

Kvalitativno i kvantitativno određivanje vitamina B1, B2 i B6 uporabom HPLC-DAD tehnike

Perica, Petra Božena

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:267395>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE VITAMINA B₁, B₂ I B₆
UPORABOM HPLC-DAD TEHNIKE

ZAVRŠNI RAD

PETRA BOŽENA PERICA

Matični broj: 397

Split, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE VITAMINA B₁, B₂ I B₆
UPORABOM HPLC-DAD TEHNIKE

ZAVRŠNI RAD

PETRA BOŽENA PERICA

Matični broj: 397

Split, rujan 2021.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF VITAMINS B₁, B₂
AND B₆ USING HPLC-DAD**

BACHELOR THESIS

PETRA BOŽENA PERICA

Parent number: 397

Split, September 2021.

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Tema rada: je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE VITAMINA B₁, B₂ I B₆ UPORABOM HPLC-DAD TEHNIKE

Petra Božena Perica, 397

Sažetak:

Završni rad opisuje razvoj i optimizaciju te vrednovanje metode kvantitativnog i kvalitativnog određivanja vitamina B₁, B₂ i B₆ u prahu i kapsulama pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornost spregnute s detektorom s nizom dioda.

U istraživanju je korišten radni standard vitamina B kompleksa od kojeg su pripravljene matične otopine korištene za optimizaciju metode određivanja vitamina B₁, B₂ i B₆ pomoću tekućinskog kromatografa s DAD spektrom kao detektorom.

Kao otapalo izbora za B kompleks izabrana je smjesa acetonitrila i ultračiste vode + 0,3% fosforne kiseline u omjeru 10:90. Stacionarna faza je kolona s C18 punilom. Ispitane značajke vrednovanja koje uključuju specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu određivanja i dokazivanja i robusnost dale su zadovoljavajuće vrijednosti.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s detektorom s nizom dioda je prikladna tehnika za kvantitativno i kvalitativno određivanje vitamina B₁, B₂ i B₆ u prahu i kapsulama. Razvijena metoda je vrednovana čime je osigurana njena prikladnost za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₆.

Ključne riječi: vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, tekućinska kromatografija, vrednovanje, HPLC-DAD

Rad sadrži: 31 stranica, 18 slika, 15 tablica, 20 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | | |
|----|-----------------------------------|---------------|
| 1. | doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun | - predsjednik |
| 2. | izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević | - član |
| 3. | doc. dr. sc. Franko Burčul | - član-mentor |

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6.

Mentor: Assistant professor Franko Burčul, PhD

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF VITAMINS B₁, B₂ AND B₆ USING HPLC-DAD

Petra Božena Perica, 397

Summary:

The bachelor thesis describes development, optimization and validation of the method for quantitative and qualitative determination of vitamins B₁, B₂ and B₆ in powder and capsules by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector.

The study used a standard of vitamin B complex from which main solutions were used to optimize a method of determination of vitamins B₁, B₂ and B₆ using a liquid chromatograph with DAD spectrometry as detector.

The solvent of choice for B complex was a mixture of acetonitrile and ultra-pure water + 0.3 % phosphoric acid in a ratio of 10:90. Stationary phase was column with C18 filler. Tested validation parameters including specificity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification and detection, stability and robustness resulted with adequate values.

High performance liquid chromatography coupled to a diode array detector is a suitable technique for the quantitative and qualitative determination of vitamins B₁, B₂ and B₆ in powder and capsules. The method has been validated to ensure its suitability for the determination of vitamins B₁, B₂ and B₆.

Key words: vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, liquid chromatography, validation, HPLC-DAD

Thesis contains: 31 pages, 18 figures, 15 tables, 20 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assistant Professor Lea Kukoč Modun, PhD - chair person
2. Associate Professor Ivica Blažević, PhD - member
3. Assistant Professor Franko Burčul, PhD - supervisor

Defence date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Ovaj rad izrađen je na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu, na Zavodu za analitičku kemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula, u razdoblju od siječnja do rujna 2021. godine.

Srdačno zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu na velikoj pomoći pri izradi završnog rada, savjetima i strpljivosti.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali studentske dane.

I najveće zahvale mojoj obitelji koji su mi omogućili studiranje i bili podrška tijekom cijelog dosadašnjeg studiranja, a posebno mom djedu koji je uvijek vjerovao u mene.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Razvoj i optimizacija analitičke metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje vitamina B₁, B₂ i B₆ korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnutom s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD);
- Odabrati prikladnu pokretnu fazu i gradijent za mjerenje;
- Optimizacija određenih parametara tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti-stacionarna i mobilna faza;
- Ispitivanje specifičnosti, linearnosti, točnosti i iskorištenja, granice određivanja i dokazivanja, preciznosti metode i robusnosti;

SAŽETAK

Završni rad opisuje razvoj i optimizaciju te vrednovanje metode kvantitativnog i kvalitativnog određivanja vitamina B₁, B₂ i B₆ u prahu i kapsulama pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornost spregnute s detektorom s nizom dioda.

U istraživanju je korišten radni standard vitamina B kompleksa od kojeg su pripravljene matične otopine korištene za optimizaciju metode određivanja vitamina B₁, B₂ i B₆ pomoću tekućinskog kromatografa sa DAD spektrom kao detektorom.

Kao otapalo izbora za B kompleks izabrana je smjesa acetonitrila i ultračiste vode + 0,3% fosforne kiseline u omjeru 10:90. Stacionarna faza je kolona s C18 punilom. Ispitane značajke vrednovanja koje uključuju specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu određivanja i dokazivanja i robusnost dale su zadovoljavajuće vrijednosti.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s detektorom s nizom dioda je prikladna tehnika za kvantitativno i kvalitativno određivanje vitamina B₁, B₂ i B₆ u prahu i kapsulama. Razvijena metoda je vrednovana čime je osigurana njena prikladnost za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₆.

Ključne riječi: vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, tekućinska kromatografija, vrednovanje, HPLC-DAD

SUMMARY

The bachelor thesis describes development, optimization and validation of the method for quantitative and qualitative determination of vitamins B₁, B₂ and B₆ in powder and capsules by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector.

The study used a standard of vitamin B complex from which main solutions were used to optimize a method of determination vitamins B₁, B₂ and B₆ using a liquid chromatograph with DAD spectrometry as detector.

The solvent of choice for B complex was a mixture of acetonitrile and ultra-pure water + 0,3 % phosphoric acid in a ratio of 10:90. Stationary phase was column with C18 filler. Tested validation parameters including specificity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification and detection, stability and robustness resulted with adequate values.

High performance liquid chromatography coupled to a diode array detector is a suitable technique for the quantitative and qualitative determination of vitamins B₁, B₂ and B₆ in powder and capsules. The method has been validated to ensure its suitability for the determination of vitamins B₁, B₂ and B₆.

Key words: vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, liquid chromatography, validation, HPLC-DAD

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Vitamini	1
1.2. Vitamini B kompleksa	1
1.2.1. Vitamin B ₁ (tiamin)	1
1.2.2. Vitamin B ₂ (riboflavin)	2
1.2.3. Vitamin B ₆ (piridoksin).....	3
1.3. Kromatografija.....	3
1.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	4
1.3.2. Kromatografski parametri	6
1.4. Vrednovanje analitičke metode	9
2. Materijali i metode	11
2.1. Korištene kemikalije i oprema.....	11
2.2. Odabir otapala.....	12
2.3. Priprema otopina za HPLC analizu	12
2.3.1. Priprema standardnih otopina.....	12
2.3.2. Priprema otopine kapsule	12
2.4. Tekućinski kromatograf (HPLC-DAD).....	14
3. Rezultati	15
3.1. Izbor otapala	15
3.2. Optimizacija HPLC metode.....	15
3.2.1. Odabir stacionarne faze	15
3.2.2. Odabir otapala u mobilnoj fazi.....	15
3.2.3. Parametri HPLC metode	17
3.3. Vrednovanje metode.....	17
3.3.1. Specifičnost	17
3.3.2. Linearnost.....	20
3.3.3. Granica određivanja i dokazivanja.....	23
3.3.4. Točnost metode	24
3.3.5. Preciznost	25
3.3.6. Robusnost.....	26
4. Rasprava	27
4.1. Optimizacija parametra metode.....	27
4.2. Vrednovanje metode.....	28
5. Zaključak.....	29
6. Literatura	30

1. UVOD

1.1. Vitamini

Vitamini su skupina organskih spojeva koji su u malim količinama neophodni za normalan rast i razvoj ljudskog i životinjskog tijela. Oni ispunjavaju specifične i vitalne funkcije u metabolizmu, a njihov nedostatak ili višak dovodi do vrlo specifičnih bolesti.^[1]

U ljudskoj prehrani je poznato trinaest vitamina, a moguće ih je klasificirati u dvije velike skupine: vitamini koji su topljivi u mastima (vitamini A, D, E, K) i vitamini koji su topljivi u vodi (vitamin C i vitamini B kompleksa).

Ponekad, količina vitamina koje dobivamo putem hrane nije dovoljna, stoga je potrebno uzimati dodatke prehrani u obliku multivitaminskih pripravaka.

