

Identifikacija i određivanje sadržaja biotina u tabletama primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije

Matelić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:882342>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Barbara Matelić

**Identifikacija i određivanje sadržaja biotina u
tabletama primjenom vezanog sustava tekućinske
kromatografije i masene spektrometrije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na ukazanom povjerenju, strpljenju i stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada te iskazanom entuzijazmu i inspiraciji koju prenosi prema analitici lijekova i struci!

Najveće hvala mojim roditeljima, mami Slavici i tati Vladimiru, seki Ivani i bratu Luki! Hvala vam za svu ljubav i podršku koju ste mi pružili, hvala vam što ste vjerovali u mene i ohrabriali me u studentskim i životnim izazovima! Hvala i mojoj široj obitelji na osloncu i svim riječima podrške! Volim vas!

Zahvaljujem i svim svojim prijateljima koji su mi uljepšali ove studentske dane te ih učinili posebnijim i sretnijim!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Vitamini	1
1.2. Biotin	3
1.3. Metode analize biotina	5
1.3.1. Mikrobiološki testovi	5
1.3.2. Biološki testovi.....	5
1.3.3. Fizikalno-kemijske metode	6
1.3.4. Testovi vezanja.....	7
1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	8
1.5. Masena spektrometrija	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Referentna supstanca.....	13
3.1.3. Uzorci	13
3.1.4. Plinovi	13
3.1.5. Radni instrumenti	13
3.1.6. Pribor.....	13
3.1.7. Programski paketi.....	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	14
3.2.2. Priprema ispitivanog uzorka.....	15

3.2.3.	Uvjeti kromatografske analize	15
3.2.4.	Uvjeti spektrometrijske analize	16
4.	REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1.	Ispitivanje utjecaja sastava i brzine protoka mobilne faze na vrijeme zadržavanja analita.....	17
4.2.	Identifikacija masenom spektrometrijom	20
4.3.	Određivanje sadržaja biotina.....	23
4.4.	Određivanje koncentracije biotina.....	26
5.	ZAKLJUČCI	28
6.	LITERATURA	29
7.	SAŽETAK/SUMMARY	31
7.1.	Sažetak	31
7.2.	Summary	32
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Vitamini

Vitamini su organski spojevi koje ljudski organizam ne stvara u dovoljnim količinama ili ih uopće ne može sintetizirati. Oni su nutrijenti koji nisu izvor energije i nemaju energetske vrijednosti, ali su važni jer su potrebni za pravilan rast i razvoj organizma te pravilno odvijanje mnogih funkcija. Poljski biokemičar Kazimierz Funk dao im je ime 1912. godine. „*Vita*“ na latinskom znači život, a *-amin* predstavlja amin jer se mislilo da su vitamini po svojoj strukturi amini. Postoji 13 vitamina od kojih su vitamini A, D, E i K topljivi u mastima dok su vitamini C i vitamini B kompleksa topljivi u vodi. Svaki vitamin ima posebnu ulogu u održavanju zdravlja (Combs i McClung, 2017).

Vitamin A je pojam koji se odnosi na spojeve s biološkom aktivnošću retinola. Pojavljuje se u različitim oblicima; kao derivati retinoične kiseline (esteri, eteri ili alkoholni derivati) koji su prisutni u hrani životinjskog podrijetla (jetra, meso, jaja i mliječni proizvodi) te kao karotenoidi provitamina A, poput α i β -karotena te β -kriptoksantina, koji su u prehrani zastupljeni u zelenom, žutom ili narančastom povrću. Ti prekursori služe kao supstrati za 11-*cis*-retinal koji je potreban za vid te sve-*trans*-retinoičnu kiselinu koja je potrebna za diferencijaciju stanica i regulaciju transkripcije u gotovo svim tkivima. Nedostatak ovog vitamina uzrokuje kseroftalmiju koju karakteriziraju noćno sljepilo i abnormalnosti rožnice što može dovesti do ireverzibilne sljepoće. Epitelna tkiva su izrazito osjetljiva na nedostatak kao i na višak vitamina A. U koži se nedostatak vitamina A manifestira kao suhoća s folikularnom keratozom. Neki od oblika vitamina A koriste se u liječenju kožnih bolesti: 13-*cis*-retinoična kiselina (izotretinoin) za teške cistične akne, acetretin kod teške psorijaze (Combs i McClung, 2017).

Vitamin D, poznat i kao sunčev vitamin, obuhvaća skupinu od 7 vitamina koji imaju antirahitičnu aktivnost. Najznačajniji predstavnici su vitamin D2 (ergokalciferol) i vitamin D3 (kolekalciferol). Pod utjecajem ultraljubičastih zraka vitamin D se može sintetizirati u koži iz 7-dehidrokolesterola. U hrani je najzastupljeniji u ribljem ulju i mesu, mlijeku, mliječnim proizvodima te jajima. Zbog svoje steroidne strukture i metaboliziranja u biološki aktivni oblik (1,25-dihidroksikolekalciferol, kalcitriol) koji djeluje kao steroidni hormon, vitamin D nije klasični vitamin već je prohormon. Važan je za održavanje homeostaze kalcija i fosfata te potiče njihovu apsorpciju iz gastrointestinalnog trakta. Nedostatak vitamina D očituje se

hipokalcemijom, hipofosfatemijom, demineralizacijom kostiju te bolovima u kostima i spontanim prijelomima. Ako se razina kalcijevih i fosfatnih iona u plazmi ne održava konstantnom, može doći i do rahitisa, metaboličke bolesti kostiju. Hipervitaminoza dovodi do hiperkalcemije koja se očituje umorom, probavnim smetnjama, anemijom. Kalcitriol se propisuje u liječenju bolesti uzrokovanih hipokalcemijom (osteomalacije, rahitisa, renalne osteodistrofije, osteoporoze) te u prevenciji osteoporoze uzrokovane kortkosteroidima (www.vitamini.hr).

Vitamin E predstavljaju tokoferoli; ima ih osam s aktivnošću vitamina E, a najvažnijim se smatra α -tokoferol. Snažan je antioksidans koji štiti stanične membrane i druge liposolubilne dijelove; sprječava oksidaciju nezasićenih masnih kiselina te reagira sa slobodnim radikalima. Nalazi se u svim tkivima u organizmu, a najviše ga je u jetri, masnom tkivu i mišićima. Tokoferoli su u pravilu vrlo rasprostranjeni u hrani. Bogati izvor vitamina E su biljna ulja; posebno suncokretovo te ulje pšeničnih klica, orasi, sjemenke, bademi, kikiriki, žumanjak jajeta te lisnato zeleno povrće. Deficit vitamina E vrlo je rijedak, a može se pojaviti nakon iscrpljenosti i neadekvatne prehrane koja traje mjesecima (Combs i McClung, 2017).

Vitamin K poznat je kao i antihemoragijski, odnosno koagulacijski vitamin. Ima važnu ulogu u zgrušavanju krvi. Iz ove skupine vitamin K1 (fitomenadion) i K2 (menakinon) prirodnog su podrijetla, a K3 (menadion) dobiva se sintetski. Ima važnu ulogu u zgrušavanju krvi, potreban je za sintezu bjelančevina koje sudjeluju u tom procesu. Hipovitaminoza vitamina K je rijetka, ali ako dođe do nje, uzrokuje hemoragiju te može doći i do hipoprotrombinemije (www.vitamini.hr).

U skupinu B kompleksa ubrajamo vitamin B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (pantotenska kiselina), B6 (piridoksin), B7 (biotin), B9 (folna kiselina) te vitamin B12 (cijanokobalamin). Najbolji prirodni izvori vitamina B kompleksa su pekarski kvasac, jetra, cjelovite žitarice, riža, orašasti plodovi, mlijeko, jaja, meso, riba, voće, lisnato zeleno povrće. Raznolika i uravnotežena prehrana lako zadovoljava potrebe za B vitaminima kod zdrave osobe, no neke bolesti i stanja povezuju se s deficitom ove važne skupine vitamina. Tako su osobe koje konzumiraju velike količine alkohola, žene koje uzimaju oralne kontraceptive, starije osobe, sportaši te djeca na terapiji antibioticima skloni razviti deficite vitamina B kompleksa i svakako trebaju posebno pripaziti na adekvatan unos. Dodatno, izloženost stresu, dugotrajne infekcije te kronični umor stanja su koja neodgodivo zahtijevaju dodatan unos.

Tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3) te pantotenska kiselina (B5) izravno sudjeluju u procesu stvaranja energije. Piridoksin (B6), cijanokobalmin (B12) i folna kiselina (B9) mogu smanjiti opasnost od razvoja demencije i Alzheimerove bolesti jer ti vitamini igraju važnu ulogu u sintezi neurotransmitera važnih za kognitivne i ostale funkcije mozga.

Vitamini B kompleksa neophodni su za održavanje zdrave kože, kose i noktiju. U tom kontekstu je nemoguće izdvojiti pojedini B vitamin kao važniji od drugog. Tako riboflavin (B2) štiti kožu od pucanja, piridoksin (B3) pomaže kod suhe i upaljenje kože, pantotenska kiselina (B5) vlaži kožu i pomaže u borbi protiv problematične kože, a biotin (B7) sprječava sitno perutanje kože.

Deficit piridoksina (B6), cijanokobalmina (B12) te folne kiseline (B9) dovodi do povišene razine aminokiseline homocistein koja je značajan čimbenik za razvoj bolesti srca i krvnih žila.

Piridoksin (vitamin B6) poboljšava protok krvi kroz ženske spolne organe te pomaže u regulaciji razine estrogena, a studije ukazuju i na smanjenje depresije koja je rezultat predmenstrualnog sindroma.

