione krive i metodom dvostrukog dodatka standarda. Srednje vrednosti sadržaja vitamina B₃, za tri ponavljanja, dobijene razvijenom metodom i paralelnim HPLC analizama, prikazane su u Tabeli 32.

Statistička procena rezultata je obavljena primenom *t*-testa uparenih vrednosti, uz 95%-tnu verovatnoću. Utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika između rezultata razvijene metode (metoda kalibracione krive) i rezultata HPLC analize ($|t| = 0,17 < t_{\text{kritično}} = 2,78$), kao ni između rezultata razvijene metode (metoda dodatka standarda), i rezultata HPLC analize

($|t| = 0,26 < t_{\text{kritično}} = 2,78$). Ipak, upoređujući vrednosti $|t|$ za jednu i drugu metodu kvantitativnog određivanja, vidi se da je bolje slaganje rezultata dobijenih metodom kalibracione krive, tako da se za kvantitativno određivanje preporučuje ova metoda. Međutim, značajno je i to da se rezultati metode dodatka standarda i metode kalibracione krive dobro slažu ($|t| = 0,04 < t_{\text{kritično}} = 2,78$). Test je pokazao dobro podudaranje i rezultata razvijene metode i deklarisanog sadržaja (za metodu dodatka standarda $|t| = 0,46 < t_{\text{kritično}} = 2,78$ i za metodu kalibracione krive $|t| = 0,35 < t_{\text{kritično}} = 2,78$). Izgled hronopotenciograma dobijenog nakon analize uzorka BKT1 pri prethodno utvrđenim optimalnim uslovima, prikazan je na Slici 40.



Slika 40. Hronopotenciogram vitamina B₃ dobijen analizom uzorka BKT1. $E_{\text{ak}} = -1,405 \text{ V}$;

$$t_{\text{ak}} = 15 \text{ s}; I = 4,9 \mu\text{A}.$$

Tabela 32. Sadržaj vitamina B₃ u multivitaminским dodacima ishrani određen primenom razvijene AdHSA metode i komparativne HPLC metode.

<i>Sadržaj vitamina B₃ (mg/tableti)</i>				
<i>Uzorak</i>	<i>HSA (KK)^a</i>	<i>HSA (MDS)^a</i>	<i>HPLC^a</i>	<i>Deklarisani sadržaj</i>
MVT1	20,50 ± 0,18	20,08 ± 0,04	20,10 ± 0,19	20,00
MVT2	10,16 ± 0,10	11,48 ± 0,03	11,20 ± 0,03	10,00
BKT1	24,64 ± 0,04	25,56 ± 0,08	25,50 ± 0,02	25,00
BKT2	27,63 ± 0,21	20,05 ± 0,20	24,00 ± 0,10	25,00
BKT3	42,85 ± 0,22	48,20 ± 0,05	45,90 ± 0,18	48,00

^aSrednja vrednost ± 2SD, n = 3;

MVT1 i MVT2 – multivitaminски dodaci ishrani u vidu tableta, koji pored kompleksa vitamina B sadrže i vitamine A, D, E i K, kao i mineralne materije; BKT1, BKT2, BKT3 – kompleksi vitamina B, u vidu tableta.

Tačnost razvijene metode, kao i ispravnost postupka pripreme uzoraka, proverene su i primenom testa povrata, tj. *recovery* testa, dvostrukim 'spajkovanjem' uzoraka MVT1 i BKT1, a rezultati su predstavljeni u Tabeli 33.

Tabela 33. Rezultati *recovery* testa vitamina B₃ u uzorcima multivitaminskih dodataka ishrani

Uzorak	Sadržaj pre dodatka standarda (mg/tableti)	Dodati sadržaj standarda (mg/tableti)	Očekivani sadržaj (mg/tableti)	Sadržaj nakon dodatka standarda ^a (mg/tablet)	Recovery (%)
MVT1	20,50	5	25,50	25,62 ± 0,08	102,4
		10	30,50	30,95 ± 0,10	104,5
BKT1	24,65	5	29,65	29,48 ± 0,11	96,6
		10	34,65	34,42 ± 0,15	97,7

^asrednja vrednost ± 2SD, n = 3;

$$\text{Srednja vrednost recovery testa (\%)} = \frac{\text{sadržaj nakon dodatka standarda} - \text{sadržaj pre dodatka standarda}}{\text{dodati sadržaj}} \cdot 100$$

Kao što se u Tabeli 33 može videti, vrednost *recovery* testa se kretala od 96,6% do 104,5%, ukazujući da uticaj matriksa na određivanje vitamina B₃ razvijenom metodom nije značajan i da je postupak pripreme uzoraka odgovarajući.

5. ZAKLJUČCI

- U ovoj doktorskoj disertaciji, razvijene su elektroanalitičke metode za određivanje pojedinih vitamina B grupe. Za određivanje vitamina B₁ i B₃, primenjena je tehnika adsorpcione hronopotenciometrijske stripping analize (AdHSA) na tankoslojnoj živinoj elektrodi kao radnoj elektrodi, a za određivanje vitamina B₂ hronopotenciometrijska analiza (HA) na planarnoj disk elektrodi i elektrodi u vidu procesne posude, obe od staklastog ugljenika.
- Optimizacija metoda podrazumevala je ispitivanje uticaja najznačajnijih eksperimentalnih faktora kao što su vrsta, koncentracija i vrednost pH pomoćnog elektrolita, potencijal akumulacije u AdHSA, početni potencijal u HA, vremena akumulacije i debljine tankoslojne živine elektrode u AdHSA, kao i uticaj struje rastvaranja depozita u AdHSA i redukcione struje u HA. U slučaju određivanja vitamina B₂ primenom radne elektrode u vidu procesne posude od staklastog ugljenika, ispitan je i uticaj aktivne površine radne elektrode na analitički signal vitamina. Validacija metoda obuhvatala je definisanje opsega linearnosti, određivanje vrednosti granice detekcije i granice kvantitativnog određivanja, ocenu preciznosti i ispitivanje interferencija.
- Odgovarajući eksperimentalni uslovi za određivanje vitamina B₁ primenom AdHSA na tankoslojnoj živinoj elektrodi su bili: 0,2 mol/l citratni pufer vrednosti pH 6 kao pomoćni elektrolit, potencijal akumulacije od -1,313 V, vreme akumulacije od 50 s pri difuzionim uslovima prenosa mase i struja rastvaranja depozita u intervalu 1,9 – 6,1 μ A. Dobra linearnost analitičkog signala vitamina B₁ ostvarena je za opseg sadržaja od 5 – 50 mg/l. Reproductivnost metode, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosila je 2,85%. Utvrđena je granica detekcije od 1,64 mg/l. Smetnje od strane vitamina B₂ javljale su se pri njegovoj devetostruko većoj koncentraciji od koncentracije vitamina B₁, a od strane vitamina B₃, tek pri njegovom dvanaestostruko većem sadržaju.
- Usvojeni eksperimentalni parametri za određivanje vitamina B₂ primenom HA na planarnoj disk elektrodi od staklastog ugljenika su bili: 0,025 mol/l hlorovodonična