1.2. Vitamini B kompleksa

Vitamin B je koenzim koji katalizira pretvorbu ugljikohidrata do energije, biosinteze DNA i masnih kiselina u organizmu te sudjeluje u sintezi crvenih krvnih stanica.^[2]

Vitamini koji čine B kompleks su: B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin), B₅ (pantotenska kiselina), B₆ (piridoksin), B₇ (biotin), B₉ (folna kiselina), B₁₂ (kobalamin). Organizam sam ne sintetizira vitamine B skupine, stoga ih je potrebno uzimati prehranom ili putem dodataka prehrani (multivitaminskih pripravaka).

Najveći izvor vitamina B su meso, jaja i mliječni proizvodi. Prerađeni ugljikohidrati, poput šećera i brašna imaju malu količinu vitamina B upravo zbog prerade. Ostali izvori vitamina B su mahunarke, cjelovite žitarice, krumpir, banane, prehrambeni i pivski kvasac. Iako pivski kvasac daje pivu potrebne količine vitamina B, zbog velike količine etanola vitamini tiamin, riboflavin, niacin, biotin i folna kiselina se inhibiraju. Velike količine piva mogu dovesti do deficita tih vitamina.

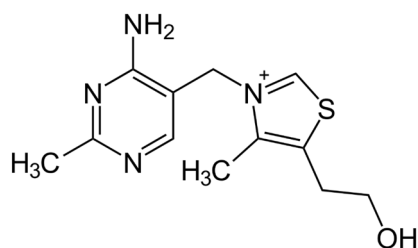
Nedostatak vitamina B se odražava u obliku umora, iscrpljenosti, slabog pamćenja, naglog mršavljenja, osipa, ispućanih usana i depresije.^[3]

1.2.1. Vitamin B1 (tiamin)

Tiamin sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata, aminokiselina, masti, alkohola i glukoze. Široko je rasprostranjen u hrani, čak i u većim količinama nije toksičan.^[4]

Manjak tiamina (bolest zvana beri – beri) je rasprostranjena kod ljudi na Dalekom Istoku jer se u velikoj mjeri prehranjuju rižom kojoj je uklonjena opna bogata tiaminom te kod alkoholičara. Nedostatak utječe na živčani sustav i mišiće.

Tiamin je organska molekula koja je sastavljena od pirimidinskog i tiazolnog prstena povezanih metilenskim mostom. (Slika 1.). Bijeli igličasti prah koji je dobro topljiv u vodi, glicerolu i metanolu, a netopljiv u benzenu, acetonu i etanolu.



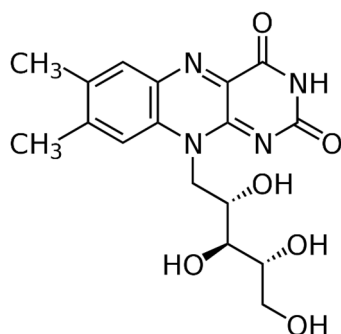
Slika 1. Struktura tiamina^[5]

1.2.2. Vitamin B₂ (riboflavin)

Riboflavin sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata kao esencijalni koenzim u oksidacijsko – redukcijским ravnotežama. Potreban je za obnavljanje svih stanica u tijelu, posebno eritrocita.^[6]

Glavni izvori su jetra, jaja i mlijeko, u velikim količinama nije toksičan, a nedostatak se očituje kroz probavne promjene, ispucane usne, žarenja na koži te neurološkim poremećajima.

Riboflavin je narančasto - žuti prah gorkog okusa, slabo topljiv u vodi, a netopljiv u nepolarnim otapalima. Sastoji se od supstituiranog izoaloksazinskog prstena (flavina) i D-ribitilnog bočnog lanca. Derivat je 7,8-dimetilizoaloksazina s alkoholom, ribitolom, vezanim na dušik u položaju 10. (Slika 2.)^[6]

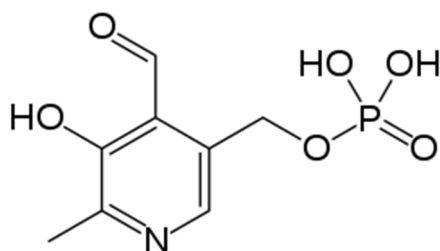


Slika 2. Struktura riboflavina^[7]

1.2.3. Vitamin B₆ (piridoksin)

Osim piridoksina vitamin B₆ se može naći i u obliku piridoksala i piridoksamina, u organizmu se sva tri oblika pretvaraju u aktivni oblik piridoksal fosfat. Piridoksal fosfat je kofaktor koji je uključen u procesu transaminacije aminokiselina i glikogenolize.

Bijeli igličasti prah koji se lako topi u vodi, a teže u kloroformu, alkoholu i eteru. Široko je rasprostranjen u hrani, a njegov nedostatak je rijedak.^[8]



Slika 3. Struktura piridoksina^[9]

1.3. Kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja tvari na temelju njihove različite raspodjele između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne faze).^[10]

Postoji više podjela kromatografskih tehnika, a jedna od osnovnih je na temelju ostvarivanja kontakta između stacionarne i mobilne faze, prema kojoj razlikujemo plošnu i kolonsku kromatografiju.

- **Plošna kromatografija** – stacionarna faza je kromatografski papir, a mobilna neka tekućina. Razlikujemo tankoslojnu i papirnu plošnu kromatografiju;
- **Kolonska kromatografija** – stacionarna faza se nalazi u uskoj cjevčici (koloni) kroz koju mobilna faza prolazi pod utjecajem gravitacije ili tlaka.

Zatim imamo podjelu i na temelju agregatnog stanja mobilne faze:

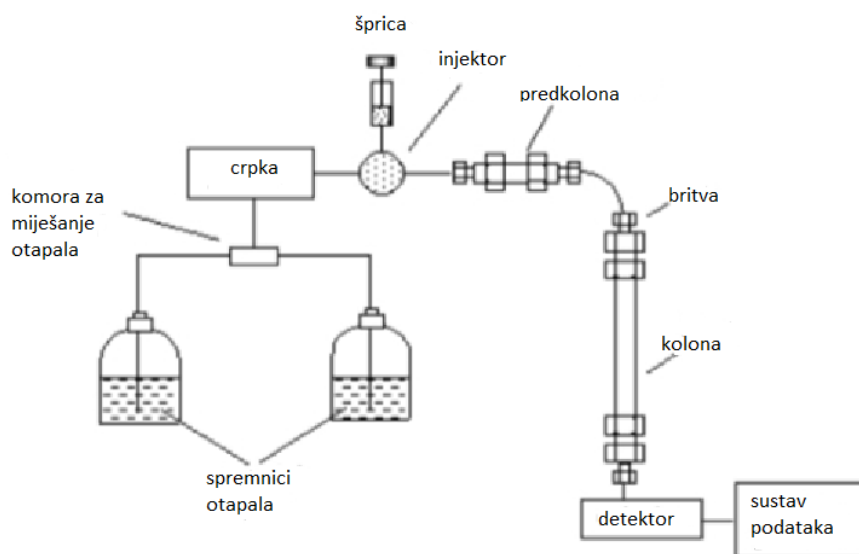
- **Plinska kromatografija** - mobilna faza je inertni plin (He, Ar, N₂), a stacionarna faza nehlapljiva tekućina koja je nanescena na kruti nosač;
- **Tekućinska kromatografija** – mobilna faza je tekućina male viskoznosti, a stacionarnu fazu čine čestice određenih dimenzija i kemijskih karakteristika koje ispunjavaju kolonu;
- **Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima** – mobilna faza je gusti plin iznad svoje kritične temperature i tlaka.^[10]

S obzirom na prirodu ravnoteže između mobilne i stacionarne faze razlikujemo:

- **Razdjelnu kromatografiju** – ravnoteža se uspostavlja između dviju tekućina, što znači da je i stacionarna faza tekućina vezana za čvrsti inertni nosač. Mobilna faza može biti i plin
- **Adsorpcijsku kromatografiju** – ravnoteža se uspostavlja između plina ili tekućine u mobilnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze
- **Afinitetnu kromatografiju** – na površini čvrste faze nalaze se različite funkcijske skupine s definiranim prostornim rasporedom. Do vezivanja dolazi zbog interakcije molekule s vezanim ligandom na površini stacionarne faze
- **Kromatografiju ionskom izmjenom** – stacionarna faza je najčešće ionska smola, a pokretna faza je tekućina
- **Kromatografiju isključenjem** – stacionarna faza je materijal s porama definiranih dimenzija (molekulsko sito). Odjeljivanje se temelji na razlici u molekulskim masama i volumenu^[11]

1.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija je iznimno važna s obzirom na to da se većina spojeva ne može prevesti u plinoviti oblik ili nisu stabilni pa ih nije moguće odijeliti plinskom kromatografijom. Tekućinska kromatografija se zasniva na uporabi kolona velikih promjera i korištenjem gravitacije ili malo većim tlakom za prolazak mobilne faze. Brzina raspodjele komponenata između mobilne i stacionarne faze je kontrolirana difuzijom, a difuzija kod tekućina je sporija u odnosu na plinove. Zbog toga mjerenja traju jako dugo. Svi ovi nedostaci su doveli do razvoja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC).^[12] Shema HPLC uređaja je prikazana na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz HPLC uređaja^[13]

Osnovni dijelovi HPLC-a su: spremnici mobilne faze, dio za injektiranje uzorka, kolona, crpka i detektor.