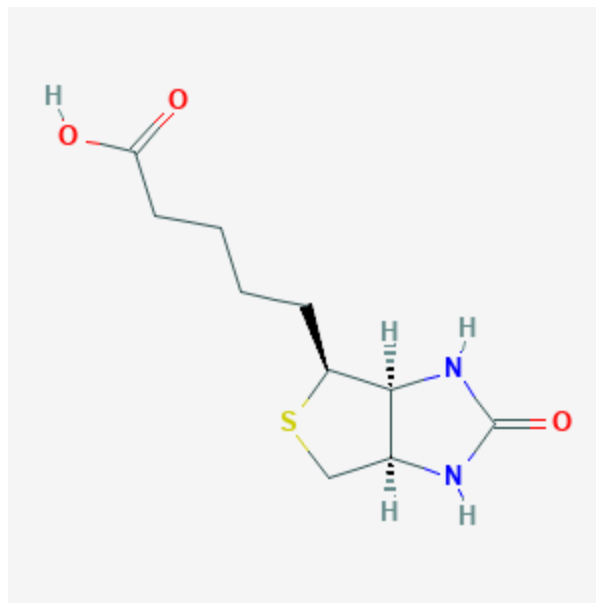
Vitamini B kompleksa su topljivi u vodi što znači da ih naše tijelo ne može skladištiti i potrebno ih je svakodnevno unositi hranom odnosno dodacima prehrani. Oni, u pravilu, nisu toksični čak i ako se uzimaju u velikim količinama. (www.vitamini.hr)

Vitamin C ili askorbinska kiselina je vitamin topljiv u vodi. Zbog endiolske strukture ima visoku sposobnost redukcije te je snažan antioksidans. Oksidacijom prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu. Taj redoks-sustav sudjeluje u brojnim biokemijskim reakcijama, npr. u sintezi kolagena, karnitina, katekolamina, redukciji folne u folinsku kiselinu, aktivaciji trombina, apsorpciji željeza, reakcijama imunosnog sustava. Raznoliko voće i povrće, poput citrusa, peršina, nara, paprike i kelja, bogat su izvor vitamina C. Askorbinska kiselina koristi se za prevenciju i liječenje skorbuta, za prevenciju prehlade i gripe, za bolje zacjeljivanje rana i opekline te kao antioksidans u prehrambenoj industriji. Laksativan učinak pokazuje pri unosu vrlo velikih doza, a može pospješiti i stvaranje bubrenih kamenaca jer se može konvertirati u oksalat (Combs i McClung, 2017).

1.2. Biotin

Biotin, poznat kao vitamin B7 ili vitamin H („H“ je kao početno slovo za „Haar“ i „Haut“, njemačke riječi za kosu i kožu), pripada skupini vitamina B-kompleksa i topljiv je u vodi. Prvi je put izoliran 1936. kao faktor rasta kvasca iz žumanjka. Njegova kemijska struktura

prikazana je na Slici 1. Biotin ima heterociklički prsten koji je vezan na alifatsku stranu lanca koja završava karboksilnom skupinom (valerijanska kiselina). Postoji osam različitih stereoizomera biotina, ali jedino d-biotin pokazuje biološku aktivnost i može biti pronađen u prirodi. Može ga se pronaći u mnogim biljkama i životinjskim tkivima te ga mogu sintetizirati različite bakterije (Dasgupta, 2019).



Slika 1. Strukturna formula biotina (preuzeto s: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Biotin je esencijalan za normalnu funkciju stanica te njihov rast i razvoj jer je kofaktor za pet karboksilaza (četiri smještene u mitohondrijima i jedna u citoplazmi). Te karboksilaze imaju važnu ulogu posrednika metabolizma u glukoneogenezi, sintezi masnih kiselina, te katabolizmu aminokiselina. Biotin sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina, prijenosu živčanih impulsa, stvaranju krvnih stanica, pravilnom radu jetre i probavnog sustava u cijelosti, te doprinosi zdravlju kože i kose (Dasgupta, 2019).

Ljudi i drugi sisavci ne mogu sintetizirati biotin te ga moraju unijeti hranom preko intestinalne apsorpcije. Intestinalni sustav izložen je dvama izvorima: hrani koja sadrži biotin te normalnoj mikroflori debelog crijeva koja može sintetizirati biotin (Mock, ured., 2013).

Nedostatak biotina uzrokuje alopeciju, eritematozni osip, probleme s vidom i sluhom, mijalgije, blagu depresiju te probleme u radu imunološkog sustava. Kod takvih se problema preporučuje dodatna suplementacija biotinom.

Preporučeni prosječni dnevni unos biotina trebao bi biti između 35 i 200 µg, ovisno o životnoj dobi osobe i mogućim komorbiditetima (Mock, ured., 2013). Pacijenti koji boluju od

progresivne multiple skleroze uzimaju biotin u dozi od 10 mg jer se biotin smatra aktivnom tvari koja povećava proizvodnju energije u demijeliniziranim aksonima i povećava proizvodnju samog mijelina (www.mssociety.ca).

1.3. Metode analize biotina

Biotin se nalazi slobodan ili kovalentno vezan za proteine ili peptide. Metabolizam slobodnog biotina u mikroorganizmima je dobro proučen, dok se o katabolizmu biotina u stanicama sisavaca malo zna. Biotin podliježe beta-oksidaciji postraničnog lanca čime nastaju bisnorbiotin, tetranorbiotin i srodni metaboliti. Sumpor u heterocikličkom prstenu može biti oksidiran čime nastaju biotin-L-sulfoksid, biotin-D-sulfoksid i biotin-sulfon. Svi su metaboliti hidrofilni te se izlučuju urinom. Kompleksi kovalentno vezanog biotina na peptide i proteine prvo hidroliziraju na manje biotinilpeptide, koji posljednično otpuštaju biotin.

Metode analize biotina možemo podijeliti u četiri kategorije: mikrobiološki testovi, biološki testovi, fizikalno-kemijske metode i testovi vezanja (Livaniou i sur., 2000).

1.3.1. Mikrobiološki testovi

Kao prve metode za određivanje biotina razvili su se mikrobiološki testovi. Njihov temeljni princip je da rast i razmnožavanje mnogih mikroorganizama ovisi o prisutstvu biotina u kulturi medija jer je on esencijalan nutrijent za njihov uzgoj. Određene se vrste mikroorganizama inokuliraju u mediju sa standardom ili otopinom nepoznatog uzorka vitamina. Mikroorganizmi se umnažaju ovisno o prisutnoj koncentraciji vitamina te se turbidimetrijom ili titracijom kvantificira razvoj kulture (Ball, 1994).

Vrste bakterija, gljivica i algi koje se koriste su: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ochromonas danica*, *Micrococcus sodonensis*, *Neurospora crassa*, *Rhizobium trifolii*, *Escherichia coli C162*. Razvijene su i mikrobiološke metode koje kombiniraju mikroorganizme i radiooznačene komponente. Npr. ugradnja $^{14}\text{CO}_2$ u stanice mikroorganizma određena je prisutstvom različite količine biotina. (Livaniou i sur., 2000).

1.3.2. Biološki testovi

Biološki testovi manje su osjetljivi od mikrobioloških testova. U njima se koriste životinje, čiji je razvoj inhibiran umjetnim nedostatkom biotina, te se one podijele u skupine.

Prvoj skupini daju se uskraćeni vitamini poznate koncentracije, a drugoj skupini uskraćeni vitamini, ali u nepoznatoj koncentraciji. Određivanje koncentracije nepoznatog uzorka temelji se na krivulji životinjskog razvoja koja prikazuje povećanje mase životinje u ovisnosti logaritma količine primijenjenog biotina (Livaniou i sur., 2000; Ponder i sur., 2004).

Biološkim testovima pripadaju i metode koje indirektno određuju biotin preko bioloških funkcija, npr. praćenje aktivnosti enzima ovisnih o biotinu poput piruvat-karboksilaze ili biotinil-CoA sintetaze (Livaniou i sur., 2000).

1.3.3. Fizikalno-kemijske metode

Fizikalno-kemijske metode koriste se za određivanje sadržaja u uzorcima s visokom koncentracijom biotina. Uključuju spektrofotometriju, kolorimetriju, polarografiju, kapilarnu zonsku elektroforezu, tankoslojnu kromatografiju, i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.

Spektrofotometrijsko određivanje biotina temelji se na mjerenju apsorbancije pri valnim duljinama od 200 nm do 210 nm jer sam biotin ne posjeduje kromofore (Lawrance i Patel, 2014). Zbog toga se biotin veže sa tvarima koje u svojoj strukturi imaju kromofore, poput glikoproteina avidina te se mjeri apsorpcija triptofanskih ostataka avidina. Jedan od prvih takvih testova je Greenov test temeljen na uklanjanju p-hidroksiazobenzen-2'-karboksilne kiseline (HABA) iz avidin-HABA kompleksa što uzrokuje smanjenje apsorbancije na 500 nm povećanjem koncentracije biotina (Livaniou i sur., 2000).

Kao metodu primarne potvrde identiteta Europska farmakopeja navodi infracrvenu spektroskopiju (IR) te usporedbu dobivenog IR spektra s već postojećim spektrom biotina iz baze ili snimljenog spektra standarda biotina (European Pharmacopoeia, 2016).

Jedna od objavljenih metoda kolorimetrijskog određivanja biotina je ona McCormicka i Rotha. Temelji se na reakciji biotina s p-dimetilaminocinamaldehydom, a obojeni produkt se određuje na 533 nm (Livaniou i sur., 2000).

Drugi kolorimetrijski testovi za biotin temeljeni su na redoks reakcijama. Objavljena je metoda u kojoj se mjeri apsorpcija ekstrahiranog trijodida u kloroformu na 520 nm nakon oksidacije atoma sumpora biotina u odgovarajući sulfon s kalij jodatom ili apsorpcija trijodida na 350 nm nastalog nakon reakcije biotina s perjodatom (Walash i sur., 2008).

Polarografija se najčešće izvodi u smjesi dimetilformamid-voda i 0,05 M KNO₃.

Objavljeni su radovi u kojima se kapilarna zonska elektroforeza, kao separacijska tehnika, koristila se za analizu biotina u multivitaminskim formulacijama. Ako se odjeljivanje

radi u vodenom mediju, biotin se detektira UV-Vis spektrofotometrijom na 200 nm (Livaniou i sur., 2000).

Tekućinska kromatografija se najčešće se provodi na nepolarnoj oktadecilsilil silikagel koloni (Sim i sur., 2016). Ovu metodu predlaže i Europska farmakopeja kao metodu izbora za ispitivanje čistoće (European Pharmacopoeia, 2016). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti brza je i reproducibilna metoda određivanja biotina u multivitaminskim pripravcima. Najčešće se provodi obrnuto-fazna kromatografija sa oktasilil silikagelom kao nepolarnom stacionarnom fazom, a biotin se detektira spektrofotometrijski UV dijelu spektra (Ekpe i Hazen, 1998).

Europska farmakopeja propisuje tankoslojnu kromatografiju kao metodu sekundarne identifikacije. Kao nepokretna faza koristi se silikagel, a kao mobilna faza smjesa metanola, ledene octene kiseline i toluena. Za vizualizaciju biotina se koristi p-dimetilaminocinamaldehyd (European Pharmacopoeia, 2016).