kiselina kao pomoćni elektrolit, inicijalni potencijal 0,023 V i struja redukcije u opsegu od 0,8 μA do 4,2 μA . Uz odgovarajuće uslove rada, dobijena je dobra linearnost analitičkog signala vitamina za opsege sadržaja 0,2 – 2 mg/l, 2 – 12 mg/l i 10 – 70 mg/l. Reproductivnost metode iznosila je 3,16%, izražena kao RSD, a granica detekcije 0,076 mg/l. Primenom radne elektrode od staklastog ugljenika u obliku procesne posude, ostvarena je granica detekcije od 18 $\mu\text{g/l}$, a relativna osetljivost je povećana za oko 10 puta. Zahvaljujući tome, za analizu je bila dovoljna manja masa realnih uzoraka, čime se interferencije od strane matriksa uzorka mogu značajno smanjiti. Nezavisno od primenjene radne elektrode, selektivnost metode za određivanje vitamina B₂ je bila veoma dobra, odnosno nisu uočene smetnje od strane drugih vitamina, niti od ostalih ispitivanih organskih jedinjenja.

- Odgovarajući eksperimentalni uslovi za određivanje vitamina B₃ primenom AdHSA na tankoslojnoj živinoj elektrodi su bili: 0,05 mol/l citratni pufer vrednosti pH 6, kao pomoćni elektrolit, potencijal elektrolize -1,405 V, vreme elektrolize 15 s pri difuzionim uslovima prenosa mase i struja rastvaranja depozita u intervalu 1,4 – 15,1 μA . Dobra linearnost analitičkog signala vitamina B₃ utvrđena je za intervale sadržaja od 5 – 25 mg/l i od 10 – 100 mg/l. Reproductivnost metode iznosila je 3,90% (RSD), a granica detekcije 2,20 mg/l. Interferencije od strane vitamina B₁ i B₂ se nisu javljale, ako je koncentracija vitamina B₃ bila četverostruko veća od njihovih koncentracija.
- Zahvaljujući ostvarenoj osetljivosti i selektivnosti, razvijene metode su mogle biti primenjene za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₃ u multivitaminским dodacima ishrani. Sadržaji vitamina B₁ i B₃ određivani su metodom kalibracione krive, a vitamin B₂ metodom višestrukog dodatka standarda. Tačnost metoda potvrđena je paralelnim analizama izvedenim primenom visokopritisne tečne hromatografije kao referentne metode, a dobijene vrednosti upoređene primenom *t*-testa uparenih vrednosti, uz 95% verovatnoću. Ispravnost postupka pripreme uzoraka potvrđena je dobrim vrednostima testa povrata koje su se kretale od 88% do 108%.
- Sadržaji vitamina B₂ i B₃ koji su deklarirani na analiziranim proizvodima nisu se statistički značajno razlikovali od onih koji su određeni u tim proizvodima primenom razvijenih metoda. Međutim, deklarirani sadržaj vitamina B₁ je u svim analiziranim uzorcima bio značajno veći (i do 41%) od sadržaja vitamina određenog primenom razvijenih metoda, kao i primenom HPLC. Iako analizirani uzorci nisu bili

reprezentativni, jer su uzorkovani metodom slučajnog izbora, dobijeni rezultati svakako ukazuju na potrebu za detaljnijim ispitivanjima.

- Metode razvije i primenjene u ovoj disertaciji, pored toga što ispunjavaju najznačajnije opšte analitičke zahteve, imaju određene prednosti u odnosu na konkurentne metode, kada su u pitanju specifični zahtevi. Cena instrumentaije i cena eksploatacije su znatno niže, priprema uzoraka za analizu je jednostavna, zbog jednostavnosti i brzine metode su pogodne za rutinske analize, i na kraju, tokom izvođenja analiza ne postoji mogućnost zagađenja okoline.

6. LITERATURA

Aboul-Kasim, E. (2000). Anodic adsorptive voltammetric determination of the vitamin B₁ (thiamine). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22, 1047-1054.

Ali, H.I., Ashida, N. & Nagamatsu, T. (2008). Antitumor studies. Part 4: design, synthesis, antitumor activity, and molecular docking study of novel 2-substituted 2-deoxoflavin-5-oxides, 2-deoxoalloxazine-5-oxides, and their 5-deaza analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 922-940.

Anisimova, L.S., Mikheeva, E.V. & Slipchenko, V.F. (2001). Voltammetric Determination of riboflavin in vitaminized supplements and feeds. *Journal of Analytical Chemistry* 56, 658-662.

AOAC, 1981. *Journal of Association of Official Analytical Chemist* 64, 1336.

AOAC, 1975. *Journal of Association of Official Analytical Chemist* 58, 799.

AOAC, 1970. *Journal of Association of Official Analytical Chemist* 53, 53.

Augelli, M.A., Munoz, R.A.A., Richter, E.M., Cantagallo, M.I. & Angnes, L. (2007). Analytical procedure for total mercury determination in fishes and shrimps by chronopotentiometric stripping analysis at gold film electrodes after microwave digestion. *Food Chemistry* 101, 579-584.

Ball, G.F.M. (2006). *Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability and Stability*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Bai, J., Ndamaniha, J.C., Liu, L., Yang, L. & Guo, L. (2010). Voltammetric detection of riboflavin based on ordered mesoporous carbon modified electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry* 14, 2251-2256.