U komori za miješanje otapala umješavaju se otapala za pokretnu fazu. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u kombinaciji (npr. voda, metanol, organska otapala). Voda može sadržavati i neki pufer, kako bi se poboljšalo razdvajanje. Mobilnu fazu čine čista otapala bez suspendiranih čestica ili otopljenih plinova. Kako bi taj uvjet bio ispunjen otapala prolaze kroz mikroporozni filter i otplinjač koji uklanja potencijalno prisutne plinove. Kada se taj proces završi čisto otapalo crpka prenosi dalje kroz sustav. Mobilna faza može biti izokratna (sastav mobilne faze je jednak tijekom trajanja mjerenja) ili gradijentna (sastav mobilne faze se mijenja tijekom mjerenja). Crpka služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom ($0.1-10 \text{ ml min}^{-1}$) u kolonu. Sam uzorak se unosi mikrolitarskom špricom u sustav za unošenje uzorka tzv. petlju. Sustav za unošenje uzorka omogućava unošenje različitih volumena uzorka u pokretnu fazu. Otapalo prolazi kroz petlju te ulazi zajedno s uzorkom na kolonu. Kolona je najčešće cijev izrađena od nerđajućeg čelika, duljine 250 mm, a unutarnjeg dijametra 4.6 mm, punjena česticama veličine 5 ili 10 μm . U koloni dolazi do razdvajanja sastojaka uzorka te oni u različitom vremenu stižu na detektor. Kolona je jedna od najvažnijih komponenti HPLC uređaja i zbog se često oprema s pretkolonom stavlja ispred kolone kako bi produžila vijek trajanja glavne kolone. Na glavnoj koloni se temeljem različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi, razdjeljuju komponente uzorka

koji se potom eluiraju i odlaze do detektora, nakon čega se prosljeđuju u otpadni spremnik. [13]

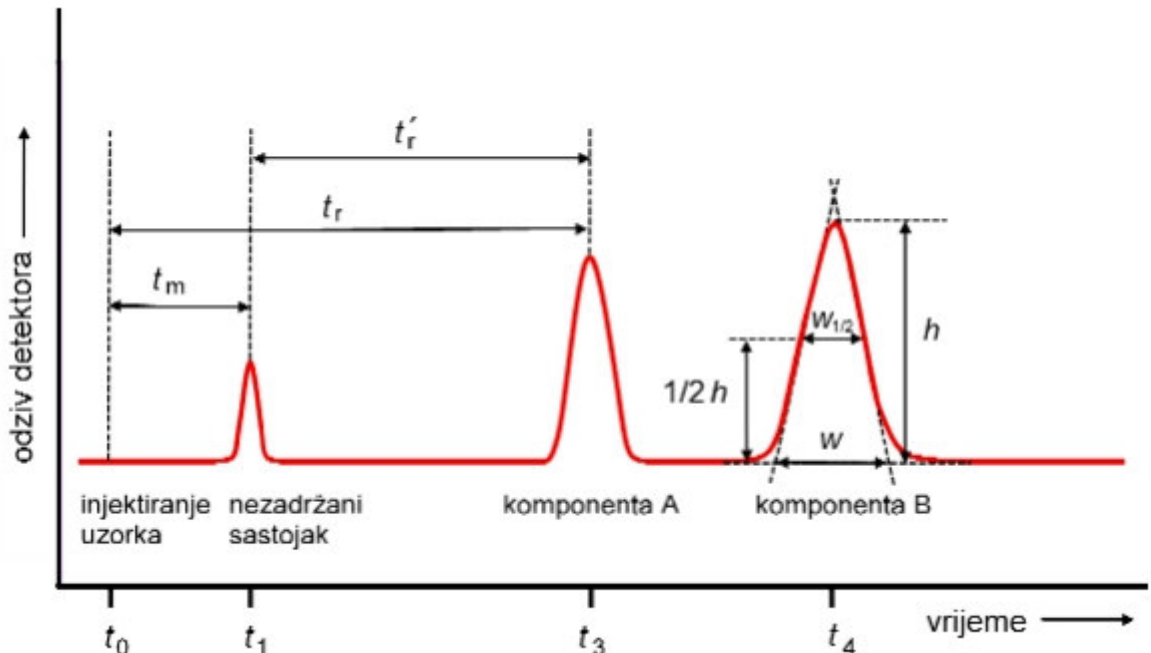
Detektor ima važnu ulogu detekcije komponenti koje izlaze iz stupca nakon eluiranja. Najčešće se koriste detektori: UV/Vis detektor s nizom (poljem) dioda (engl. *diode-array detector*, DAD) koji snimaju cijeli spektar eluiranog analita u UV/Vis području. Još se koriste i fluorescencijski detektori (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektori (engl. *electrochemical detector*, ED), detektori indeksa loma (engl. *refractive index detector*, RID) te detektori raspršenja svjetla u uparenom uzorku (engl. *evaporative light-scattering detector*, ELSD).

1.3.2. Kromatografski parametri

Prilikom razvoja metode optimiziraju se slijedeći parametri: temperatura, pH-vrijednost, volumen mobilne faze i tlak.

Kromatogram je grafički prikaz odnosa koncentracije u eluatu prema volumenu eluata ili vremenu. [14]

Položaj pika koristi se za identifikaciju određene tvari, a površina ispod pika je proporcionalna koncentraciji te tvari u uzorku.



Slika 5. Shematski prikaz kromatograma uzorka s dvije komponente^[10]

t_m predstavlja nezadržano vrijeme, t_r ukupno vrijeme zadržavanja, t'_r prilagođeno vrijeme zadržavanja, h visinu kromatografske krivulje, $\frac{1}{2}h$ polovinu visine kromatografske krivulje, w širinu kromatografske krivulje u osnovici, $w_{1/2}$ širinu kromatografske krivulje u polovici visine^[12]

Vrijeme zadržavanja je najvažniji kromatografski parametar.

Ukupno vrijeme zadržavanja, (engl. *retention time*, t_r) karakteristično je za svaku komponentu, a predstavlja vrijeme koje je potrebno od injektiranja uzorka do njenog maksimalnog odziva.

Nezadržano vrijeme, (engl. *void time*, t_m) je vrijeme potrebno nezadržanoj komponenti mobilne faze da prođe kroz kolonu. Koristi se za računanje prilagođenog vremena zadržavanja, (engl. *adjusted retention time*, t_r') koje predstavlja vrijeme koje je potrebno razmatranoj komponenti da dođe do detektora nakon što je nezadržavana komponenta stigla na detektor. Računa se kao razlika ukupnog vremena zadržavanja i nezadržanog vremena.

$$t_r' = t_r - t_m \quad (1)$$

Faktor zadržavanja (engl. *retention factor*, k') pokazuje koliko se puta zadržana komponenta zadržala u odnosu na nezadržanu.

$$k' = \frac{t_r'}{t_m} \quad (2)$$

Što je faktor zadržavanja veći, to je komponenta više vezana za stacionarnu fazu i duže se eluira.

Da bi se odijelile dvije komponente, njihove brzine prolaska kroz kolonu moraju biti različite. Faktor odjeljivanja (engl. *separation factor*, α) predstavlja omjer faktora zadržavanja dviju komponenti u uzorku.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (3)$$

Omjer mora biti veći od 1 da bismo mogli reći da su dvije komponente razdvojene.

Teorijski tavan je virtualni pojam koji predstavlja uspostavljanje ravnoteže analita između mobilne i stacionarne faze. Brojem teorijskih tavana se opisuje djelotvornost kromatografske kolone:

$$N = \frac{L}{H} \quad (4)$$

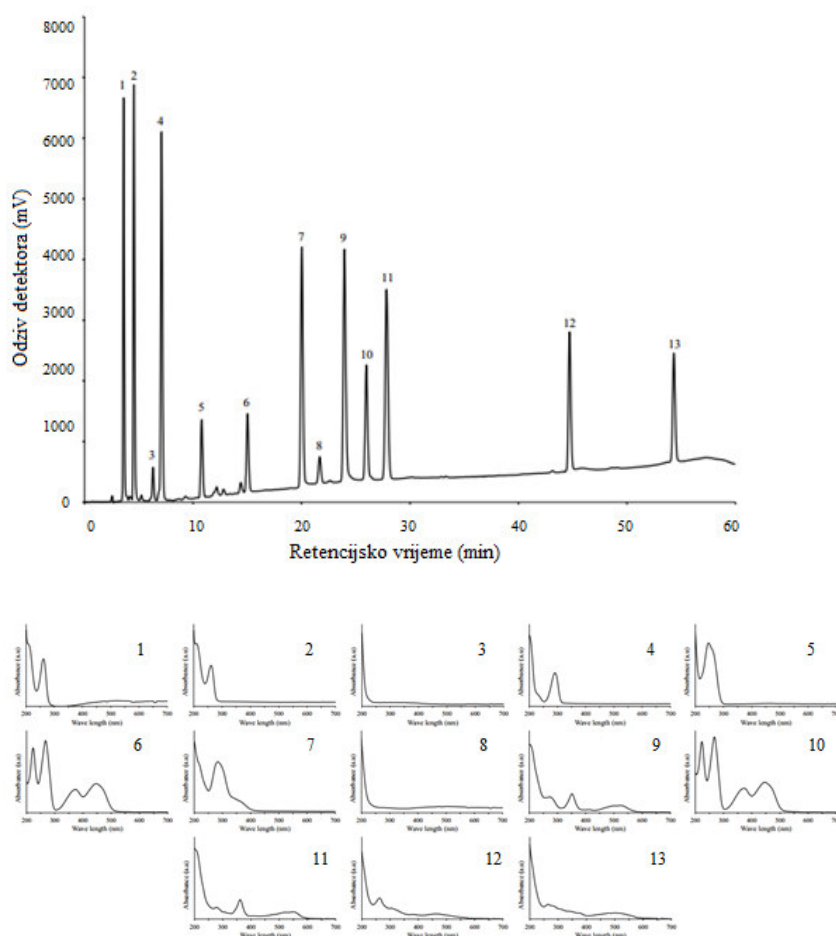
gdje N predstavlja broj teorijskih tavana (engl. *plate number*), L duljinu kolone, a H visinu teorijskih tavana.

Na istoj kromatografskoj koloni za različite analite broj teorijskih tavana može biti različit. Što je veći broj tavana, odnosno manja visina tavana kromatografska krivulja je uža, a djelotvornost kolone veća. Broj teorijskih tavana se može dobiti i iz sljedeće jednadžbe:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{w}\right)^2 \quad (5)$$

Razlučivanje (engl. *resolution*, R_s) je stupanj odjeljivanja dvaju susjednih pikova kromatograma, a definirano je kao omjer razlike vremena zadržavanja komponenti i prosječne širine pika na baznoj liniji.^[15] Što je R_s veći uspješnije je odjeljivanje komponenti.

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2} \quad (6)$$



Slika 6. Primjer kromatograma ovisnog o retencijsom vremenu i odzivu detektora i UV-Vis spektri za vitamine B kompleksa^[2]

(1-niacin, 2-niacinamid, 3-pantotenska kiselina, 4-piridoksin, 5-tiamin, 6-RMP, 7-folna kiselina, 8-biotin, 9-hidroksikobalamin, 10-riboflavin, 11-cijanokobalamin, 12-adenozinkobalamin, 13-metilkobalamin)

1.4. Vrednovanje analitičke metode

Vrednovanjem analitičke metode ispituje se je li neka analitička metoda prikladna za određivanje analita u zadanom uzorku. Vrednovanje mora sadržati sve bitne podatke o analitičkom procesu određivanja. Uzima u obzir sve čimbenike koji utječu na rezultat koje laboratorij mora proučiti te ukloniti ili barem smanjiti učinak značajnih čimbenika.

Nazivlje analitičkih značajki koje se ispituju prilikom vrednovanja metode:

- **Točnost** (engl. *accuracy*) prikazuje podudaranje mjerene vrijednosti s očekivanom
- **Preciznost** (engl. *precision*) opisuje slaganje između dvaju ili više rezultata mjerenja izvedenih na potpuno isti način. Izražava se standardnim odstupanjem, varijacijom te relativnim standardnim odstupanjem^[12]
- **Ponovljivost** (engl. *repeatability*) je preciznost u kojem isti analitičar koristeći iste instrumente u istom laboratoriju dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na ispitivanim uzorcima
- **Srednja preciznost** (engl. *intermediate precision*) predstavlja neslaganja rezultata mjerenja unutar laboratorija u nekom neodređenom vremenskom periodu, a koja su posljedica promjene uvjeta, analitičara ili instrumenta.
- **Obnovljivost** (engl. *reproducibility*) predstavlja preciznost između rezultata mjerenja drugih laboratorija
- **Specifičnost** (engl. *specificity*) je sposobnost određivanja analita od interesa u prisutnosti drugih komponenti za koje se očekuje da će biti prisutne
- **Granica dokazivanja** (engl. *detection limit*) je najmanja izmjerena vrijednost veličine kojom se može dokazati prisutnost analita^[16]
- **Granica određivanja** (engl. *quantitation limit*) je najmanja masa ili koncentracija analita kojoj se sadržaj može valjano odrediti uz prethodno utvrđenu razinu podudarnosti^[17]
- **Linearnost** (engl. *linearity*) je dio krivulje umjeravanja u kojoj je zabilježeni signal proporcionalan količini analita u uzorku
- **Raspon** (engl. *range*) je udaljenost između najviše i najniže koncentracije analita u uzorku za koju metoda pokazuje preciznost, točnost i linearnost

- **Robusnost** (engl. *robustness*) je podložnost analitičke metode na promjene uvjeta ispitivanja u odnosu na različitost vrste uzoraka, analita, uvjete pohrane, uvjeta okoliša i/ili uvjeta pripreme uzoraka pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jest ili uz utvrđene manje izmjene^[18]
- **Osjetljivost** (engl. *sensitivity*) je svojstvo metode da reagira na minimalne promjene mjerene veličine

2. Materijali i metode

2.1. Korištene kemikalije i oprema

U tablici 2.1. i 2.4. su prikazani standardi, realni uzorci i korištene kemikalije

Tablica 2.1. Popis standarda i korištenih uzoraka B kompleksa

Naziv	Proizvođač
B kompleks (direktna energija) Standard 2,1 g	Natural Wealth, SAD
Plivit B Forte 0,446 g	Pliva, Hrvatska

Tablica 2.2. Popis deklarirane količine sadržaja B kompleksa (Natural Wealth, SAD)

Naziv	Količina
Vitamin B ₁	2,2 mg
Vitamin B ₂	2,8 mg
Vitamin B ₆	2,8 mg
Vitamin B ₁₂	5 µg
Pantotenska kiselina	12 µg
Folna kiselina	400 µg

Tablica 2.3. Popis deklarirane količine sadržaja Plivit B Forte (Pliva, Hrvatska)

Naziv	Količina
Vitamin B ₁	15 mg
Vitamin B ₂	15 mg
Vitamin B ₃	15 mg
Vitamin B ₅	25 mg
Vitamin B ₆	10 mg
Vitamin B ₇	150 µg
Vitamin B ₉	450 µg
Vitamin B ₁₂	10 µg

Tablica 2.4. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač	CAS broj	Čistoća
Acetonitril	CH ₃ CN	Honeywell	75-05-8	HPLC
Fosforna kiselina, min 85%	H ₃ PO ₄	Kemika	7664-38-2	p.a
Ultra čista voda, Tip I	H ₂ O	Purelab Flex 3* (Elga, UK)	S06369	p.a

*Purelab Flex 3 je aparatura za purifikaciju vodovodne vode do ultra čiste vode (Tip I), Elga, UK

2.2. Popis korištene opreme:

- Analitička vaga – AT261 DeltaRange (Mettler Toledo, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj RK 52 – (Bandelin Sonorex, Njemačka)
- Tacta mehaničke pipete – (Sartorius, Njemačka)
- HPLC-DAD uređaj - Ultimate 3000 (Thermo Scientific, SAD)

2.3. Odabir otapala

Prije mjerenja i podešavanja uvjeta potrebno je izabrati otapalo u kojem se B kompleks može otopiti. Pošto je izabrana tvar namijenjena za izravnu oralnu primjenu, kao otapalo je korištena destilirana voda.

2.4. Priprema otopina za HPLC analizu

2.4.1. Priprema standardnih otopina

Izvagano je 6 g standarda B kompleksa na analitičkoj vagi te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopunjeno otapalom do oznake. Za učinkovitije otapanje je korištena ultrazvučna kupelj. Nakon ultrazvučne kupelji otopinu je profiltrirala kroz mikrofilter *Chromafil Xtra MV - 45/25 0,45 μm* (Macherey-Nagel, Njemačka). Razrjeđivanjem su pripravljene otopine sljedećih koncentracija: 0,1 g/mL, 0,2 g/mL, 0,3 g/mL, 0,4 g/mL, 0,5 g/mL, 0,6 g/mL, 0,7 g/mL, 0,8 g/mL, 0,9 g/mL.

2.4.2. Priprema otopine kapsule

Sadržaj kapsule je izvagan i kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL koja je nadopunjena otapalom do oznake. Tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 1 minutu. Sadržaj je profiltriran te je 1 mL otopine analita preneseno *Sartorius* pipetom u mjerne posudice (viale).