Određivanje biotina plinskom kromatografijom nije uobičajeno jer biotin nije hlapljiva molekula. 1970-ih je objavljena metoda prema kojoj se biotin može odrediti plinskom kromatografijom nakon njegovog prevođenja u hlapljivi oblik, npr. biotin-silil-ester (Livaniou i sur., 2000).

1.3.4. Testovi vezanja

Testovi vezanja su brzi i visoko osjetljivi testovi. Temelje se na istim principima kao i imunotestovi samo što se umjesto protutijela koriste specifični proteini koji se vežu na ispitivani analit. Primjenjuju se za direktno određivanje biotina, metabolita biotina te peptida na koji je vezan biotin. Koriste su glikoproteini avidin i streptavidin koji imaju visoke konstante afiniteta za biotin te visoku specifičnost vezanja (Lawrance i Patel, 2014).

Određivanje biotina testovima vezanja specifično je u odnosu na druge vitamine, dok je određivanje biotina i njegovih metabolita manje specifično. Ta se selektivnost koristi u farmakokinetičkim ispitivanjima biotina. Ovim testom se mogu određivati i biotinizirane molekule označene s radioaktivnim izotopima ili fluorescentnim tvarima (Harrington , 2019).

1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC (engl. *High-performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) analitička je separacijska tehnika koja se primjenjuje rutinski u analizama ljekovitih formulacija i drugih preparata. Sastavnice koje se ispituju trebaju biti ekstrahirane iz uzorka prije analize. Otopljene sastavnice stupaju u interakciju s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom te se na koloni zadržavaju različito. Interakcije nastaju zbog razlika u adsorpciji, razdiobi među fazama, ionskoj izmjeni ili veličini tvari koje se razdvajaju.

U tekućinskoj kromatografiji stacionarne faze mogu biti različite pa se tako razlikuju dvije vrste: normalno-fazna i obrnuto-fazna kromatografija. Kod normalno-fazne kromatografije stacionarna faza je polarna, a mobilna faza nepolarna. Najčešće korištena stacionarna faza je nemodificirani silikagel. Mehanizam zadržavanja polarnog analita u koloni je adsorpcija, polarne grupe analita ulaze u interakciju s polarnim grupama stacionarne faze. Kod kromatografije obrnutih faza (reverzno-fazna kromatografija) stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza polarna. Najčešće korištene stacionarne faze su oktadecilsilil i oktasilil silikagel. Vrijeme zadržavanja povećava se dodatkom polarnih otapala u mobilnu fazu, a smanjuje se dodatkom hidrofobnih otapala. Hidrofobne interakcije koje su rezultat odbijajućih sila između polarnog otapala, nepolarne stacionarne faze te analita uzrokuju zadržavanje analita u koloni (Nigović, 2018).

Mobilnu fazu najčešće čini smjesa otapala različite polarности te se zbog toga u samom postupku kromatografije može primjenjivati gradijentna ili izokratna elucija. Kod gradijentne elucije sastav se mobilne faze tijekom analize mijenja, dok kod izokratne elucije ostaje nepromijenjen.

Djelotvornost kromatografske kolone iskazuje se brojem teorijskih tavana. Broj teorijskih tavana (N) opisuje broj uspostavljenih ravnoteža na koloni. Definiran je izrazom $N=16(t_R/w_b)^2=5,545(t_R/w_{0,5})^2$, pri čemu je w_b širina pika u osnovici, a $w_{0,5}$ širina pika na polovici visine. Povećanjem broja teorijskih tavana povećava se djelotvornost kromatografske kolone (Watson, 1999).

Korelacija između visine teorijskog tavana i brzine pokretne faze prikazana je van Deemterovom jednadžbom za tekućinsku kromatografiju:

$$H = \frac{A}{1 + C_m/v^{1/2}} + \frac{B}{v} + C_s v + C_m v^{1/2}$$

gdje H predstavlja visinu teorijskog tavana. v je linearna brzina mobilne faze, opisuje koliko cm/s kroz kolonu putuju molekule koje se ne zadržavaju. A je vrtložna difuzija. Molekule analita koje prolaze kroz kolonu zajedno s mobilnom fazom, vrte se, ne putuju samo pravocrtno

već mjestimice dolazi do vrtloženja što ovisi o tome nalazi li se molekula uz stijenkku kolone. B je brzina difuzije molekule u mobilnoj fazi koja može ići u smjeru kretanja mobilne faze ili u smjeru obrnutom od mobilne faze zbog difuzijskog koeficijenta. C_s je otpor prijenosu mase molekule u stacionarnoj fazi koji ovisi o difuzijskom koeficijentu te debljini stacionarne faze obložene silika gelom. C_m je otpor prijenosu mase ovisan o veličini i obliku stacionarne faze te brzini difuzije molekule u mobilnoj fazi (Watson, 1999).

Van Deemterova jednadžba govori o efikasnosti kolone te daje objašnjenje širenja kromatografskih pikova. Što je manja visina teorijskog tavana, više je uspostavljenih ravnoteža te je sama kolona efikasnija. Djelotvornost kolone ovisi o karakteristikama stacionarne faze poput veličine čestica (broj teorijskih tavana obrnuto je proporcionalan veličini čestica, stacionarna faza treba biti što jednoličnije nanosena), o protoku mobilne faze (optimalan protok, tj. odgovarajuća brzina pri kojoj je broj tavana najveći), o kinetičkim procesima u koloni (molekularna disperzija, vrtložna difuzija, difuzija u smjeru protoka mobilne faze, spori prijenos mase), o osobinama samog analita (npr. veličina i polarnost). Podešavajući navedene parametre prilikom analize, postiže se što djelotvornija kolona i bolja metoda (Watson, 1999; Sertić, 2013).

1.5. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je analitička tehnika koja se koristi za određivanje strukture i potvrdu identiteta ljekovitih tvari te određivanje molekulskih masa. Kao spregnuta tehnika s kromatografskim metodama (GC-MS, LC-MS) koristi se u istraživanju i razvoju lijekova, strukturnoj karakterizaciji, kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi onečišćenja te proteomici. Najprikladnija je metoda za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju onečišćenja i određivanje lijekova te njihovih metabolita u biološkim tekućinama jer je visoko selektivna, osjetljiva te ima niske granice detekcije (Nigović, 2018; Watson, 1999).

Ova analitička tehnika služi za razdvajanje ioniziranih molekula ili fragmenata molekula na temelju razlike u omjeru njihove mase i naboja (m/z). Instrument se sastoji od tri glavna dijela - ionizatora, analizatora i detektora (Sertić, 2013). Princip rada na kojem se temelji masena spektrometrija je razdvajanje ioniziranih molekula ili molekulskih fragmenata djelovanjem električnog ili magnetskog polja nakon ioniziranja molekula analita u plinskoj fazi (Watson, 1999).

Ionizacija molekula analita može se provesti na nekoliko načina te se tehnike ionizacije mogu podijeliti u dvije skupine. Postoji podjela na blage ionizacijske tehnike (engl. *soft*

ionization) i čvrste ionizacijske tehnike (engl. *hard ionization*). Podjela se temelji na osnovi količine energije koju se predaje molekuli te posljedično i fragmentaciji molekule analita. Kod blagih tehnika prevladava molekulski ion, dok je kod čvrstih tehnika izražena fragmentacija analita koja olakšava razjašnjenje strukture molekula na osnovi fragmenata (Nigović, 2018; Sertić, 2013).

Na osnovu toga razlikujemo: ionizaciju djelovanjem snopa elektrona (engl. *Electron Impact; EI*), kemijsku ionizaciju (engl. *Chemical Ionization, CI*), elektrosprej ionizaciju (engl. *Electrospray Ionization; ESI*), kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization; APCI*), ionizaciju fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photo Ionization; APPI*), matriksom potpomognutu ionizaciju laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization; MALDI*), ionizaciju bombardiranjem brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment; FAB*) i ionizaciju termoraspršenjem (engl. *Thermospay*) (Sertić, 2013).

Elektrosprej ionizacija najzastupljenija je tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS i kompatibilna je sa svim analizatorima. Uzorak iz kromatografske kolone prolazi kroz usku kapilaru čiji se kraj nalazi na visokom potencijalu (2-5 kV). Dolazi do raspršenja pokretne faze pri atmosferskom tlaku. Otapalo se raspršuje pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala te se kapljice smanjuju. Isparavanjem otapala kapljice pokretne faze postaju sve manje, povećava se površinski naboj dok ne prevladaju odbojne elektrostatske sile između iona, pri čemu se kapljice rasprsnu, a ioni analita prelaze u plinovitu fazu te ulaze u analizator. Elektrosprej ionizacijom nastaju jednostruko pozitivno ili negativno nabijeni ioni ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$), ioni aduktora (npr. $[M+Na]^+$ ili radikal kationi (M^+)). Makromolekule, poput proteina, ioniziraju na više mjesta te tvore višestruko nabijene ione ili zwitterione. Naboj nastalih iona ovisi o vrsti i strukturi analita te uvjetima analize, npr. mobilnoj fazi (Sertić 2013).

Analizator je dio masenog spektrometra gdje se ioni razdvajaju na osnovu različitog omjera mase i naboja. Različiti analizatori zahtijevaju različite izvore ionizacije i različite detektore (Cindrić i sur., 2009). Najčešće korišteni analizatori za razdvajanje iona su magnetski analizator, kvadrupolni, stupica za ione (engl. *Ion-trap*), analizator vremena leta (engl. *Time of flight; TOF*) i tandemska masena spektrometrija (MS/MS) (Nigović, 2018).