Bandžuchová, L., Šelešovská, R., Navrátil, T., Chýlková, J. & Novotný, L. (2012). Voltammetric monitoring of electrochemical reduction of riboflavin using silver solid amalgam electrodes. *Electrochimica Acta* 75, 316-324.

Baranski, A. & Galus, Z. (1971). Interfering chemical oxidation in the chronopotentiometric oxidation of amalgams. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 30, 219-224.

Baś, B., Jakubowska, M. & Górski, L. (2011). Application of renewable silver amalgam annular band electrode to voltammetric determination of vitamins C, B₁ and B₂. *Talanta* 84, 1032-1037.

Bodiga, V.L., Bodiga, S., Surampudi, S., Boindala, S., Putcha, U., Nagalla, B., Subramaniam, K. & Manchala, R. (2012). Effect of vitamin supplementation on cisplatin-induced intestinal epithelial cell apoptosis in Wistar/NIN rats. *Nutrition* 28, 572-580.

Bohrer, D., do Nascimento, P.C., Ramirez, A.G., Mendonça, J.K.A., de Carvalho, L.M. & Pomblum, S.C.G. (2004). Determination of thiamine in blood serum and urine by high-performance liquid chromatography with direct injection and post-column derivatization. *Microchemical Journal* 78, 71-76.

Brahman, P.K., Dar, R.A. & Pitre, K.S. (2016). Adsorptive stripping voltammetric study of vitamin B₁ at multi-walled carbon nanotube paste electrode. *Arabian Journal of Chemistry* 9, 1889-1896.

Brahman, P.K., Dar, R.A. & Pitre, K.S. (2013). DNA-functionalized electrochemical biosensor for detection of vitamin B₁ using electrochemically treated multiwalled carbon nanotube paste electrode by voltammetric methods. *Sensors and Actuators B* 177, 807-812.

Brainina, K.Z. & Vdovina, V.M. (1972). Sravnitelnye vozmozhnosti inversionnykh metodov elektrokimicheskogo analiza. *Zavodsk. Lab.* 38, 1043-1052.

Brezo, T., Stojanović, Z., Suturović, Z., Kravić, S., Kos, J. & Đurović, A. (2015). Simple, rapid and selective Chronopotentiometric Method for the Determination of riboflavin in pharmaceutical preparations using a glassy carbon electrode. *Acta Chimica Slovenica* 62, 923-931.

Calhau, C., Faria, A., Keating, E. & Martel, F. Interaction of Polyphenols with the Intestinal and Placental Absorption of some Nutrients and other Compounds. In *Polyphenols in Human Health and Disease*, No. 1; © 2014 Elsevier Inc; pp 523-536.

- Callmer, K. & Davies, L. (1974). Separation and determination of vitamin B₁, B₂, B₆ and nicotinamide in commercial vitamin preparations using high performance cation exchange chromatography. *Chromatographia* 7, 644-650.
- Chen, P. & Wolf, W.R. (2007). LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 2441-2448.
- Cimpoi, C. & Hosu, A. (2007). Thin Layer Chromatography for the Analysis of Vitamins and Their Derivatives. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 30, 701-728.
- Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Spano, N. & Sanna, G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta* 83, 924-929.
- Combert, E. & Buckton, C. (2019). Micronutrient deficiencies, vitamin pills and nutritional supplements. *Medicine* 47, 145-151.
- Combs, Jr., G.F. & McClung, J.P. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health (5th ed.). Academic Press, © 2017 Elsevier Inc.
- Combs, G.F. Riboflavin. In *The Vitamins (Fourth Edition)*. © 2012 Elsevier Inc; pp 79-102.
- Çakir, S., Atayman, I., & Çakir, O. (1997). Simultaneous square-wave voltammetric determination of riboflavin and folic acid in pharmaceutical preparations. *Mikrochimica Acta* 126, 273-240.
- Đurović, A. (2018). Razvoj metoda za hronopotenciometrijsko određivanje odabranih pesticida u vodi. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- De Vries, W.T. & van Dalen, E. (1964). Theory of anodic stripping voltammetry with a plane, thin mercury film electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 8, 366-377.
- De Vries, W.T. (1965). Exact treatment of anodic stripping voltammetry with a plane mercury film electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 9, 448-452.
- Đurović, A., Stojanović, Z., Kravić, S., Grahovac, N., Bursić, V., Vuković, G. & Suturović, Z. (2016). Development and Validation of Chronopotentiometric Method for Imidacloprid Determination in Pesticide Formulations and River Water Samples. *International Journal of Analytical Chemistry* 2016, 1-11.

- Economou, A. & Fielden, P.R. (1995). A study of riboflavin determination by square wave adsorptive stripping voltammetry on mercury film electrodes. *Electroanalysis* 7, 447-453.
- Ensafi, A.A., Heydari-Bafrooei, E. & Amini, M. (2012). DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 31, 376-381.
- Eskilsson, H. & Haraldsson, C. (1987). Reductive stripping chronopotentiometry for selenium in biological materials with a flow system. *Analytica Chimica Acta* 198, 231-237.
- Fatima, Z., Jin, X., Zou, Y., Kaw, H.Y., Quinto, M. & Li, D. (2019). Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*. Article in press. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.025>
- Food Fortification Initiative: Enhancing Grains for Healthier Lives. www.fffnetwork.org
- FAO/WHO 1994. *Codex Alimentarius* 4, 2nd edition.
- Gentili, A. & Caretti, F. Analysis of vitamins by liquid chromatography. In *Liquid chromatography: applications*; Fanali, S., Haddad, P.R., Poole, C.F., Schoenmakers, P. & Lloyd, D., Eds.; Copyright © 2013 Elsevier Inc.; pp 477-517.
- Gierst, L. & Juliard, A. (1953). Non-steady state electrolysis under forced current. *The Journal of Physical Chemistry* 57, 701-706.
- Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology* 1, 138-146.
- Gratacós-Cubarsí, M., Sárraga, C., Clariana, M., Garcia Regueiro, J.A. & Castellari, M. (2011). Analysis of vitamin B₁ in dry-cured sausages by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and diode array detection. *Meat Science* 87, 234-238.
- Graulet, B. & Girard, C.L. B Vitamins in Cow Milk: Their Relevance to Human Health. In *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*; © 2017 Crown Copyright and Elsevier Inc; pp 211-224.
- Gribat, L.C., Babauta, J.T., Beyenal, H. & Wall, N.A. (2017). New rotating disc hematite film electrode for riboflavin detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 798, 42-50.