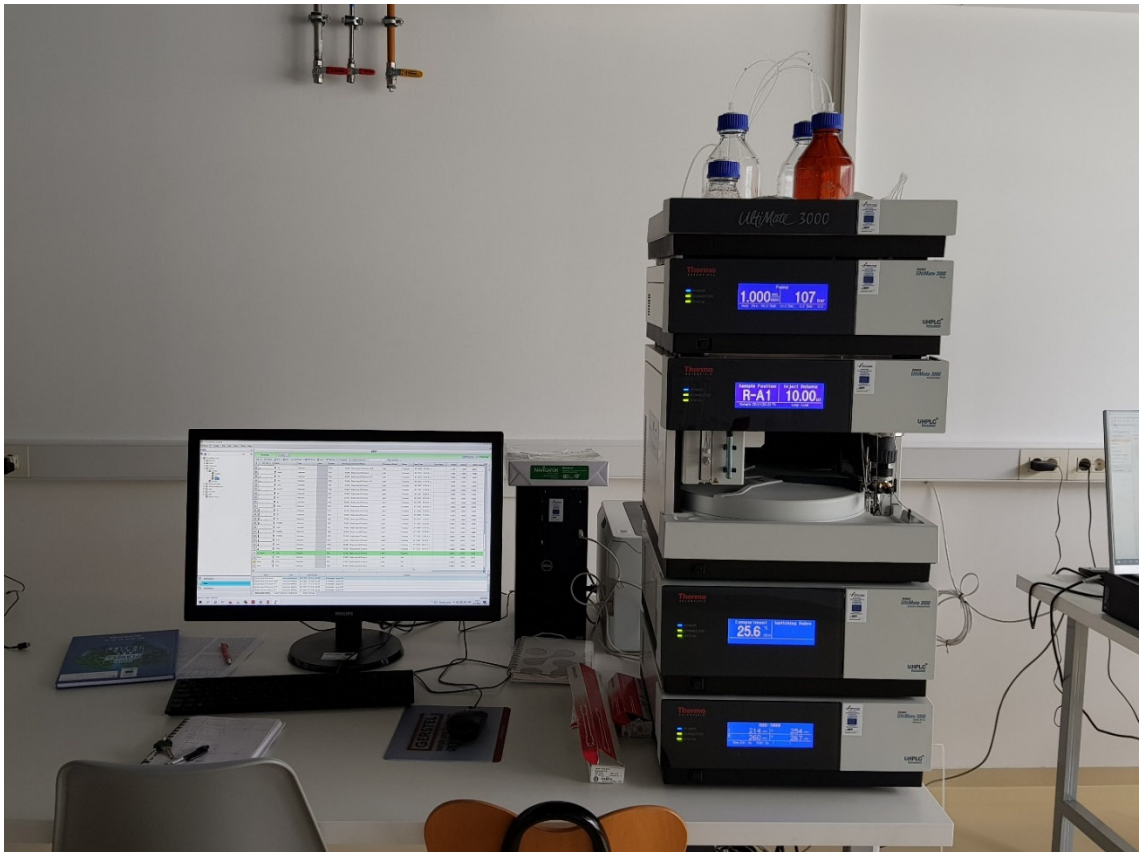
Slika 7. Analitička vaga - AT261 DeltaRange (Mettler Toledo, Švicarska)



Slika 8. Tacta mehaničke pipete - (Sartorius, Njemačka)

2.5. Tekućinski kromatograf (HPLC-DAD)

Na slici 9. je prikazan tekućinski kromatograf s DAD detektorom koji je korišten prilikom svih mjerenja i analiza. Korištena kolona je Synchronis C18 (dimenzija 250 x 4,6 mm, promjer čestica 5 μ m, Thermo Scientific, MA, SAD). Parametri korištene metode su optimizirani i opisani u poglavlju 3.2.3.



Slika 9. HPLC-DAD uređaj – Ultimate 3000 (Thermo Scientific, SAD)

3. Rezultati

3.1. Izbor otapala

Pošto je izabrana tvar namijenjena za izravnu oralnu primjenu, kao otapalo je korištena destilirana voda.

3.2. Optimizacija HPLC metode

Optimizacija HPLC metode uključivala je odabir stacionarne faze i različite omjere otapala u pokretnoj fazi.

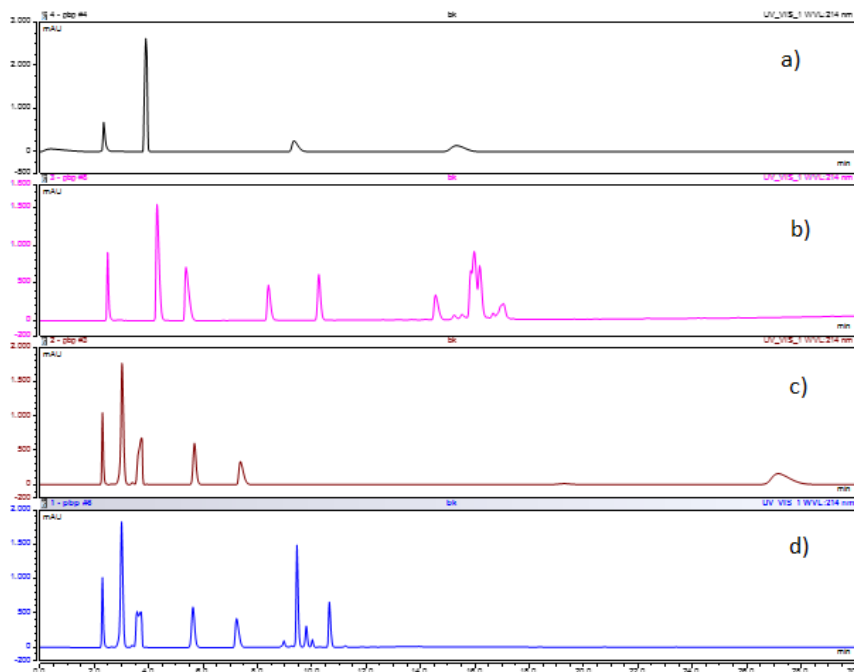
3.2.1. Odabir stacionarne faze

U literaturi je pronađen podatak kako se za određivanje vitamina topljivih u vodi najbolje pokazala kolona punjena reverznom fazom C18.^[19]

U eksperimentu je korištena Synchronis C18 kolona dimenzija 250 x 4,6 mm, promjer čestica 5 μ m (Thermo Scientific, MA, SAD).

3.2.2. Odabir otapala u mobilnoj fazi

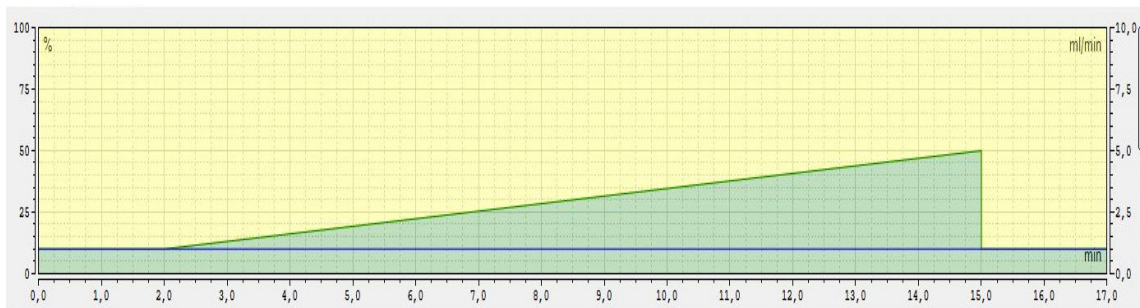
Odabir otapala u mobilnoj fazi je izrazito važan korak prilikom optimizacije metode. Ispitani su različiti omjeri početnih otapala. Korištenjem kombinacije vode i metanola u izokratnom i gradijentnom načinu, te vode i acetonitrila u izokratnom načinu nije postignuto zadovoljavajuće razdvajanje komponenti. (slika 10.)



Slika 10. Prikaz kromatograma korištenjem korištenjem različite mobilne faze: (a) izokratni metanol, b) gradijentan metanol, c) izokratni acetonitril, d) gradijentan acetonitril)

Za odabir otapala u mobilnoj fazi isprobana su 4 načina. Kombinacijom vode i metanola u izokratnom načinu nisu dobiveni jasni pikovi (a)), istom kombinacijom samo u gradijentnom načinu dobiveno je puno bolje razdvajanje (b)). Kombinacijom vode i acetonitrila u izokratnom načinu dobiveni su jasniji pikovi u odnosu na izokratni način kombinacije vode i metanola (a) i c)). Kombinacijom vode i acetonitrila u gradijentnom načinu dobiveno je najbolje razdvajanje, skupina pikova pred kraj analize jasnija je u odnosu na skupinu pikova pred kraj analize kod kombinacije vode i metanola u gradijentnom načinu (b) i d)).

Najbolje razdvajanje pokazao je udio vode + 0,3 % H_3PO_4 i acetonitrila u omjeru 90:10 u gradijentnom načinu (slika 11.). Mobilna faza se povećavala do 50 % acetonitrila.