Stupica za ione analizator je koji za zadržavanje iona unutar vakuuma koristi i električno i magnetsko polje. Najčešće se koristi analizator s dvije kružne i dvije polukružne elektrode. Ulaskom u stupicu ioni osciliraju sve dok uslijed promjene napona ne budu izbačeni van čime je omogućeno zadržavanje samo jednog iona. Ostali ioni budu uklonjeni iz stupice. Izolirani ion može se fragmentirati primjenom plina helija. Fragmentirani ion koji se dobije, moguće je

ponovo izolirati te dalje dodatno fragmentirati. Stupica za ione omogućuje izolaciju i fragmentaciju iona u istom prostoru, tandemsku masenu spektrometriju (MS/MS) te zapravo MS^n analizu. Najveća prednost stupice za ione je mogućnost MS^n analize jer ostale vrste tandemске masene spektrometrije većinom omogućuju snimanje do MS^2 spektara (Sertić, 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vitamin B7, biotin, vitamin je iz skupine B-kompleksa. On je u vodi topljivi vitamin te je prisutan u mnogim namirnicama poput pivskog kvasca, iznutrica, žumanjka jajeta i mnogih drugih. Homeostaza biotina u ljudskom organizmu bitna je zbog toga što je on uključen u mnoge fiziološke procese, esencijalan je za normalnu funkciju stanica, za njihov rast i razvoj, prijenos živčanih impulsa kao i za zdravlje kože i kose. Ljudi ga sami ne mogu sintetizirati već se mora unositi hranom ili dodacima prehrani, različitim monovitaminskim ili multivitaminskim pripravcima.

Današnje tržište prepuno je vitaminskih dodataka prehrani koji ne podliježu strogim kontrolama kvalitete kao lijekovi. Bitno je provesti njihovu kvantitativnu analizu.

Cilj ovog diplomskog rada je optimizirati kromatografske uvjete analize, identificirati i odrediti sadržaj vitaminskom preparatu primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Vitaminski preparat kupljen je internet kupovinom te je oglašen kao monovitaminski pripravak koji sadrži 10 mg biotina dok je preporučeni prosječni dnevni unos biotina između 35 i 200 μg .

Vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, elektrosprej ionizatora i masene spektrometrije (HPLC-ESI-MS/MS) idealna je tehnika za analizu i strukturnu karakterizaciju biotina iz dodataka prehrani.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Metanol (J.T. Baker)

Mravlja kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Deionizirana voda pripravljena pomoću sustava za pročišćavanje vode WaterPro (Labonco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.2. Referentna supstanca

Biotin – Vitamin H, 300 µg (Natural Wealth)

3.1.3. Uzorci

Vitaminske tablete s 10 mg biotina

3.1.4. Plinovi

Dušik (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

Helij (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

3.1.5. Radni instrumenti

Vezani sustav tekućinske kromatografije (Agilent 1100 chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) i masene spektrometrije LC/MSD Trap VL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Analitička vaga AG 245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

Centrifuga mini G, 6000rpm (IKA, Germany)

Vortex mješalica (IKA, Germany)

Ultrazvučna kupelj (Xtra H Elmasonic, Elma)

Inkubator (Environmental shaker – incubator ES-20/60 (bioSan)

3.1.6. Pribor

Boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, SAD)

Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)

Kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 4,6 x 150 mm, 3,5 µm (Waters, Milford, SAD)

Mikropipete Rainin Pipet-lite (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

Nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

Odmjerne tikvice od 10 ml

Plastične epruvete od 1,5ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Filteri F PES promjer 25mm, pore 0.22µm (SterilTech Corporation, SAD)

Stakleni sustav za filtriranje mobilnih faza u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

Sustav za pročišćavanje vode WaterPro (Labonco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.7. Programski paketi

ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

Excel (Microsoft Office 2016)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine biotina pripremljene su vodenom ekstrakcijom biotina iz referentnih tableta Biotin – Vitamin H, 300 µg, Natural Wealth te razrijeđene prema potrebi.

Uzeto je 6 tableta koje su usitnjene i homogenizirane. Za analizu je u odmjernu tikvicu odvagana količina jedne tablete (0,1508 g), koja deklarirano sadrži 300 µg biotina, te dodan 1,0 ml deionizirane vode. Uzorak je promiješan na Vortex miješalici te inkubiran pod uvjetima: 50 °C, 100 rpm, 40 min. Nakon inkubiranja, uzorak je stavljen na ultrazvučnu kupelj na 10 min, otopina je centrifugirana 10 min na 6000 rpm te mikrofiltrirana.

Koncentracija inicijalne standardne otopine bila je 0,3 mg/ml iz koje je pripremljena serija standardnih otopina različitih koncentracija - 0,25 mg/ml, 0,20 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,05 mg/ml, dodatkom potrebnog volumena deionizirane vode.

3.2.2. Priprema ispitivanog uzorka

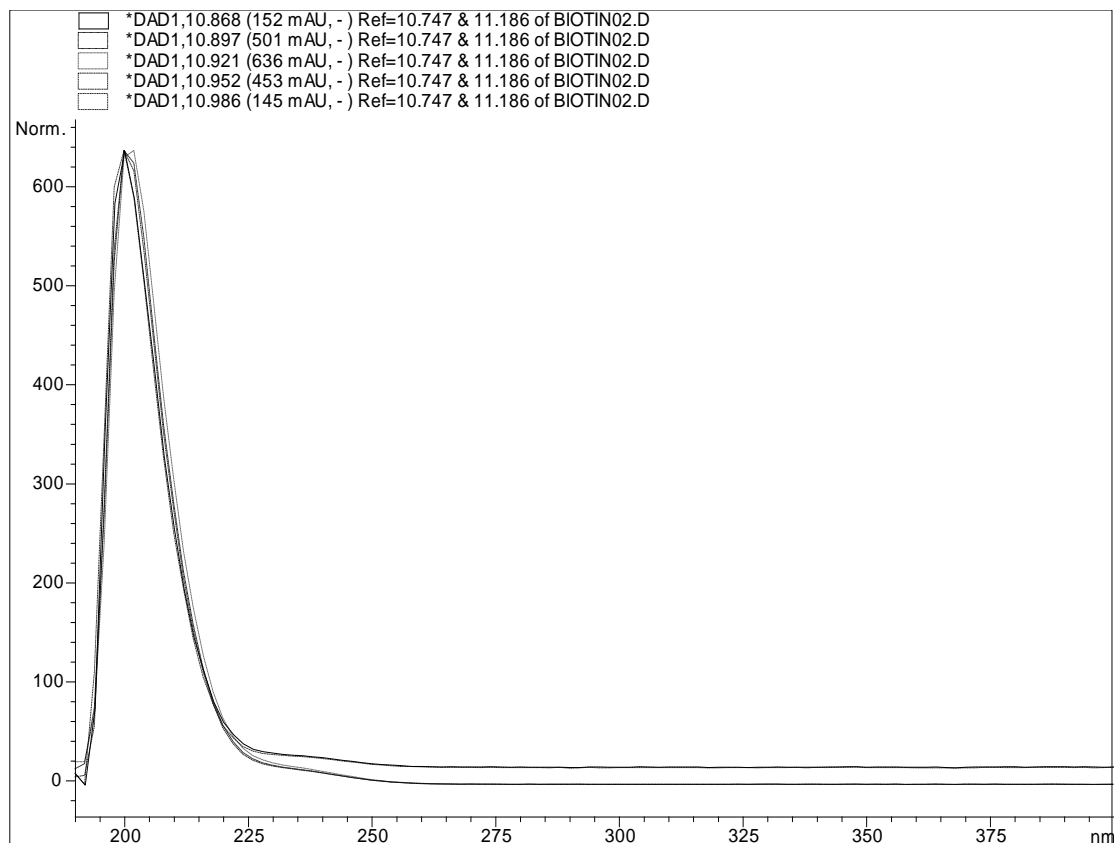
Ispitivani uzorak pripremljen je na isti način i pod istim uvjetima kao i standardna otopina.

Masa dviju tableta ispitivanog uzorka bila je 0,8006 g. Za analizu je odvagano 0,2002 g prethodno usitnjene tablete te dodano 8,0 ml deionizirane vode. Postupak pripreme uzorka isti je kao i za pripremu standardnih otopina. 50 µl tako pripremljene otopine uzorka razrijeđen je do 100 µl deioniziranom vodom.

3.2.3. Uvjeti kromatografske analize

Identifikacija biotina provedena je na Agilent 1100 kromatografskom sustavu, na koloni obrnutih faza Symmetry (Waters) C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 µm. Prilikom razvoja metode provedena je gradijentna i izokratna elucija s različitom brzinom protoka mobilne faze. Temperatura kolone bila je podešena na 30°C. Injektirano je 5 µl uzorka. Mobilna faza sastojala se od vode s 0,1% mravlje kiseline (A) te metanola s 0,1% mravlje kiseline (B).

Prema UV/Vis spektru standarda, radi boljeg maksimuma apsorpcije, kromatogrami su snimani na dvjema valnim duljinama: 200 nm i 210 nm detektorom s nizom dioda (engl. *Diode array detector, DAD*) što prikazuje Slika 2.



Slika 2. UV/Vis spektar biotina. Snimljeno detektorom s nizom dioda.

3.2.4. Uvjeti spektrometrijske analize

Strukturalna karakterizacija provedena je masenim spektrometrom koji se sastojao od elektrosprej ionizatora i analizatora stupica za ione. Korišteni instrument je Agilent 6300 Series Ion Trap.

Temperatura na izvoru iona za elektrosprej ionizaciju iznosila je 350°C. Korištena je elektrosprej ionizacija u pozitivnom načinu. Napon na kapilari bio je 3,0 kV. Kao plin za sušenje korišten je dušik pri protoku od 12 L/min. Kao plin za raspršivanje pokretne faze pri tlaku 40,0 psi također je korišten dušik. Kao plin za koliziju korišten je helij. Maseni spektri snimljeni su rasponu od 50 do 500 m/z .

Napravljena je MS, MS² i MS³ analiza.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje utjecaja sastava i brzine protoka mobilne faze na vrijeme zadržavanja analita

Kao mobilna faza u HPLC-u korištena je voda s 0,1% mravlje kiseline (A) te metanol s 0,1% mravlje kiseline (B).

Kako bi pik analita bio što veći i jasniji, prvo se provodila optimizacija kromatografskih uvjeta. Uvjeti su prikazani u Tablici 1 za gradijentnu eluciju, odnosno u Tablici 2 za izokratnu eluciju. Iz tabličnih prikaza vidi se kako je mijenjan udio mobilne faze, tj. njena polarnost i brzina protoka mobilne faze.