Gu, H.-Y., Yu, A.-M. & Chen, H.-Y. (2001). Electrochemical behavior and simultaneous determination of vitamin B₂, B₆, and C at electrochemically pretreated glassy carbon electrode. *Analytical Letters* 34, 2361-2374.

Gui, J.Y., Kahn, B.E., Laguren-Davidson, L., Lin, C.-H., Lu, F., Salaita, G.N., Stern, D.A. & Hubbard, A.T. (1989). Comparison of vacuum-annealed and electrochemically cycled electrodes in adsorption and electrocatalysis: aromatic compounds at platinum (111) and polycrystalline platinum. *Langmuir* 5, 819-825.

Halma, M., Doumèche, B., Hecquet, L., Prévot, V., Mousty, C. & Charmantray, F. (2017). Thiamine biosensor based on oxidative trapping of enzyme-substrate intermediate. *Biosensors and Bioelectronics* 87, 850-857.

Hampel, D., York, E.R. & Allen, L.H. (2012). Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. *Journal of Chromatography B* 903, 7-13.

Hajian, A., Rafati, A.A., Afraz, A. & Najafi, M. (2014). Electrosynthesis of high-density polythiophene nanotube arrays and their application for sensing of riboflavin. *Journal of Molecular Liquids* 199, 150-155.

Hassan, S.S.M. & Elnemma, E. (1989). Selective determination of thiamine (vitamin B₁) in pharmaceutical preparations by direct potentiometric argentometric titration with use of the silver-silver sulphide ion-selective electrode. *Talanta* 36, 1011-1015.

Horányi, G. (1990). A radiotracer study of the adsorption and electrocatalytic reduction of nicotinic acid at a platinized platinum electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 284, 481-489.

Hucker, B., Wakeling, L. & Vriesekoop, F. (2011). The quantitative analysis of thiamin and riboflavin and their respective vitamers in fermented alcoholic beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12278-12285.

Huiliang, H., Hua, C., Jagner, D. & Renman, L. (1988). Computerized flow constant-current stripping analysis for nickel (II) and cobalt (II) with carbon fibre and modified carbon fibre electrodes. *Analitica Chimica Acta* 208, 237-246.

Hutton, E., Hočevnar, S., Ogorevc, B. & Smith, M. (2003). Bismuth film electrode for simultaneous adsorptive stripping analysis of trace cobalt and nickel using constant current chronopotentiometric and voltammetric protocol. *Electrochemistry Communications* 5, 765-769.

ICH (1996): Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH.

Jabbar, A., Shaila, S., Mahmood, A.J. & Mannan, R.J. (2016). Voltammetric evidences for the interaction of riboflavin with cadmium in aqueous media. *Journal of Saudi Chemical Society* 20, 158-164.

Jain, R.K. & Gaur, H.C. (1997). Chronopotentiometry: A review of theoretical principles. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 79, 211-236.

Jakobsen, J. (2008). Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamin, and riboflavin in food samples by use of HPLC. *Food Chemistry* 106, 1209-1217.

Jenčo, J., Krčmová, L.K., Solichová, D. & Solich, P. (2017). Recent trends in determination of thiamine and its derivatives in clinical practice. *Journal of Chromatography A* 1510, 1-12.

Jiang, X. & Sun, T. (2007). Indication ion square wave voltammetric determination of thiamine and ascorbic acid. *Analytical Letters* 40, 2589-2596.

Jin, P., Xia, L., Li, Z., Che, N., Zou, D. & Hu, X. (2012). Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in vitamins with minerals tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70, 151-157.

Juarez del Valle, M., Laiño, J.E., Savoy de Giori, G. & LeBlanc, J.G. (2014). Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. *Food Research International* 62, 1015-1019.

Jurkiewicz-Herbich, M. (1992). Adsorption of nicotinic acid at the mercury-solution interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 332, 265-278.

Kabanova, L., Goncharev, Y.A. & Doronin, A. N. (1978). Anodic stripping voltammetry and chronopotentiometry of copper at a rotating carbon disk electrode. *Analitica Chimica Acta* 102, 91-97.

Kadara, R.O., Haggett, B.G.D. & Birch, B.J. (2006). Disposable sensor for measurement of vitamin B₂ in nutritional premix, cereal, and milk powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4921-4924.

Kemula, W. & Strojek, J.W. (1966). Controlled chronopotentiometric stripping of metals deposited on the hanging mercury-drop electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 12, 1-8.

Kemula, W. & Saha, S. (1979). Microcoulometric determination of trace amounts of mercury and oxygen in aqueous solutions using the hanging mercury drop electrode (HMDE). *Journal of Electroanalytical Chemistry* 100, 939-946.

Koop, J., Monschein, S., Macheroux, E.P., Knaus, T. & Macheroux, P. (2014). Determination of free and bound riboflavin in cow's milk using a novel flavin-binding protein. *Food Chemistry* 146, 94-97.

Kotkar, R.M., Desai, P.B. & Srivastava, A.K. (2007). Behavior of riboflavin on plain carbon paste and aza macrocycles based chemically modified electrodes. *Sensors and Actuators B* 124, 90-98.

Körner, R.W., Vierzig, A., Roth, B. & Müller, C. (2009). Determination of thiamin diphosphate in whole blood samples by high-performance liquid chromatography – a method suitable for pediatric diagnostics. *Journal of Chromatography B* 877, 1882-1886.

Kropp, J.L. Fluorometry. In *Systematic Materials Analysis*; Richardson, J.H., & Peterson, R.V., Eds.; Copyright ©1974 Elsevier Inc; pp 225-253.

Kusube, K., Abe, K., Hiroshima, O., Ishiguro, Y., Ishikawa, S. & Hoshida, H. (1983). Electrochemical derivatization of thiamine in a flow injection system – application to thiamine analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 31, 3589-3594.

Lahély, S., Bergaentzlé, M. & Hasselman, C. (1999). Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Food Chemistry* 65, 129-133.