Slika 11. Prikaz gradijenta mobilne faze

3.2.3. Parametri HPLC metode

Nakon odabira stacionarne faze i otapala mobilne faze određeni su optimalni parametri metode, prikazani u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Optimalni kromatografski parametri za određivanje sadržaja praha B kompleksa

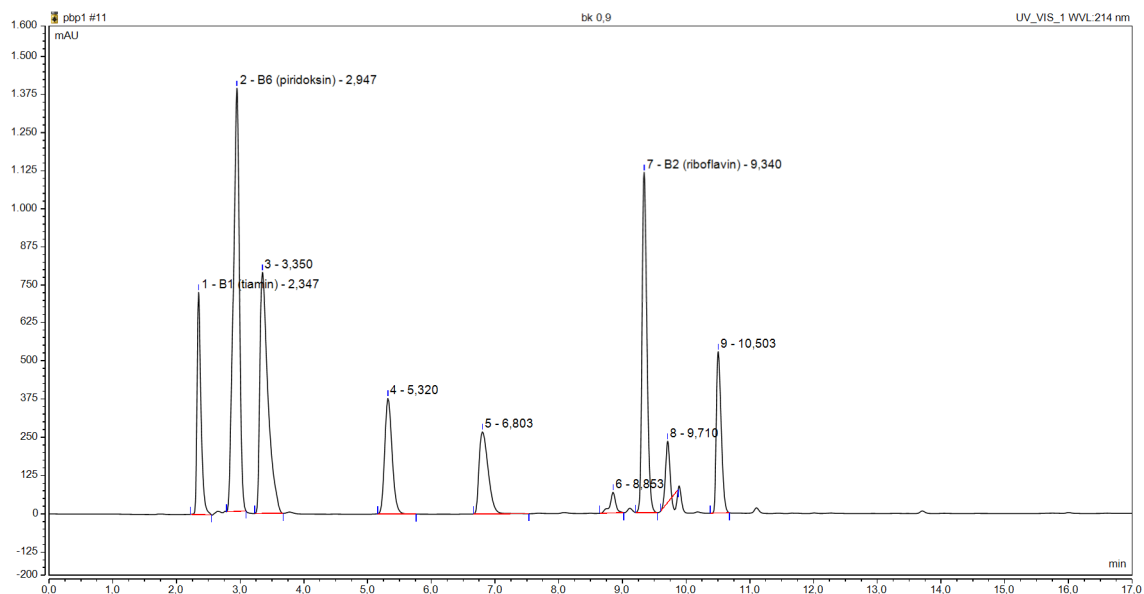
Kolona i pakiranje		Synchronis C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m		
Eluens A	0,3 % fosforna kiselina u vodi			
Eluens B	acetonitril			
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B	
	0,00	90	10	
	2,00	90	10	
	15,00	50	50	
	15,00	90	10	
	17,00	90	10	
Volumen injektiranja	10 μ L			
Protok	1 mL min ⁻¹			
Temperatura kolone	25,6°C			
Detektor	DAD (214 nm)			

3.3. Vrednovanje metode

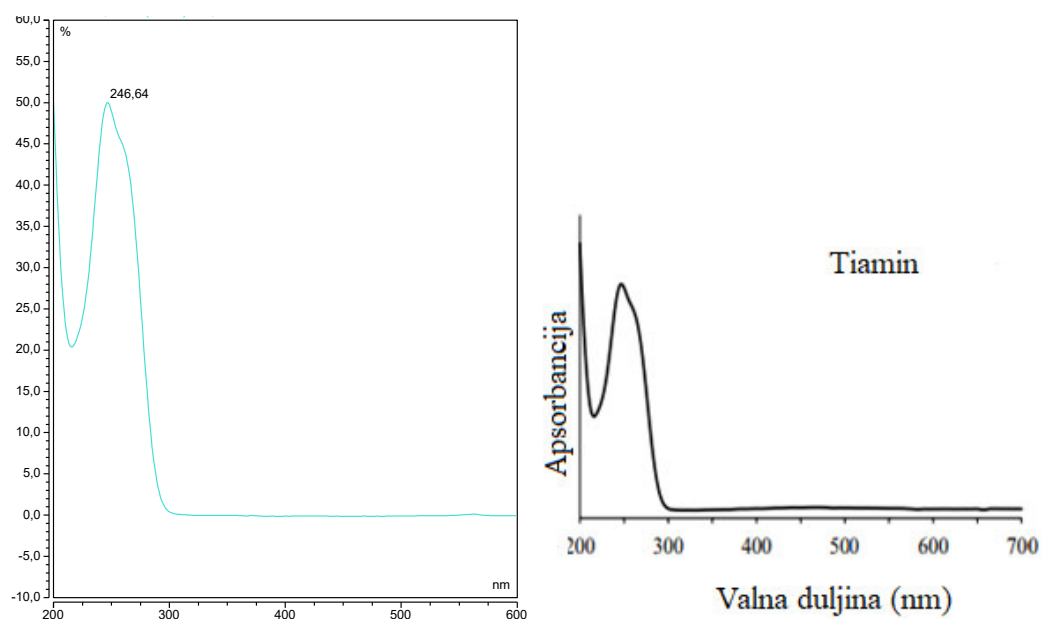
Metoda za određivanje sadržaja praha vitamina B kompleksa HPLC-DAD-om vrednovana je prema ICH smjernicama.^[20] Određene su sljedeće značajke metode: specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, granica određivanja i dokazivanja te robusnost otopine.

3.3.1. Specifičnost

Specifičnost je svojstvo metode da razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka. Uspoređujući UV-VIS spektre iz literature i dobivene prilikom analize, identificirana su tri spoja B kompleksa, vitamini B₁, B₂ i B₃. Valna duljina detekcije je 214 nm.

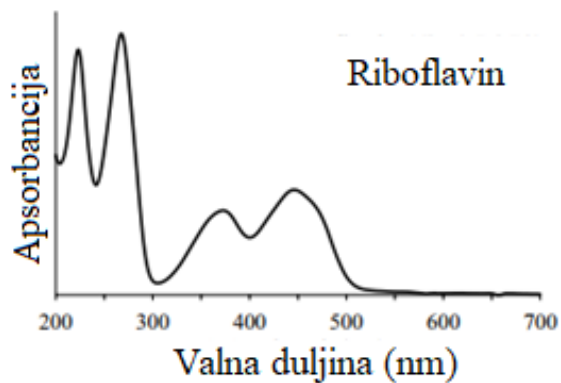
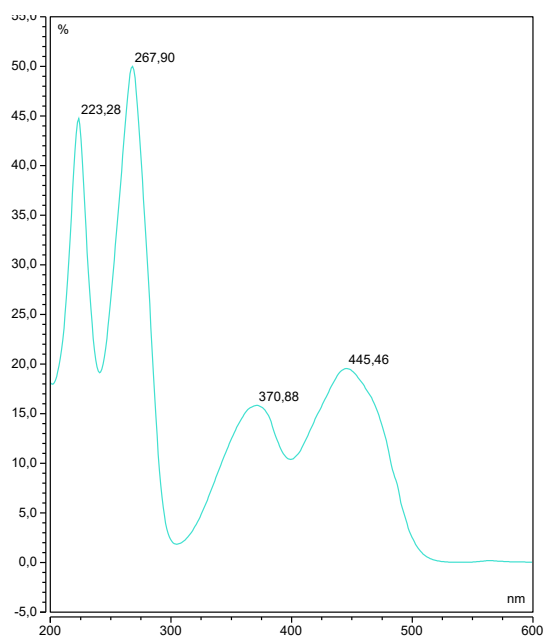


Slika 12. Kromatogram pri 214 nm s označenim spojevima (B kompleks, Natural Wealth, SAD) - (1-vitamin B₁, 2-vitamin B₆, 7-vitamin B₂)

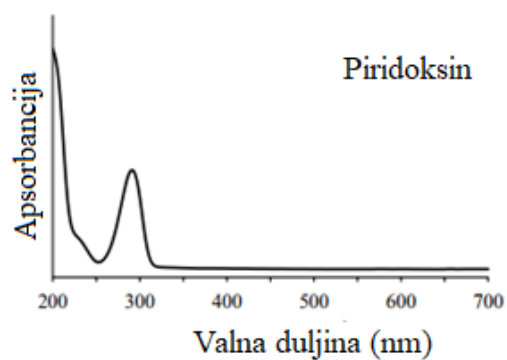
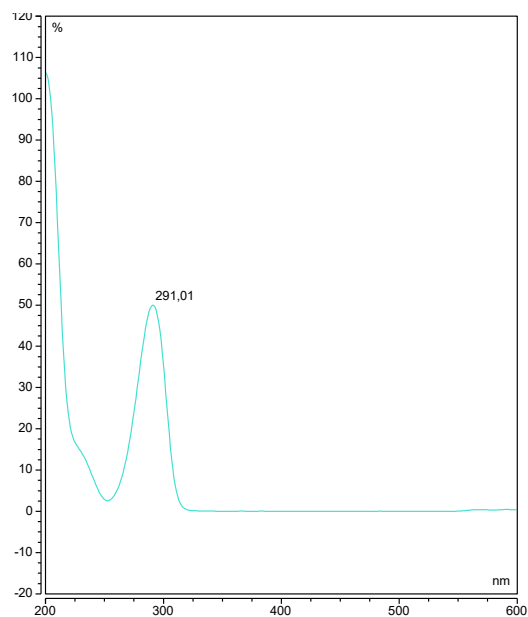