Tablica 1. Prikaz uvjeta mjerenja tijekom provedenih gradijentnih elucija

Redni broj mjerenja	1.	2.	3.
Vrijeme (min)	Udio eluenta B* (%) u prva tri mjerenja		
0 → 7	15	20	20
7 → 11	40	40	30
11 → 13	15	20	20
Brzina protoka mobilne faze (ml/min)	0,7	0,7	0,7
Vrijeme zadržavanja analita (min)	10,32	10,30	12,40

*B – metanol s 0,1% mravlje kiseline

U prva tri mjerenja provedena je gradijentna elucija, s udjelom od 15 do 40% mobilne faze B, pa udio od 20 do 40% mobilne faze B te udio od 20 do 30% mobilne faze B pri protoku mobilne faze od 0,7 ml/min. U prve dvije gradijentne elucije vrijeme zadržavanja bilo je oko 10,3 min. S obzirom da je biotin izrazito polarna molekula, topljiva u vodi, ravnoteža je pomaknuta prema mobilnoj fazi. U trećoj gradijentnoj eluciji vrijeme zadržavanja poraslo je na 12,4 min radi smanjenja udjela polarnog otapala i manje razlike u gradijentu.

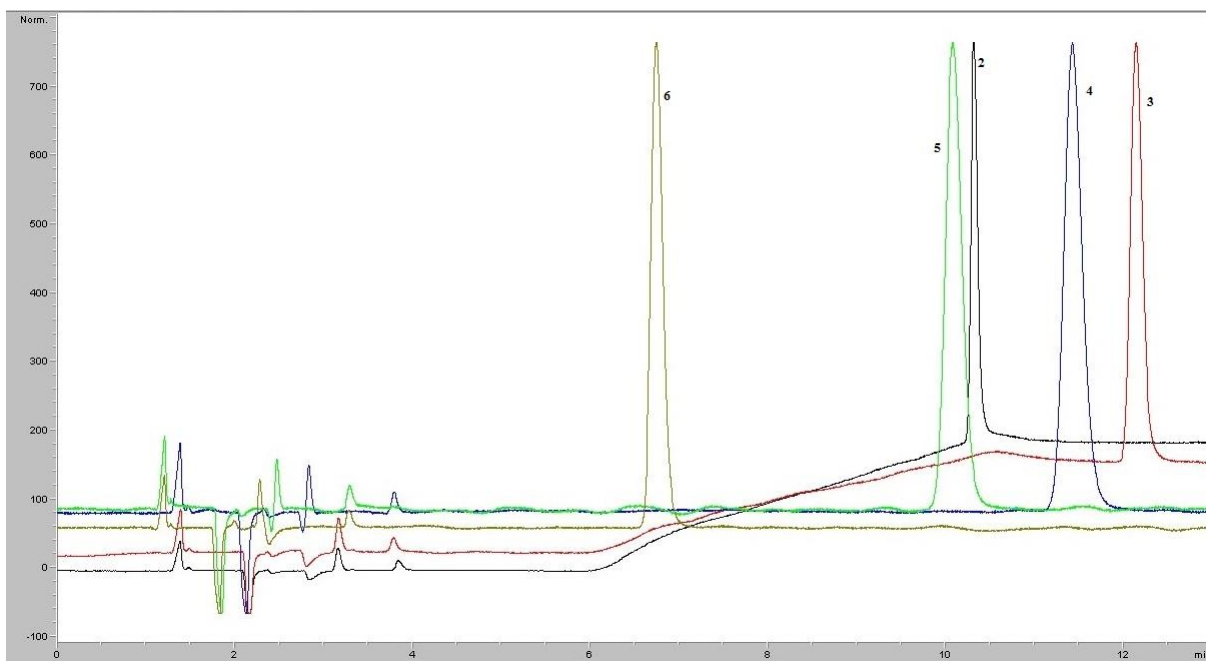
Tablica 2. Prikaz uvjeta mjerenja tijekom provedenih izokratnih elucija

Redni broj mjerenja	4.	5.	6.
Udio eluenta B* (%)	25	25	30
Brzina protoka mobilne faze (ml/min)	0,7	0,8	0,8
Vrijeme zadržavanja analita (min)	13,00	10,01	6,70

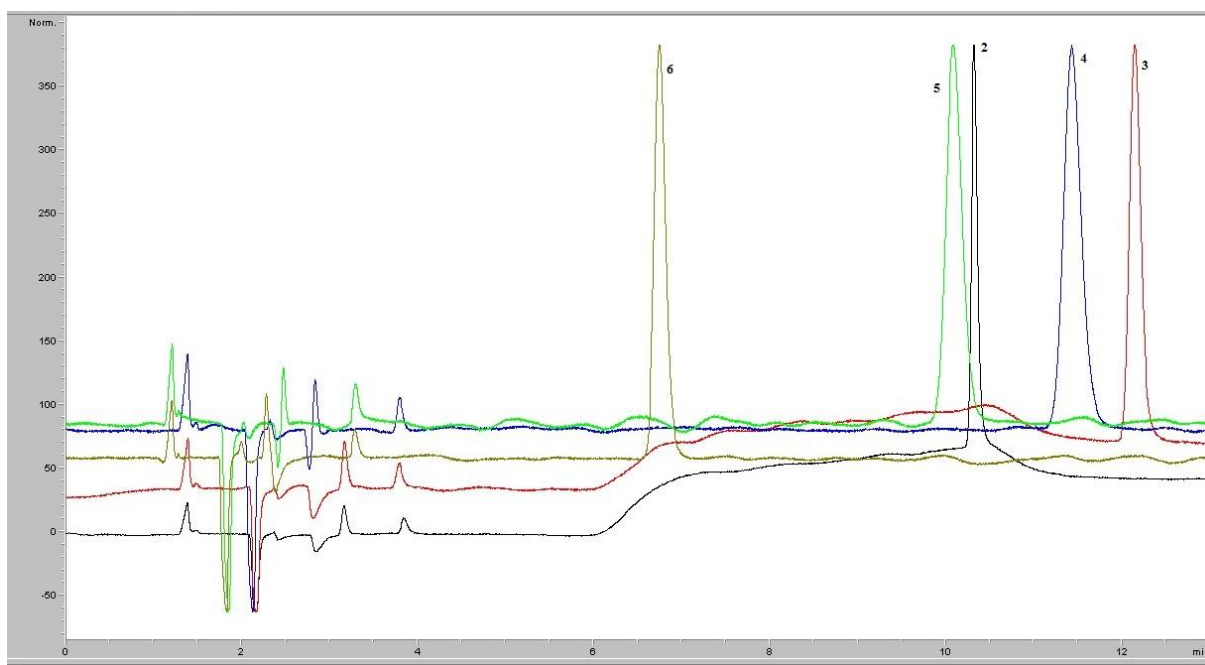
*B – metanol s 0,1% mravlje kiseline

U zadnja tri ispitivanja utjecaja sastava i brzine protoka mobilne faze provedena je izokratna elucija s udjelom od 25% mobilne faze B pri protoku mobilne faze od 0,7 ml/min i 0,8 ml/min, odnosno 30% mobilne faze B pri protoku mobilne faze od 0,8 ml/min. Vrijeme zadržavanja analita pri brzini protoka od 0,7 ml/min i udjelu od 25% mobilne faze B bilo je 13,0 min. Povećanjem brzine protoka na 0,8 ml/min pri istom udjelu mobilne faze, vrijeme zadržavanja smanjeno je na 10,01 min. Povećanjem udjela mobilne faze B na 30% pri brzini elucije mobilne faze od 0,8 ml/min, vrijeme zadržavanja bilo je 6,7 min.

UV/Vis kromatogrami standardnih otopina referentne supstance, dobiveni tijekom provedenih ispitivanja utjecaja sastava i brzine protoka mobilne faze na selektivnost i brzinu elucije, za mjerenja od dva do sedam, snimljeni pri 200 nm prikazani su na Slici 3, odnosno pri 210 nm na Slici 4.

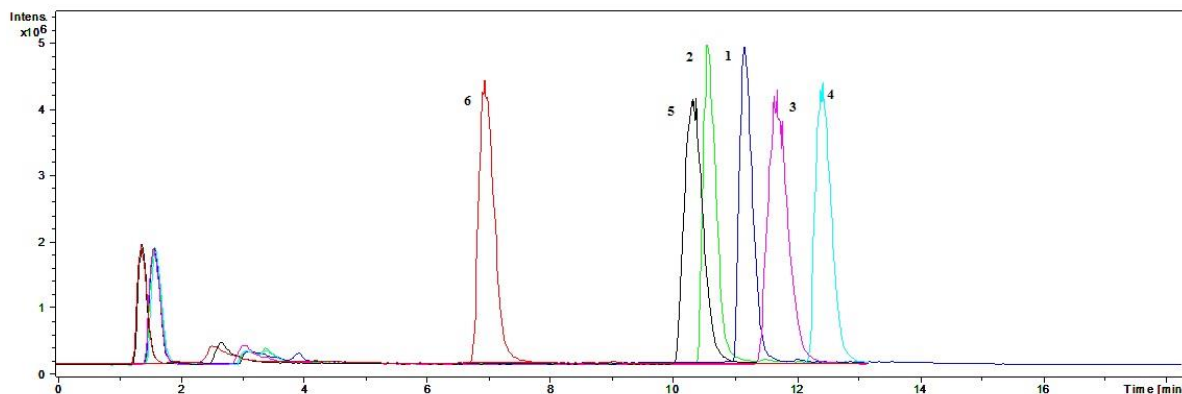


Slika 3. UV/Vis kromatogrami standardnih otopina dobiveni tijekom optimizacije kromatografskih uvjeta pri 200 nm. Kromatografski uvjeti analize za mjerenja od 2 do 6 prikazani su u Tablici 1 i Tablici 2



Slika 4. UV/Vis kromatogrami standardnih otopina dobiveni tijekom optimizacije kromatografskih uvjeta pri 210 nm. Kromatografski uvjeti analize za mjerenja od 2 do 6 prikazani su u Tablici 1 i Tablici 2

Tijekom optimizacije kromatografskih uvjeta, uz UV/Vis kromatograme, snimljeni su i MS kromatogrami koji su prikazani na Slici 5.



Slika 5. MS kromatogrami standardnih otopina dobiveni tijekom optimizacije kromatografskih uvjeta. Kromatografski uvjeti analize prikazani su u Tablici 1 i Tablici 2

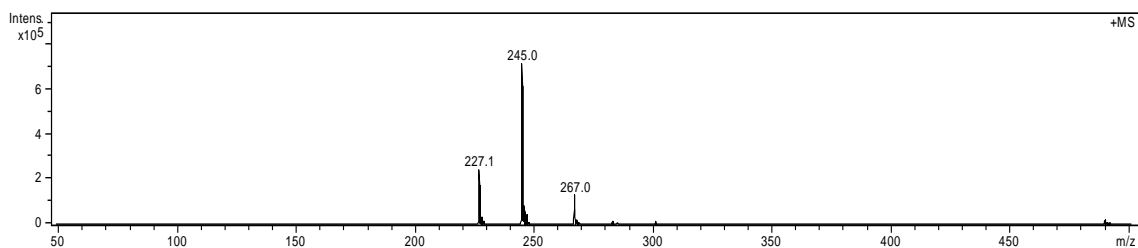
Uvidjelo se da su najpovoljniji uvjeti iz ispitivanja pod rednim brojem 6 – 30% mobilne faze B pri 0,8 ml/min.