Langer, S. & Lodge, J.K. (2014). Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: a comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in a breakfast cereal matrix. *Journal of Chromatography B* 960, 73-81.

van Leeuwen, H.P. & Town, R.M. (2007). Adsorptive stripping chronopotentiometry (AdSCP). Part 1: Fundamental features. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 610, 9-16.

Linus Pauling Institute, Oregon State University, Micronutrient Information Center, Vitamins, Niacin. Copyright 2000-2019. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/niacin>

Ly, S.Y., Yoo, H.S., Ahn, J.Y. & Nam, K.H. (2011). Pico molar assay of riboflavin in human urine using voltammetry. *Food Chemistry* 127, 270-274.

Mamatov, G., Papoff, P. & Delahay, P. (1957). Anodic stripping voltammetry with mercury electrodes. Potential-step and current-step methods. *Journal of American Chemical Society* 70, 4034-4040.

Marjanović, N. (2001). Instrumentalne metode analize: I/1. Metode razdvajanja. Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet.

Markopoulou, C.K., Kagkadis, K.A. & Koundourellis, J.E. (2002). An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B₁, B₆, B₁₂ in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30, 1403-1410.

Martin, C.B., Tsao, M.L., Hadad, C.M. & Platz, M.S. (2002). The reaction of triplet flavin with indole. A study of the cascade of reactive intermediates using density functional theory and time resolved infrared spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 124, 7226-7234.

Martínez, R.C., Domínguez, F.B., García, I.M.S., Méndez, J.H., Orellana, R.C. & Guzmán, R.S. (1996). Electrochemical response of a polypyrrole-dodecylsulphate electrode with multicharged cations and vitamins B₁ and B₆. Application as a microsensor in flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 336, 47-56.

Masek, A., Chrzescijanska, E., Zaborski, M. & Maciejewska, M. (2012). Characterisation of the antioxidant activity of riboflavin in an elastomeric composite. *Comptes Rendus Chimie* 15, 524-529.

Mellado, J.M.R. & Montoya, M.R. (1994). CEC mechanisms in the electroreduction of α -dicarbonyl compounds on mercury electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 365, 71-78.

Moldoveanu, S.C. & David, V. Basic Information about HPLC. In *Essentials in Modern HPLC Separations*. Copyright © 2013 Elsevier Inc, pp 1-51.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. & Rodwell, V.W. (2013). Harper's illustrated biochemistry (26th ed.). United States of America. McGraw-Hill Companies.

Muthusankar, G., Rajkumar, C., Chen, S.-M., Karkuzhali, R., Gopu, G., Sangili, A., Sengottuvelan, N. & Sankar, R. (2019). Sonochemical driven simple preparation of nitrogen-doped carbon quantum dots/SnO₂ nanocomposite: A novel electrocatalyst for sensitive voltammetric determination of riboflavin. *Sensors & Actuators: B Chemical* 281, 602-612.

Nath, A., Shope, T.R. & Koch, T.R. Thiamine (Vitamin B₁) After Weight Loss Bariatric Surgery. In *Metabolism and Pathophysiology of Bariatric Surgery*; Copyright © 2017 Elsevier Inc.; pp 479-489.

Nezamzadeh-Ejhieh, A. & Pouladsaz, P. (2014). Voltammetric determination of riboflavin based on electrocatalytic oxidation at zeolite-modified carbon paste electrodes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20, 2146-2152.

Ndaw, S., Bergaentzlé, M. & Hasselman, C. (2002). Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. *Food Chemistry* 78, 129-134.

Oni, J., Westbroek, P. & Nyokong, T. (2001). Voltammetric detection of vitamin B₁ at carbon paste electrodes and its determination in tablets. *Electroanalysis* 14, 1165-1168.

Parham, H., Zargar, B. & Khoshnam, F. (2015). Ultrasonic-assisted solid-phase extraction pre-concentration and determination of nicotinamide and nicotinic acid by high-

performance liquid chromatography using anthracite. *Food Analytical Methods* 8, 2235-2242.

Pedero, P.S. & Fonseca, J.M.L. (1972). Analytical application of the cobalt (II) catalytic pre-wave in the presence of thiamine in its disulphide form. *Analyst* 97, 81-86.

Petteys, B.J. & Frank, E.L. (2011). Rapid determination of vitamin B₂ (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clinica Chimica Acta* 412, 38-43.

Perone, S.P. & Davenport, K.K. (1966). Application of mercury-plated graphite electrodes to voltammetry and chronopotentiometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 12, 269-276.

Perone, S.P. & Brumfield, A. (1967). Theoretical and experimental study of anodic stripping voltammetry with mercury-plated graphite electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 13, 124-131.

Pires, A.R., Araújo, A.N., Conceição, B.S.M., Montenegro, M., Chocholous, P. & Solich, P. (2008). New ionophores for vitamin B₁ and vitamin B₆ potentiometric sensors for multivitamin control. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46, 683-691.

Prasad, B.B., Singh, R. & Singh, K. (2017). Development of highly electrocatalytic and electroconducting imprinted film using Ni nanomer for ultra-trace detection of thiamine. *Sensors and Actuators B* 246, 38-45.

Qijin, W., Nianjun, Y., Haili, Z., Xinpin, Z. & Bin, X. (2001). Voltammetric behavior of vitamin B₂ on the gold electrode modified with a self-assembled monolayer of L-cysteine and its application for the determination of vitamin B₂ using linear sweep stripping voltammetry. *Talanta* 55, 459-467.

Reilley, C.N. & Stumm, W. (1962). Progress in polarography, Vol. 1. Zuman, P., Kolthoff, I. M., Eds.; Wiley-Interscience, New York.

Renman, Z., Jagner, D. & Berglund, R. (1986). Computer system and flow cell for automated potentiometric and constant-current stripping analysis. *Analytica Chimica Acta* 188, 137-150.