Slika 13. UV-Vis spektar za vitamin B₁ (lijevo) uspoređen s literaturom (desno),

$$\lambda_{\max} = 246 \text{ nm}^{[2]}$$



Slika 14. UV-VIS spektar za vitamin B₂ (lijevo) uspoređen s literaturom (desno),
 $\lambda_{\max} = 223, 267, 370, 445 \text{ nm}^{[2]}$



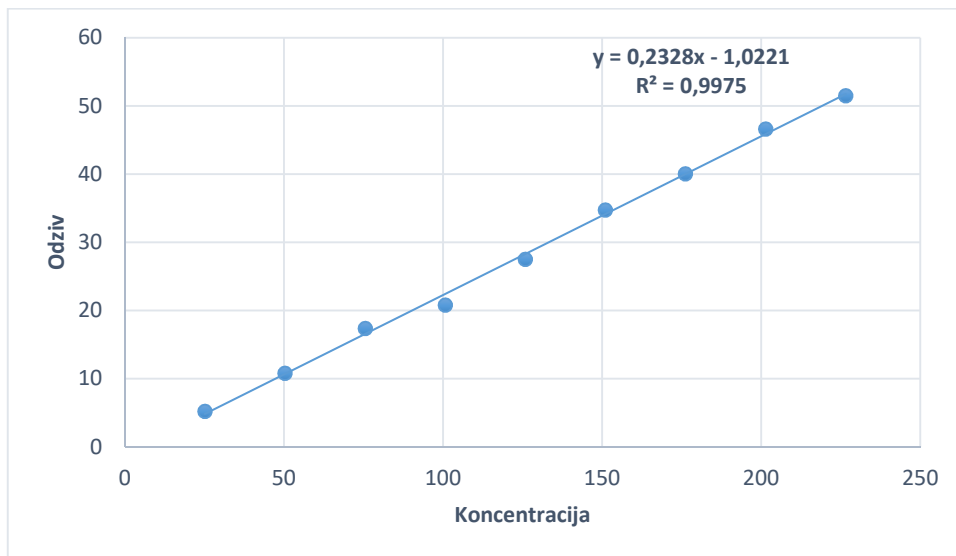
Slika 14. UV-VIS spektar za vitamin B₆ (lijevo) uspoređen s literaturom (desno),
 $\lambda_{\max} = 291 \text{ nm}^{[2]}$

3.3.2. Linearnost

Linearnost je potvrđena koeficijentom slaganja (R^2) koji iznosi $\geq 0,99$. Ovisnost signala prikazana je grafički te je određena jednadžba pravca (nagib i odsječak) i koeficijent slaganja (R^2).

Tablica 3.3. Koncentracije vitamina B₁ s odzivima detektora

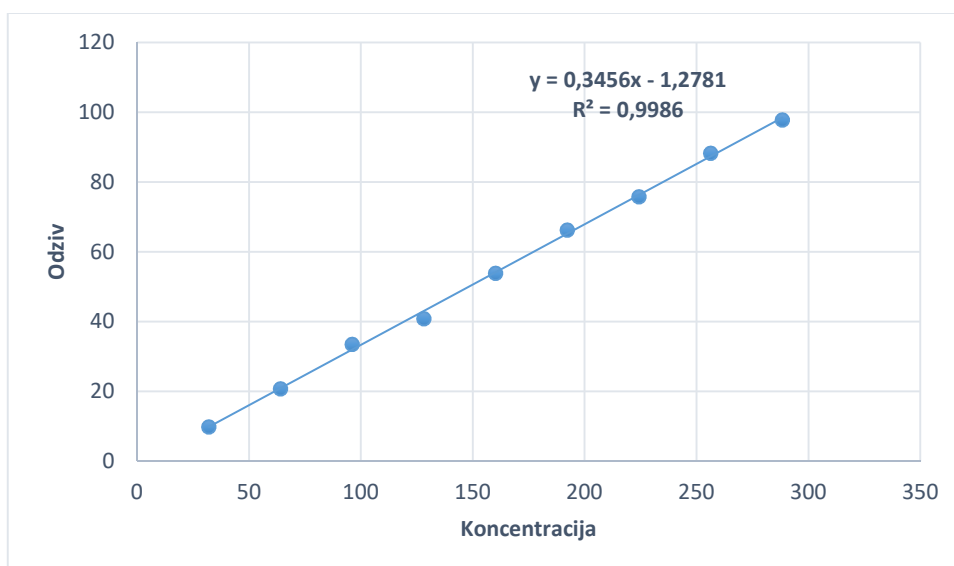
Koncentracija (ppm)	Odziv
25,17	5,2288
50,34	10,8023
75,52	17,3784
100,69	20,7777
125,86	27,5094
151,03	34,7506
176,20	40,0129
201,38	46,5968
226,55	51,4884



Slika 3.3. Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji vitamina B₁

Tablica 3.4. Koncentracije vitamina B₂ s odzivima detektora

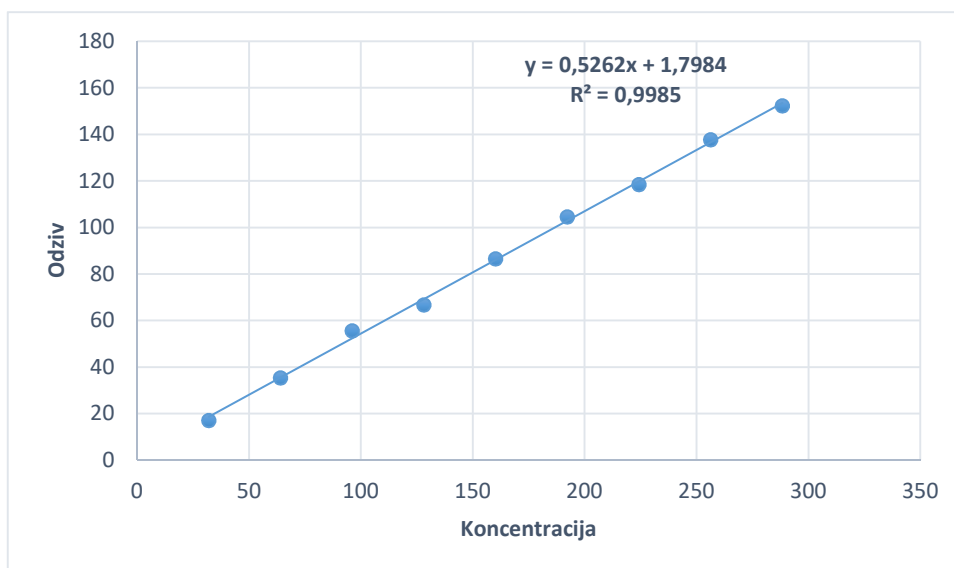
Koncentracija (ppm)	Odziv
25,17	5,2288
50,34	10,8023
75,52	17,3784
100,69	20,7777
125,86	27,5094
151,03	34,7506
176,20	40,0129
201,38	46,5968
226,55	51,4884



Slika 3.4. Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji vitamina B₂

Tablica 3.5. Koncentracije vitamina B6 s odzivima detektora

Koncentracija (ppm)	Odziv
25,17	5,2288
50,34	10,8023
75,52	17,3784
100,69	20,7777
125,86	27,5094
151,03	34,7506
176,20	40,0129
201,38	46,5968
226,55	51,4884

**Slika 3.5.** Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji vitamina B₆**Tablica 3.6.** Tablični prikaz vrijednosti linearnosti za analizu vitamina B₁, B₂, B₆

Analit	n	Nagib (a)	Odsječak (b)	R ²	RSD (%)
Vitamin B₁	9	0,2328	-1,0221	0,9975	3,0155
Vitamin B₂	9	0,3456	-1,2781	0,9986	2,306
Vitamin B₆	9	0,5262	1,7984	0,9985	2,218

n-broj standardnih otopina korištenih za izradu krivulje umjeravanja, R²-koeficijent slaganja, RSD%-relativno standardno odstupanje.

3.3.3. Granica određivanja i dokazivanja

Kriterij odnosa signala i šuma za granicu određivanja je 10, a za granicu dokazivanja je 3.^[20] Ista otopina injektirana je 6 puta i mjerene su površine i omjer signala i šuma. Iz površina je izračunata relativno standardno odstupanje (RSD). Iz odnosa signala i šuma je izračunana granica dokazivanja i ona iznosi otprilike 4 ppm.