Povećanjem brzine protoka mobilne faze skraćeno je vrijeme analize što nije utjecalo na izgled pikova.

4.2. Identifikacija masenom spektrometrijom

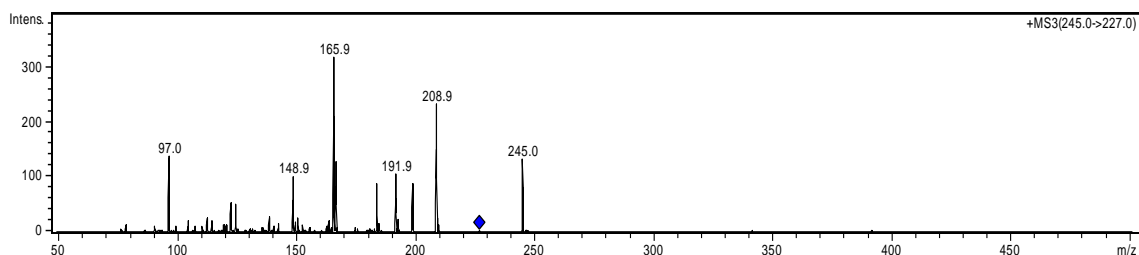
Strukturalna identifikacija uzorka provedena je masenom spektrometrijom. Uz jednostruku MS analizu, provedene su i MS² te MS³ analiza.

Na Slici 6 prikazan je MS spektar referentnog uzorka biotina na kojem se vidi ioni m/z 227, 245 i 267. Ion m/z 227 je fragment nastao dehidratacijom karboksilne skupine biotina. Ion m/z 245 je jednostruko pozitivno nabijeni ion $[M+H]^+$, a ion m/z 267 je ion aduktor $[M+Na]^+$.



Slika 6. Maseni spektar referentnog uzorka biotina dobiven MS analizom. Snimljeno masenim spektrometrom (Agilent 6300 Series Ion Trap)

Spektar dobiven MS³ analizom referentnog uzorka biotina prikazan je na Slici 7. Izoliran je ion m/z 227 te su daljnom fragmentacijom dobiveni ioni različitih omjera masa i naboja.

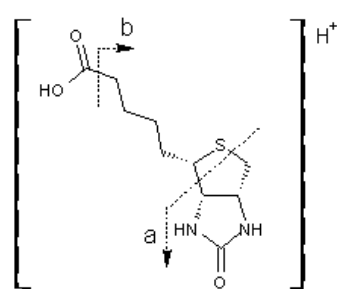


Slika 7. Maseni spektar referentnog uzorka biotina dobiven MS³ analizom. Snimljeno masenim spektrometrom (Agilent 6300 Series Ion Trap)

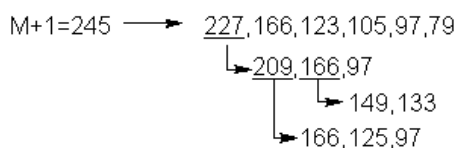
Fragmentacijom iona pri m/z 245 kao produkti su dobiveni ioni m/z 209, 192, 166, 149 te 97. Dobiveni ioni, produkti fragmentacije, slažu se sa shemom fragmentacije biotina (www.metabolomics.jp). Shema fragmentacije i kemijske formule fragmenata prikazani su na Slici 8.

Ion m/z 245 je jednostruko pozitivno nabijeni ion. Produkti fragmentacije m/z 227 i 209 su rezultati dehidracije karboksilne skupine biotina, odnosno dvostruke dehidracije, a dodatnim gubitkom amonijaka dobiva se ion m/z 192. Ion m/z 166 je ion s kemijskom formulom C₉H₁₂NS, a njegovim gubitkom amonijaka nastaje ion m/z 149. Ion m/z 97 predstavlja 5-metil-2-okso-imidazol nastao pucanjem veza u tetrahidrotiofenskom prstenu iz m/z 209.

Biotin B20+



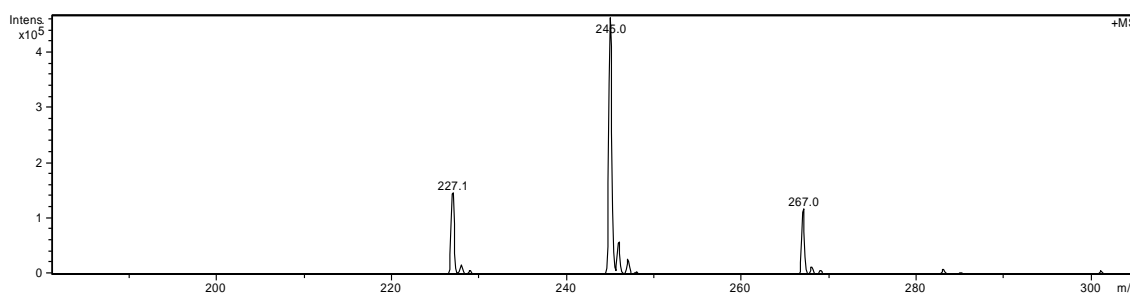
M+1=245



227: -H₂O (C₁₀H₁₅N₂O₂S)
209: -2H₂O (C₁₀H₁₃N₂O₂S)
199:b (C₉H₁₅N₂O₂S)
192: -2H₂O, -NH₃ (C₁₀H₁₀NOS)
184: (C₉H₁₄NOS)
166: (C₉H₁₂NS)
149: (C₉H₉S)
139: (C₈H₁₁S)
123: (C₇H₇S)
105: (C₈H₉) or (C₅H₁₃S)
97:a (C₄H₅N₂O)
91: (C₇H₇)
79: (C₆H₇)
77: (C₆H₅)
67: (C₅H₇)
55: (C₄H₇)

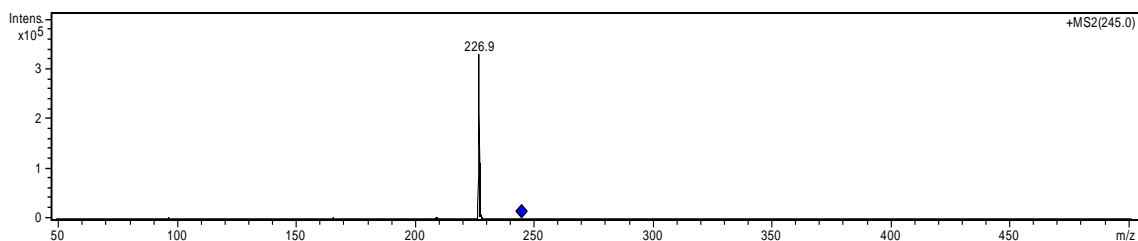
Slika 8. Prikaz molekulske mase fragmenata iona biotina dobivenih masenom spektrometrijom i njihove kemijske formule. (www.metabolomics.jp)

Na Slici 9 prikazan je maseni spektar nepoznatog uzorka biotina. MS analizom dobiveni su ioni m/z 267, 245 i 227. MS spektar uzorka biotina podudara se s MS spektrom referentnog uzorka biotina prikazanog na Slici 6.



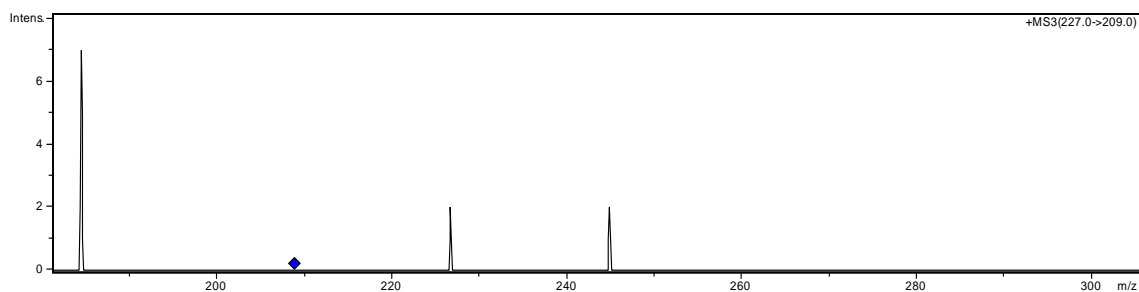
Slika 9. Maseni spektar nepoznatog uzorka biotina dobiven MS analizom. Snimljeno masenim spektrometrom (Agilent 6300 Series Ion Trap)

Na spektru dobivenom u tandemskoj masenoj spektroskopiji, izoliran je jednostruko pozitivno nabijeni ion $[M+H]^+$, m/z 245, te je fragmentacijom dobiven ion m/z 227. Spektar je prikazan na Slici 10.



Slika 10. Maseni spektar nepoznatog uzorka biotina dobiven MS^2 analizom molekuskog iona m/z 245. Snimljeno masenim spektrometrom (Agilent 6300 Series Ion Trap)

U MS^3 analizi nepoznatog uzorka biotina, izoliran je ion m/z 227 a daljnjom fragmentacijom su dobiveni ioni m/z 209 i m/z 184. MS^3 spektar je prikazan na Slici 11.