- Riman, D., Avgeropoulos, A., Hrbac, J. & Prodromidis, M.I. (2015). Sparked-bismuth oxide screen-printed electrodes for the determination of riboflavin in the sub-nanomolar range in non-deoxygenated solutions. *Electrochimica Acta* 165, 410-415.
- Riso, R., Pernet-Coudried, B., Waeles, M. & Le Corre, P. (2007). Dissolved iron analysis in estuarine and coastal waters by using a modified adsorptive stripping chronopotentiometric (SCP) method. *Analytica Chimica Acta* 598, 235-241.
- Rodríguez-Amaro, R., Pérez, R., López, V. & Ruiz, J.J. (1990). Study of the electrochemical reduction of nicotinic acid at a mercury electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 278, 307-322.
- Rufa, A. & Rosini, F. Gastrointestinal Surgery and Wernicke Encephalopathy. In *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*; © 2015 Elsevier Inc.; pp 539-549.
- Safavi, A., Maleki, N., Ershadifar, H. & Tajabadi, F. (2010). Development of a sensitive and selective riboflavin sensor based on carbon ionic liquid electrode. *Analytica Chimica Acta* 674, 176-181.
- Sand, H.J.S. (1901). On the concentrations on the electrodes in a solution with special reference to the liberation of hydrogen by electrolysis of a mixture of copper sulphate and sulphuric acid. *Philosophical Magazine* 1, 45-49.
- Santiago, M., & Strobel, S. Thin Layer Chromatography. In *Methods in Enzymology Vol. 533*. Copyright © 2013 Elsevier Inc.
- Sá, É.S., da Silva, P.S., Jost, C.L. & Spinelli, A. (2015). Electrochemical sensor based on bismuth-film electrode for voltammetric studies on vitamin B₂ (riboflavin). *Sensors and Actuators B* 209, 423-430.
- Shiu, K.-K. & Shi, K. (2000). Selective determination of vitamin B₂ at electrochemically activated glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 12, 134-139.
- Siddiqui, I. & Pitre, K.S. (2001). Voltammetric determination of vitamins in a pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26, 1009-1015.
- Simson, C. (1978). Practical High Performance Liquid Chromatography. Heyden and Son, London and Tonbridge.

- Slepchenko, G.B., Anisimova, L.S., Slipchenko, V.F., Mikheeva, E.V. & Pikula, N.P. (2005). Voltammetric quality control of bioactive additives: determination of B₁, B₂, C, E vitamins and quercetin. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 39, 166-168.
- Stanković, D.M., Kuzmanović, D., Mehmeti, E. & Kalcher, K. (2016). Sensitive and selective determination of riboflavin (vitamin B₂) based on boron-doped diamond electrode. *Monatshefte für Chemie* 147, 995-1000.
- Stern, D.A., Languren-Davidson, L., Frank, D.G., Gui, J.Y., Lin, C.-H., Lu, F., Salaita, G.N., Walton, N., Zapien, D.C. & Hubbard, A.T. (1989). Potential-dependent surface chemistry of 3-pyridinecarboxylic acid (niacin) and related compounds at Pt (111) electrodes. *Journal of American Chemical Society* 111, 877-891.
- Stojanović, Z., Švarc-Gajić, J., Vitas, J., Malbaša, R. & Lončar, E. (2013). Direct chronopotentiometric method for ascorbic acid determination in fermented milk products. *Journal of Food Composition and Analysis* 32, 44-50.
- Stojanović, Z. & Švarc-Gajić, J. (2011). A simple and rapid method for histamine determination in fermented sausages by mediated chronopotentiometry. *Food Control* 22, 2013-2019.
- Stojanović, Z. (2011). Elektrohemijsko određivanje histamina. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Strmečki, S. & Plavšić, M. (2012). Adsorptive transfer chronopotentiometric stripping of sulphated polysaccharides. *Electrochemistry Communications* 18, 100-103.
- Sutton, J. & Shabangi, M. (2004). Activation of the electrochemical properties of thiamine and its phosphate esters in acidic solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 571, 283-287.
- Suturović, Z. (2003). Elektrohemijska stripping analiza. Monografija, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Suturović, Z. & Marjanović, N. (2002). Chronopotentiometric analysis of tocopherols using a glassy carbon vessel as the working electrode. *Microchemical Journal* 72, 131-135.

Suturović, Z. & Marjanović, N. (1999). Chronopotentiometric study tocopherol in vegetable oils. *Electroanalysis* 11, 207-209.

Suturović, Z., Marjanović, N. & Dokić, P. (1997). Determination of Chloride by Stripping Chronopotentiometry with Silver-Film Electrode. *Electroanalysis* 9, 572-574.

Suturović, Z., Marjanović, N. & Jankovits, I. (1992). Chronopotentiometric stripping analysis of silver using a glassy carbon disc electrode. *Journal of Serbian Chemical Society* 57, 187-193.

Švarc-Gajić, J. (2006). Hronopotenciometrijska striping analiza žive na staklastom ugljeniku. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Švorc, L., Rievaj, M. & Bustin, D. (2013). Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: Determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B* 181, 294-300.

Thomas, F.G. & Henze, G. (2001). Introduction to Voltammetric Analysis Theory and Practice. Collingwood: Csiro Publishing.

Tiong, S.A., Chandra-Hioe, M.V. & Arcot, J. (2015). Thiamine fortification of bread-making flour: retention in bread and levels in Australian commercial fortified bread varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* 38, 27-31.

Tyszczyk-Rotko, K. (2012). New voltammetric procedure for determination of thiamine in commercially available juices and pharmaceutical formulation using a lead film electrode. *Food Chemistry* 134, 1239-1243.

Vergara, T., Marín, D. & Vera, J. (1980). Polarographic determination of thiamine and its monophosphate and pyrophosphate esters. *Analytica Chimica Acta* 120, 347-251.

Villamil, M.J.F., Miranda Ordieres, A.J., Costa García, A. & Tuñón Blanco, P. (1993). Simultaneous adsorptive stripping voltammetric determination of riboflavin and folic acid in multivitamin preparations. *Analytica Chimica Acta* 273, 377-382.

Wan, Q., Yang, N. & Ye, Y. (2002). Electrochemical behavior of thiamine on a self-assembled gold electrode and its square-wave voltammetric determination in pharmaceutical preparations. *Analytical Sciences* 18, 413-416.