Tablica 3.7. Odzivi dobiveni uzastopnim injektiranjem otopine iste koncentracije za vitamin B₁

Injektiranje	Koncentracija (ppm)	Odziv	S/N
1	25,17	26,0258	21,6
2	25,17	26,0801	21,6
3	25,17	25,9598	21,7
4	25,17	25,9853	21,7
5	25,17	26,0045	21,6
6	25,17	26,0098	21,8
RSD (%)		0,16	

S/N-odnos signala i šuma (engl. *signal-to-noise ratio*)

Tablica 3.8. Odzivi dobiveni uzastopnim injektiranjem otopine iste koncentracije za vitamin B₂

Injektiranje	Koncentracija (ppm)	Odziv	S/N
1	25,17	29,9708	25
2	25,17	29,9273	25
3	25,17	29,9047	25,1
4	25,17	29,8692	20,9
5	25,17	29,846	21,6
6	25,17	29,7774	21,8
RSD (%)		0,23	

S/N-odnos signala i šuma (engl. *signal-to-noise ratio*)

Tablica 3.9. Odzivi dobiveni uzastopnim injektiranjem otopine iste koncentracije za vitamin B₆

Injektiranje	Koncentracija (ppm)	Odziv	S/N
1	25,17	26,8142	49,7
2	25,17	26,7836	49,9
3	25,17	26,818	50,1
4	25,17	26,8225	50,3
5	25,17	26,783	50,1
6	25,17	26,8216	50,6
RSD (%)		0,07	

S/N-odnos signala i šuma (engl. *signal-to-noise ratio*)

3.3.4. Točnost metode

To je razlika, odnosno stupanj podudaranja između mjerene i prave vrijednosti uzrokovana uglavnom sustavnom pogreškom. Određuje se na minimalno tri koncentracijske točke unutar radnog područja. Ako metoda mora biti točna za šire koncentracijsko područje, tada se točnost metode provjerava i na većem broju koncentracijskih točaka. Rezultat kojim se procjenjuje točnost metode izražava se kao postotak iskoristivosti (engl. *recovery*), odnosno povrat. Rezultati se nalaze u tablici 4.

Tablica 4. Potvrđivanje točnosti metode za različite koncentracije vitamina B₁

Koncentracija (ppm)	Odziv - računski	Odziv - mjereni	Postotak iskoristivosti (%)
25,17	26,8467	25,17	93,76
50,34	50,784	50,34	99,13
75,52	79,0272	75,52	95,56
100,69	93,6268	100,69	107,54
125,86	122,5382	125,86	102,71
151,03	153,6382	151,03	98,30
176,20	176,239	176,20	99,98
201,38	204,5157	201,38	98,52
226,55	225,5242	226,55	100,46

Na jednak način su izračunati i postoci iskoristivosti i za vitamin B₂ (od 93,99 do 109,75 %) i za vitamin B₆ (od 95,51 do 105,31 %).

3.3.5. Preciznost

Ispitana je preciznost razvijene metode tako da je sadržaj praha B kompleksa pripremljen na način da je 6 g praha otopljeno u 25 mL otapala. 1 mL otopine prenesen je pipetom u vialu, viala je stavljena u HPLC uređaj i sadržaj viala je injektiran 6 puta za redom. Izračunat je sadržaj i relativno standardno odstupanje sadržaja, rezultati se nalaze u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Preciznost injektiranja za vitamin B₁

Injektiranje	Sadržaj (ppm)
1	26,0258
2	26,0801
3	25,9598
4	25,9853
5	26,0045
6	26,0098
RSD (%)	0,16

Relativno standardno odstupanje za vitamin B₂ iznosi 0,23 %, a za vitamin B₆ 0,07 %.

3.3.6. Robusnost

Robusnost je ispitana tako da su se mijenjali određeni parametri poput temperature i protoka. Robusnost metode je izmjerena i uspoređena između sadržaja praha B kompleksa i kapsule. (Priprema kapsule opisana je u poglavlju 2.3.2.)

Tablica 5.2. Robusnost metode

Parametar	Kapsula (sadržaj,
Prema metodi	99,7
Protok + 0.05 mL/min	95,5
Protok - 0.05 mL/min	104,5
Temperatura kolone + 5 °C	100,0
Temperatura kolone – 5 °C	100,3

4. Rasprava

4.1. Optimizacija parametra metode

Cilj završnog rada bio je razviti i optimizirati metodu određivanja sadržaja vitamina B₁, B₂ i B₆ u kapsuli B kompleksa uz pomoć visokotekućinske kromatografije s DAD detektorom tj. utvrditi njenu prikladnost kroz vrednovanje značajki.

Prije svega je bilo potrebno odrediti prikladnu mobilnu fazu za vitamine B₁, B₂ i B₆.

Pri odabiru mobilne faze cilj je bio izabrati optimalan omjer koji će nam omogućiti brzo i precizno razdvajanje. Smjesa vode i 0,3 % fosforne kiseline (otapalo A) je ispitana u različitim kombinacijama s metnolom ili acetonitrilom (otapalo B). Korištenjem kombinacije vode i metanola u izokratnom i gradijentnom načinu, te vode i acetonitrila u izokratnom načinu nije postignuto zadovoljavajuće razdvajanje komponenti. Smjesa otapala voda + 0,3 % fosforne kiseline i acetonitril korišteni u gradijentnom načinu rada s početnim omjerom 90:10 se pokazala kao najbolja kombinacija dajući zadovoljavajuće razdvajanje komponenti smjese. Pokretna faza se koristila u obliku gradijenta koji se povećavao do 50 % acetonitrila (Slika 11.).

Metoda analize trajala je 30 minuta, iz kromatograma se vidi da je zadnje eluiranje sastojaka bilo pri 12 minuta, stoga je skraćeno vrijeme trajanja analize na 17 minuta.

Provedena je identifikacija vitamina B₁, B₂, B₆ HPLC-DAD tehnikom čime je dobiven kromatogram (slika 12.).

4.2. Vrednovanje metode

Linearnost metode je određena za koncentracije od 25,17 do 226,55 ppm kroz devet točaka. Uz koeficijent slaganja (R^2) od 0,9975 za vitamin B₁, 0,9986 za vitamin B₂ i 0,9985 za vitamin B₆, rezultati ukazuju na zadovoljavajuću linearnost.

Točnost metode ispitana je kao razlika između mjerene i računske vrijednosti. točnost se ispitivala kroz 9 koncentracijskih točaka. Rezultati potvrde točnosti nalaze se u tablici 4. Preciznost metode ispitana je na način da se ista otopina injektirala 6 puta za redom te mjerio se sadržaj otopine. Dobivenim rezultatima u tablici 4.1. prikazana je preciznost injektiranja.

Robusnost metode ispitana je promjenama u parametrima metode. Usporedbom dobivenih sadržaja pomoću odabrane metode i sadržaja dobivenih analizom s promijenjenim parametrima, utvrđena je zadovoljavajuća robusnost metode. Iz dobivenih rezultata utvrđeno je da promjene vrednovanja metode ne utječu značajno na dobivene rezultate, jedino kada snizimo protok za 0,05 mL/min.

Provedeni postupci u svrhu vrednovanja prethodno optimizirane metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje vitamina B₁, B₂, B₆ ukazuju na to da je ista prihvatljiva za korištenje u navedene svrhe.

5. Zaključak

Visokotekućinska kromatografija s DAD detektorom prikladna je za kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja vitamina B kompleksa. Najbolje razdjeljivanje je dobiveno C18 kolonom punjenom reverznom fazom i pokretnom fazom u obliku gradijenta. Optimalno vrijeme trajanja analize je 17 minuta.

Razvijena metoda ima zadovoljavajuće vrijednosti parametara vrednovanja čime je osigurana njena prikladnost za određivanje vitamina B₁, B₂ i B₆.

6. Literatura

- [1] URL: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamini> (20.08.2021.)
- [2] K.Sasaki, H.Hatate, R.Tanaka, *Chromatographia*, **2020**, 83, 839.
- [3] URL: <https://hr.n1info.com/zdravlje/a586717-nedostatak-vitamina-b-simptomi-uzrok-i-kada-moze-bit-opasan-za-tijelo/> (20.08.2021.)
- [4] URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/poremecaji-prehrane/manjak-vitamina-ovisnost-onjima-i-toksicnost/tiamin> (20.08.2021.)
- [5] URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thiamine#/media/File:Thiamin.svg> (20.08.2021.)
- [6] URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_B2 (21.08.2021.)
- [7] URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_B2#/media/Datoteka:Riboflavin.svg (21.08.2021.)
- [8] URL: https://www.healthline.com/nutrition/vitamin-b6-benefits#TOC_TITLE_HDR_2 (21.08.2021.)
- [9] URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Vitamin_B6#/media/Datoteka:Pyridoxal-phosphate.svg (21.08.2021.)
- [10] URL: https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/5_AK2_ekstr_krom_elektro.pdf (30.08.2021.)
- [11] T. Marković, *Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa*, Kemijsko tehnološki fakultet, Split, **2019**.
- [12] NJ. Radić Nj, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, **2016**, str. 630-663;720
- [13] URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm
- [14] Š. Cerjan Stefanović, V. Drvenkar, B. Jurišić, M. Medić Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, *Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998*, Hinus, Zagreb, **1999**.
- [15] Ahuja S, Dong MW. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, **2005**. str. 44
- [16] URL: <http://struna.ihjj.hr/search-do/?q=granica+otkrivanja#container> (01.09.2021.)
- [17] URL: <http://struna.ihjj.hr/search-do/?q=granica+odre%C4%91ivanje#container> (01.09.2021.)

[18] URL: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_16.html
(01.09.2021.)

[19] E. E. Abano, R. Godbless Dadzie. *Croat. J. Food Sci. Technolstr*, **2014**, 6 (2), 116.

[20] A. Teasdale, D. Elder, R. W. Nims, *ICH Quality guidelines An Implementation Guide*, Wiley, SAD, **2018**, str. 146-147