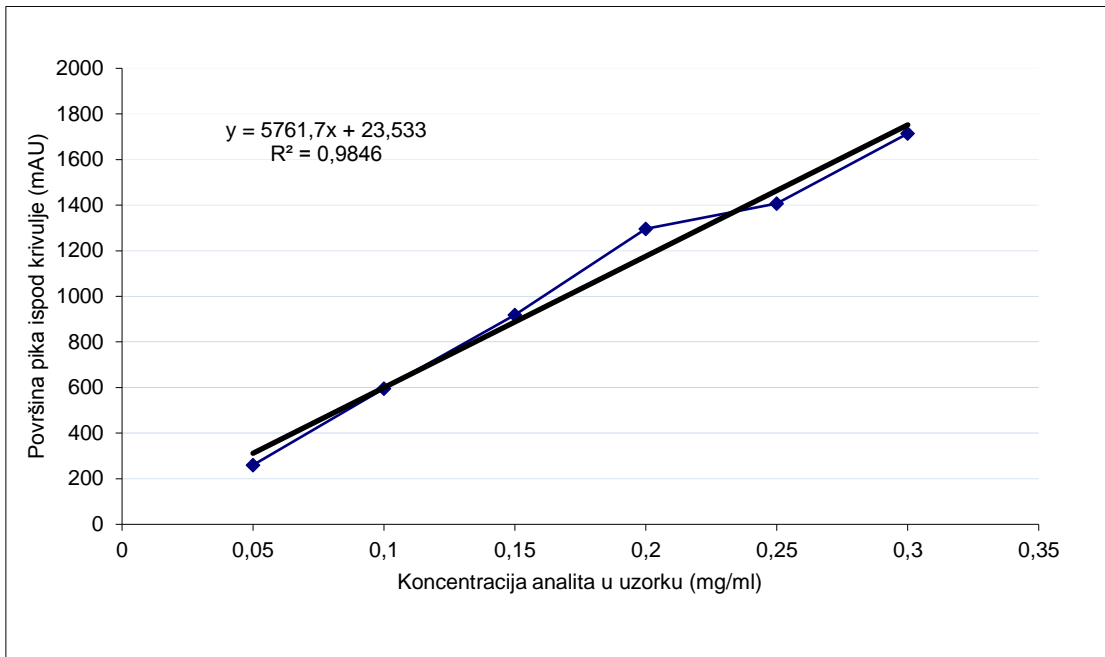
Slika 11. Maseni spektar nepoznatog uzorka biotina dobiven MS^3 analizom. Snimljeno masenim spektrometrom (Agilent 6300 Series Ion Trap)

Usporedbom masenih spektara referentne tvari i uzorka, potvrđeno je da se u uzorku nalazi biotin.

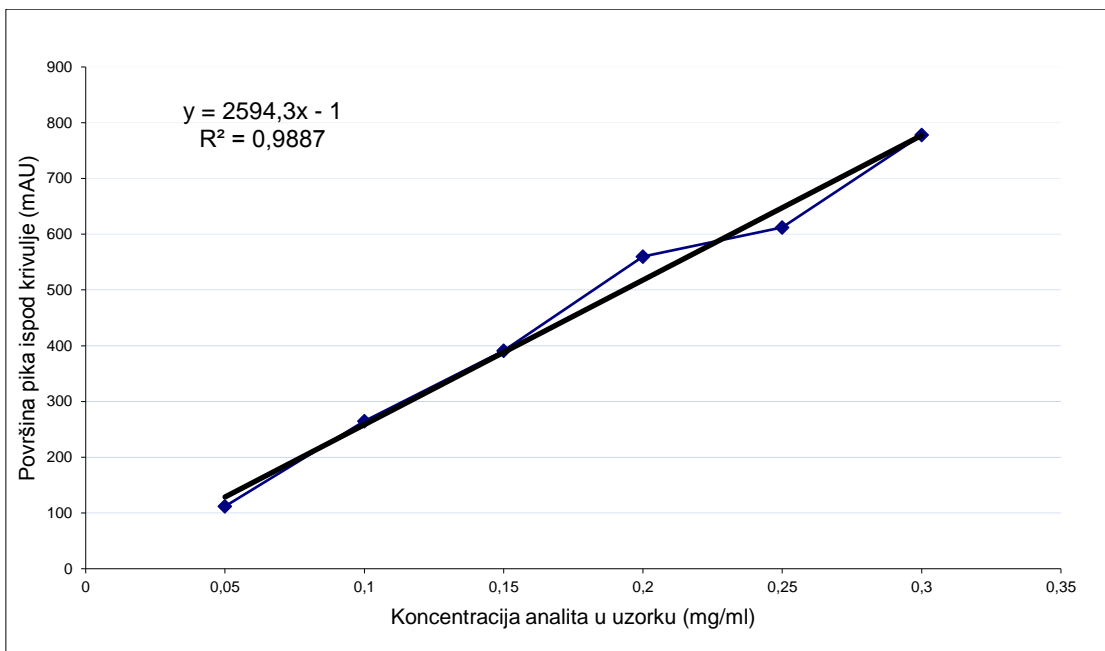
4.3. Određivanje sadržaja biotina

Za određivanje sadržaja biotina u nepoznatom uzorku korištena je metoda vanjskog standarda. Pripremljena je serija otopina različitih koncentracija referentnog uzorka u rasponu koji pokriva područje u kojem je očekivana koncentracija analita iz uzorka. Površine ispod pikova mjerile su se pri 200 nm i 210 nm.

Iz poznatih koncentracija standardnih otopina i dobivenih površina ispod pika napravljene su odgovarajuće kalibracijske krivulje metodom najmanjih kvadrata. Grafički prikaz ovisnosti dobivenih signala instrumenta pri 200 nm, prikazan je na Slici 12, odnosno pri 210 nm na Slici 13.



Slika 12. Kalibracijska krivulja ovisnosti površine ispod pika o koncentraciji analita pri 200 nm

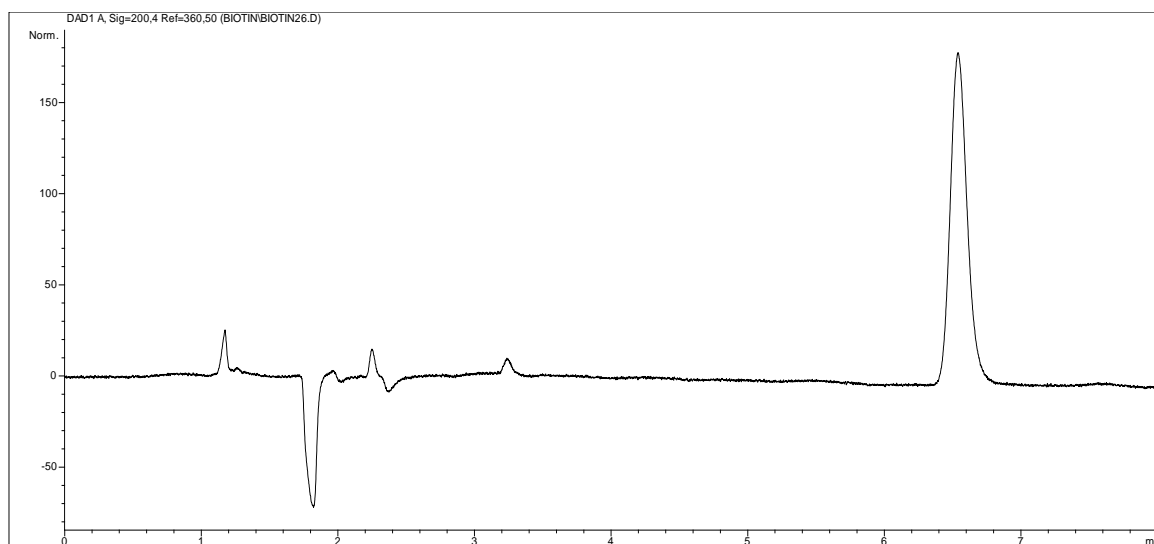


Slika 13. Kalibracijska krivulja ovisnosti površine ispod pika o koncentraciji analita pri 210 nm

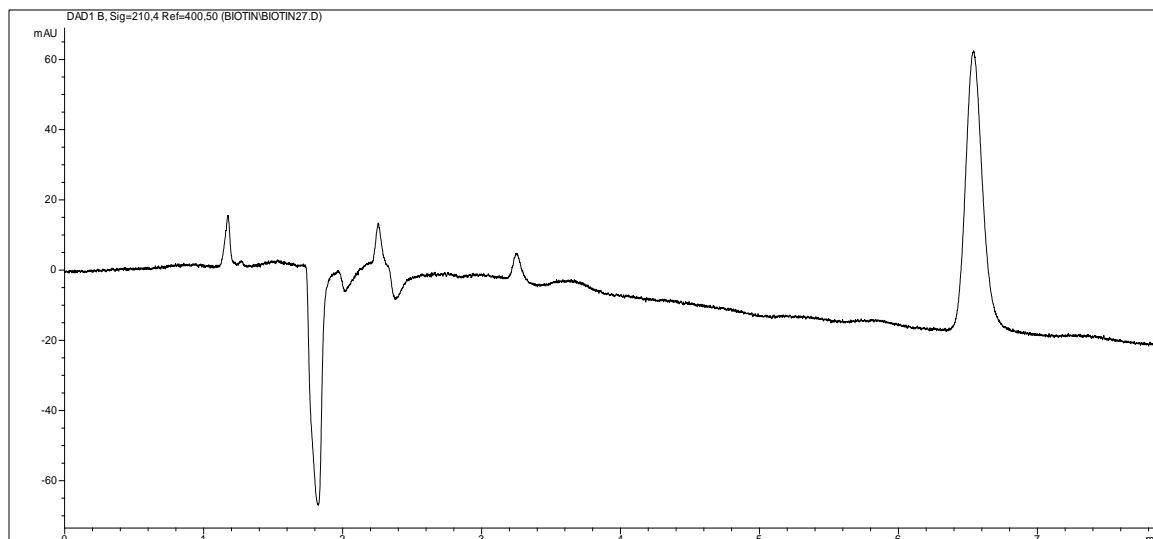
Jednadžba regresijskog pravca pri 200 nm iznosila je $y = 5761,7x + 23,533$, a koeficijent korelacije 0,9846. Jednadžba regresijskog pravca pri 210 nm iznosila je $y = 2594,3x - 1$, a koeficijent korelacije 0,9887.

Kada je analitički signal proporcionalan koncentraciji analita, koeficijent korelacije regresijskog pravca mora biti veći od 0,999. U ovim je mjerenjima koeficijent korelacije bio manji od 0,999.

Kromatogrami uzoraka biotina, dobiveni DAD detektorom, prikazani su na Slici 14 za prvo mjerenje, odnosno na Slici 15 za drugo mjerenje. Kao dodatna potvrda da se u uzorku nalazi biotin poslužilo nam je vrijeme zadržavanja od 6,7 min koje je jednako vremenu zadržavanja referentnog biotina pri istim uvjetima analize.



Slika 14. UV/Vis kromatogram nepoznatog uzorka biotina dobiven u prvom mjerenju pri 200 nm



Slika 15. UV/Vis kromatogram nepoznatog uzorka biotina dobiven u drugom mjerenju pri 200 nm

4.4. Određivanje koncentracije biotina

Iz dobivenih kalibracijskih krivulja, interpolacijom površine pika uzorka biotina nepoznate koncentracije, izračunata je njegova koncentracija i određen sadržaj biotina u uzorku.