- Wang, J. (1985). Stripping Analysis. VCH Publishers, Inc., Deerfield Beach.
- Wang, J., Luo, D.B., Farias, P.A.M. & Mahmoud, J.S. (1985). Adsorptive stripping voltammetry of riboflavin and other flavin analogs at the static mercury drop electrode. *Analytical Chemistry* 57, 158-162.
- Wang, X., Yang, N. & Wan, Q. (2006). Cyclic voltammetric response of nicotinic acid and nicotinamide on a polycrystalline gold electrode. *Electrochimica Acta* 52, 361-368
- Wollenberger, A. (1945). A catalytic effect of thiamine at the dropping mercury electrode. *Science* 101, 386-388.
- Westmacott, K.L., Crew, A., Doran, O. & Hart, J.P. (2018). A novel electroanalytical approach to the measurement of B vitamins in food supplements based on screen-printed carbon sensors. *Talanta* 181, 13-18.
- Willems, G. & Neeb, R.Z. (1969). Ein Verfahren zur synchronisation polarographischer messvorgänge mit der Tropfzeit. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 21, 69-76.
- Wu, S.-H., Sun, J.-J., Lin, Z.-B., Wu, A.-H., Zeng, Y.-M., Guo, L., Zhang, D.-F., Dai, H.-M. & Chen, G.-N. (2007). Adsorptive stripping analysis of riboflavin at electrochemically heated graphite cylindrical electrodes. *Electroanalysis* 19, 2251-2257.
- Yang, N. & Wang, X. (2008). Thin self-assembled monolayer for voltammetrically monitoring nicotinic acid in food. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 61, 277-281.
- Yang, Y., Boysen, R.I. & Hearn, M.T.W. (2013). Selectivity differences of water-soluble vitamins separated on hydrophilic interaction stationary phases. *Journal of Separation Science* 36, 1897-1903.
- Zhang, G.H., Imato, T., Asano, Y., Sonoda, T., Kobayashi, H. & Ishibashi, N. (1990). Vitamin B₁ sensitive poly(vinyl chloride) membrane electrode based on hydrophobic tetraphenylborate derivatives and their application. *Analytical Chemistry* 62, 1644-1648.
- Zón, M.A., Angulo, M. & Mellado, J.M.R. (1994). Study of the reduction mechanism of the N-oxides of pyridine monocarboxylic acids at mercury electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 365, 213-220.

Spisak skraćenica

Acetil-coA	Acetil koenzim A
AdHSA	Adsorpciona hronopotenciometrijska striping analiza
AdVSA	Adsorpciona voltometrijska striping analiza
AMP	Adenozin-monofosfat
ATP	Adenozin-3-fosfat
Au-MA	Zlatna elektroda modifikovana merkaptoacetatnom kiselinom
BiSPE	Grafitna štampana elektroda modifikovana bizmutom (<i>Bismut graphite Screen-Printed Electrode</i>)
BR-pufer	Britton-Robinson pufer
Cys/SAM/Au	Zlatna elektroda modifikovana spontano formiranim slojem L-cisteina (<i>Self-Assembled Electrode of L-Cysteine</i>)
CPE	Elektroda od ugljenične paste (<i>Carbon Paste Electrode</i>)
CV	Ciklična voltometrija
DAD	Detektor sa fotoosetljivim diodama (Diode Array Detector)
DNA-CNT	Elektroda od ugljenične paste modifikovana nanocevčicama i imobilisana sa DNK (<i>DNA-immobilised Carbon Nanotube mixed paste elektrode</i>)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DPAdSV	Diferencijalno pulsna adsorpciona striping voltometrija
DPASV	Diferencijalno pulsna anodna striping voltometrija
DPV	Diferencijalno pulsna voltometrija
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FD	Fluorimetrijski detektor
FMN	Flavin mononukleotid
GABA	γ -aminobuterna kiselina
GCE	Elektroda od staklastog ugljenika (<i>Glassy Carbon Electrode</i>)
HA	Hronopotenciometrijska analiza
HILIC-hromatografija	Tečna hromatografija hidrofилnih interakcija (<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
HPLC	Visokopritisna tečna hromatografija (High Pressure Liquid Chromatography)
HPTLC	Tankoslojna hromatografija visokih preformansi (<i>High-Performance Thin Layer Chromatography</i>)
HSA	Hronopotenciometrijska striping analiza
LOD	Granica detekcije (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Granica kvantitativnog određivanja (<i>Limit of quantitation</i>)
MDE	Živina elektroda u obliku kapi (<i>Mercury Drop Electrode</i>)
MFE	Tankoslojna živina elektroda (<i>Mercury Film Electrode</i>)
MIP-PGE	Grafitna elektroda modifikovana molekulski obeleženim polimerima (<i>Molecularly Imprinted Polimers modified Pencil Graphite Electrode</i>)
MnPc-CPE	Elektroda od ugljenične paste modifikovana mangan ftalocijaninom (<i>Carbon Paste Electrode modified with manganese phthalocyanine</i>)
MS	Masena spektrometrija
MWCNPE	Elektroda od ugljenične paste modifikovana višezidnim ugljeničnim nanocevčicama (<i>Multi Walled Carbon Nanotube Paste Electrode</i>)
NAC	Nikotinska kiselina
NA	Nikotinamid
NAD	Nikotinamid adenindinuleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PbFE	Tankoslojna olovna elektroda (<i>Lead Film Electrode</i>)
RF-hromatografija	Reversno-fazna hromatografija

TDP	Tiamin-difosfat
TMP	Tiamin-monofosfat
TPP	Tiamin-pirofosfat
TTP	Tiamin-trifosfat
RSD	Relativna standardna devijacija
Sukcinil-coA	Sukcinil koenzim A
SD	Standardna devijacija
SWAdSV	Adsorpciona striping voltometrija sa pravougaonim impulsima
SWASV	Anodna striping voltometrija sa pravugaonim impulsima (<i>Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry</i>)
SWV	Voltometrija sa pravugaonim impulsima (<i>Square-Wave Voltammetry</i>)

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Tanja Brezo-Borjan
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Zvonimir Suturović, redovni profesor
Naslov rada: NR	Određivanje vitamina B ₁ , B ₂ i B ₃ primenom hronopotencijometrije i hronopotencijometrijske striping analize
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	(6 poglavlja / 161 stranica / 40 slika / 33 tabele / 3 šeme / 143 literaturna navoda)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Vitamin B ₁ , vitamin B ₂ , vitamin B ₃ , hronopotenciometrija, hronopotenciometrijska striping analiza, multivitaminski dodaci ishrani
UDK	577.164.1:543.554.8:543.067(043.3)
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>U okviru ove doktorske disertacije razvijene su elektroanalitičke metode za određivanje pojedinih vitamina B grupe. Za određivanje vitamina B₁ i B₃ primenjena je adsorpciona hronopotenciometrijska striping analiza (AdHSA) na tankoslojnoj živinoj elektrodi kao radnoj elektrodi, dok je za određivanje vitamina B₂ primenjena hronopotenciometrijska analiza (HA) na dvema geometrijski različitim elektrodama od staklastog ugljenika: planarnoj disk elektrodi i elektrodi u vidu procesne posude. U cilju optimizacije metoda ispitan je uticaj najznačajnijih eksperimentalnih faktora. Optimalni eksperimentalni uslovi za određivanje vitamina B₁ su podrazumevali primenu 0,2 mol/l citratnog pufera vrednosti pH 6 kao pomoćnog elektrolita, potencijala i vremena akumulacije od -1,313 V i 50 s, redom, i struje rastvaranja depozita od 1,9 – 6,1 μA. Odgovarajući eksperimentalni faktori za određivanje vitamina B₂ su bili: 0,025 mol/l HCl kao pomoćni elektrolit, inicijalni potencijal od 0,023 V i struja redukcije od 0,8 – 4,2 μA, dok su optimalni radni uslovi za određivanje vitamina B₃ obuhvatali primenu 0,05 mol/l citratnog pufera pH 6, potencijala akumulacije od -1,405 V pri vremenu akumulacije od 15 s, i struji rastvaranja u intervalu od 1,4 – 15,1 μA. U slučaju određivanja vitamina B₂ primenom radne elektrode u vidu procesne posude ispitan je i uticaj aktivne površine radne elektrode na analitički signal vitamina B₂. Optimalna vrednost aktivne površine radne elektrode iznosila je 13,4 cm². Pod optimalnim eksperimentalnim uslovima, dolazilo je do elektrooksidacije molekula vitamina B₁ i B₃ na tankoslojnoj živinoj elektrodi u analitičkom koraku, dok se vitamin B₂ redukovao na elektrodama od staklastog ugljenika. U okviru validacije metoda definisani su opsezi linearnosti, određene su vrednosti granice detekcije i granice kvantitativnog određivanja, ocenjena je preciznost i ispitane su interferencije. Uz odgovarajuće uslove rada, dobijena je dobra linearnost analitičkog signala od sadržaja za sva tri ispitivana vitamina. Ostvarene su granice detekcije od 1,64 mg/l za vitamin B₁, 0,076 mg/l za vitamin B₂ uz primenu planarne disk elektrode i 0,018 mg/l (vitamin B₂) uz primenu procesne</p>

posude od staklastog ugljenika kao radne elektrode. Ostvarena granica detekcije za vitamin B₃ je iznosila 2,20 mg/l. Nakon optimizacije i validacije, razvijene metode HA i AdHSA primenjene su za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₃ u komercijalnim multivitaminским dodacima ishrani i multivitaminским instant napicima. Tačnost razvijenih metoda je potvrđena paralelnim analizama izvedenim primenom visokopritisne tečne hromatografije.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: dr Zorica Stojanović, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom sadu mentor: dr Zvonimir Suturović, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu član: dr Jovana Kos, naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	
Author: AU	Tanja Brezo-Borjan
Mentor: MN	dr Zvonimir Suturović, Full profesor
Title: TI	Determination of vitamin B ₁ , B ₂ and B ₃ by means of chronopotentiometry and chronopotentiometric stripping analysis
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	6 chapters / 161 pages / 40 figures / 33 tables / 3 schemes / 143 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Food engineering
Subject, Key words SKW	Vitamin B ₁ , vitamin B ₂ , vitamin B ₃ , chronopotentiometry, chronopotentiometric stripping analysis, multivitamin supplements
UC	577.164.1:543.554.8:543.067(043.3)
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	-
Abstract: AB	<p>Within the scope of this doctoral dissertation, electroanalytical methods for the determination of several vitamins of the B-complex are developed. For the determination of vitamin B₁ and B₃ adsorptive chronopotentiometric stripping analysis was applied, with mercury film electrode as the working electrode. For vitamin B₂ determination, the chronopotentiometric analysis was performed on two geometrically different glassy carbon working electrodes: the planar disc electrode and the process vessel electrode. The most important experimental parameters of the analysis were investigated and optimized. For vitamin B₁ determination, the optimized experimental conditions were: 0,2 mol/l citrate buffer pH 6 as the supporting electrolyte, accumulation potential of -1,313 V, accumulation time of 15 s and the oxidation current between 1,9 μA and 6,1 μA. The appropriate experimental factors for vitamin B₂ determination included 0,025 mol/l HCl solution (supporting electrolyte), initial potential of 0,023 V and reduction current in the range from 0,8 – 4,2 μA, whereas the optimal working parameters for vitamin B₃ determination were as follows: 0,05 mol/l citrate buffer pH 6, accumulation potential of -1,405 V, accumulation time of 15 s and dissolution current from 1.4 – 15.1 μA. When the process vessel was used as the working electrode, the optimal volume of the analyzed solution i.e. the active surface area of the electrode was optimized. The optimal value of the active surface area was 13,4 cm². As well, under the optimal experimental conditions, vitamin B₁ and vitamin B₃ underwent electrooxidation process in the analytical step, whereas vitamin B₂ was electrochemically reduced on glassy carbon electrodes. A validation procedure of the optimized methods was performed by evaluation of the following parameters: linearity, the limit of detection (LOD), the limit of quantitation (LOQ), precision, selectivity, and accuracy. Under optimal working conditions, the linearity of the proposed methods was very good. The achieved limits of detection were 1.64 mg/l for vitamin B₁, 0,076 mg/l for vitamin B₂ (planar disc electrode) and 0,018 mg/l (process vessel electrode) and 2,2 mg/l for vitamin B₃.</p> <p>After optimization and validation procedures, the developed methods were applied for vitamin B₁, B₂, and vitamin B₃ determination in commercially available multivitamin supplements and instant multivitamin beverages. The accuracy of the proposed methods was tested by parallel HPLC analyses of the same samples.</p>
Accepted on Senate on: AS	

Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: dr Zorica Stojanović, Assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>mentor: dr Zvonimir Suturović, Full profesor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>member: dr Jovana Kos, Research associate, Institute of Food Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p>