Jednadžba kalibracijskog pravca pri 200 nm je:

$$y = 5761,7x + 23,533, \text{ odnosno: } A \text{ (mAU)} = 5761,7(\text{ml/mg})c + 23,533$$

$$c_{(\text{biotin})} = \frac{A \text{ (mAU)} - 23,533}{5761,7(\text{ml/mg})}$$

Jednadžba kalibracijskog pravca pri 210nm:

$$y = 2594,3x - 1, \text{ odnosno: } A \text{ (mAU)} = 2594,3(\text{ml/mg})c - 1$$

$$c_{(\text{biotin})} = \frac{A \text{ (mAU)} + 1}{2594,3(\text{ml/mg})}$$

Količina biotina u uzorku za analizu:

$$m_{(\text{biotin})} = c_{(\text{biotin})} * \frac{100\mu\text{l}}{50\mu\text{l}} * 8\text{ml}$$

Količina biotina u jednoj tableti uzorka:

$$\frac{m(\text{biotin u 1 tableti uzorka})}{m(1 \text{ tablete})} = \frac{m(\text{biotin u uzorku uzetom za analizu})}{m(\text{uzorak uzet za analizu})}$$

$$m(\text{biotin u 1 tableti uzorka}) = \frac{m(\text{biotin u uzorku uzetom za analizu}) * m(1 \text{ tablete})}{m(\text{uzorak uzet za analizu})}$$

Vrijednosti koncentracije i količine biotina u ispitivanoj otopini, kao i njegova količina u jednoj tableti uzorka, dobivene koristeći navedene izraze, prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz dobivenih rezultata mjerenja i izračuna koncentracije i sadržaja biotina.

Valna duljina	Broj uzorka biotina	1	2
200 nm	Površina pika ispod krivulje (mAU)	1552,97	1570,69
	Koncentracija uzorka biotina (mg/ml)	0,265	0,268
	Sadržaj biotina u uzorku (mg)	4,240	4,288
	Količina biotina u tableti uzorka (mg)	8,478	8,574
210 nm	Površina pika ispod krivulje (mAU)	672,00	674,69
	Koncentracija uzorka biotina (mg/ml)	0,259	0,260
	Sadržaj biotina u uzorku (mg)	4,144	4,160
	Količina biotina u tableti uzorka (mg)	8,286	8,318

Prosječna vrijednost koncentracije biotina bila je 0,263 mg/ml. Standardno odstupanje izmjerenih koncentracija biotina bilo je $\pm 0,0042$.

Prosječna vrijednost količine biotina u jednoj tableti ispitivanog uzorka bila je 8,414 mg. Standardno odstupanje izmjerene količine biotina bilo je $\pm 0,1357$.

5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu upotrebom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i masene spektrometrije (MS) provedena je optimizacija kromatografskih uvjeta, strukturna identifikacija biotina i određen njegov sadržaj u nepoznatom uzorku kupljenom internet kupovinom.

Unatoč mnogim postojećim razvijenim i validiranim metodama analize, odgovarajuća HPLC metoda provedena u ovom radu omogućuje jednostavnu i brzu kvantifikaciju biotina u vitaminskim dodacima prehrani, pogotovo monovitaminским, zbog kratkog trajanja analize kao i jednostavne pripreme uzoraka i ekstrakcije analita.

Izokratna elucija s mobilnom fazom sastava voda:metanol:mravlja kiselina = 70:30:0,1 (v/v/v), pri brzini protoka od 0,8 ml/min pokazala se kao najprikladnija za LC-MS analizu uzorka.

Na temelju provedene MSⁿ analize i strukturne karakterizacije uzorka, kao i vremena zadržavanja analita, potvrđeno je da se u ispitivanom uzorku doista nalazi biotin.

S obzirom na to da za analizu nije bila dostupna kemijska poredbena tvar, koristio se drugi uzorak monovitaminčkog dodatka kao referentna supstanca. Dobiveni rezultat potvrđuje da je biotin u vitaminskom preparatu, kupljenom internet kupovinom, prisutan u količini od 8,4 mg što približno odgovara deklariranom sadržaju od 10 mg.

6. LITERATURA

1. Ball GFM. Water-soluble Vitamin Assays in Human Nutrition. Frimley, Surrey, Chapman & Hall, 1994, str. 318.
2. Biotin, 2019., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin>, pristupljeno 28. 7.2019.
3. Caballero B. Encyclopedia of Human Nutrition. U: Biotin: Physiology, Dietary Sources, and Requirements. Mock DM, urednik, Elsevier, 2013, str. 182-190.
4. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina*, 2009, 45, 218-232.
5. Combs GFJr, McClung JP. The Vitamins. U: Vitamin A. London, Elsevier, 2017, str. 210-214.
6. Combs GFJr, McClung JP. The Vitamins. U: Vitamin C. London, Elsevier, 2017, str. 268-271.
7. Combs GFJr, McClung JP. The Vitamins. U: Vitamin K. London, Elsevier, 2017, str. 244-248.
8. Combs GFJr, McClung JP. The Vitamins. U: What Is a Vitamin?. London, Elsevier, 2017, str. 3-6.
9. Dasgupta A. Biotin and Other Interferences in Immunoassays. U: Biotin: Pharmacology, Pathophysiology, and Assesment of Biotin Status. St. Louis, Elsevier, 2019, str. 17-35.
10. Ekpe AE, Hazen C. Liquid chromatographic determination of biotin in multivitamin-multimineral tablets. *J Pharmaceut Biomed*, 1998, 16, 1311-1315.
11. European Pharmacopoeia, 9th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2016
12. Harrington D. Laboratory Assesment of Vitamin Status. U: Methods for assessment of biotin (Vitamin B7). Carling RS, Turner C, urednici, Cambridge, Academic Press, 2019, str. 193-217.
13. Lawrance P, Patel I. The determination of biotin in food using HPLC. Government Chemist Programme Report, 2014. Report no. LGC/R/2014/378
14. Livaniou E, Costopoulou D, Vassiliadou I, Leondiadis L, Nyalala JO, Ithakissios DS, Evangelatos GP. Analytical techniques for determining biotin. *J Chromatogr A*, 2000, 881, 331-343.
15. MD1003 Factsheet, 2016., <http://www.mssociety.ca>, pristupljeno 11.9.2019.
16. Nigović B. Interna skripta – predavanja. Masena spektrometrija, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), Vezani sustavi u analitici lijekova, 2018.
17. Ponder EL, Fried B, Sherma J. Thin-layer chromatographic analysis of hydrophilic vitamins

- in standards and from *Helisoma trivolvis* snails. *Acta Chromatogr*, 2004, 4, 70-81.
18. Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina. Doktorski rad. Zagreb, 2013, str. 20-25.
 19. Sim HJ, Kim B, Lee J. A Systematic Approach for the Determination of B-Group Vitamins in Multivitamin Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry. *J AOAC Int*, 2016, 99, 1223-1232.
 20. Similar Molecules of Biotin, 2011., <http://metabolomics.jp/wiki/Ojima.KOX00126p>, pristupljeno 07.08.2019.
 21. Vitamin D, 2005.; Vitamin E, 2005., <http://www.vitamini.hr>, pristupljeno 28.7.2019.
 22. Vitamini B-kompleksa, 2019., <http://www.vitamini.hr>, pristupljeno 28.7.2019.
 23. Walsh MI, Rizk M, Sheribah ZA, Salim MM. Kinetic Spectrophotometric Determination of Biotin in Pharmaceutical Preparations. *Int J Biomed S*, 2008, 4, 238-244.
 24. Watson DG. Mass Spectrometry. U: *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Edinburgh, Elsevier, 1999, str. 167- 193.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Vitamini su esencijalni nutrijenti za ljudski organizam i sudjeluju u mnogim fiziološkim procesima te doprinose zdravlju, ali i izgledu. Postoje vitamini koji su topljivi u mastima i vitamini topljivi u vodi. Ovaj rad se temelji na vitaminima topljivim u vodi jer je biotin dio vitamina B-kompleksa topljivih u vodi.

Zbog nemogućnosti unosa preporučene dnevne doze vitamina hranom, i potencijalnog rješavanja zdravstvenih tegoba, ljudi sve više posežu za dodacima prehrani. Tržište je bogato multivitaminским pripravcima koji ne podliježu strogoj kontroli kvalitete, a mnogi od njih sadrže količinu suplemenata manju od deklarirane.

Cilj ovog rada je potvrditi prisutnost biotina u monovitaminском pripravku masenom spektrometrijom, optimizirati uvjete kromatografske analize za njegovu analizu te odrediti sadržaj biotina u vitaminskom pripravku. Za analizu je korišten vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, elektrosprej ionizatora i masene spektrometrije (HPLC-ESI-MS/MS).

Najprije je odabran udio i brzina protoka mobilne faze. Primjenjena je izokratna elucija s mobilnom fazom sastava voda:metanol:mravlja kiselina = 70:30:0,1 (v/v/v), pri brzini protoka od 0.8 ml/min. Zatim je provedena fragmentacija i MSⁿ analiza uz pomoć masenog spektrometra, što je rezultiralo utvrđivanjem karakterističnih fragmenata i strukturnom identifikacijom biotina u uzorku.

Za analizu nije bila dostupna kemijska poredbena tvar te se kao referentna supstanca koristio drugi uzorak monovitaminского dodatka. Ista referentna supstanca se koristila i za kvantitativnu analizu. Dobiveni rezultati potvrđuju da se u analiziranom vitaminskom preparatu, kupljenom internet kupovinom, nalazi biotin i da je prisutan u količini od 8,4 mg što približno odgovara deklariranom sadržaju od 10 mg.

7.2. Summary

Vitamins are the essential nutrients in the human organism involved in many physiological processes, contributing to both, the health and the good look. There are water-soluble and fat-soluble vitamins. This thesis is based on water-soluble vitamins since biotin is part of vitamin B complex which are water-soluble.

Due to the inability of the intake of recommended dietary allowance of vitamins via food, and the potential of resolving the health issues, people are increasingly reaching out for the food supplements. There are multivitamin preparations on the market that are not subject to strict quality control, many of which containing less than the declared amount of supplements.

The aim of this study is to confirm the presence of the biotin in the monovitamin food supplement by mass spectrometry, to optimize the conditions of its chromatographic analysis and to determine the biotin content in vitamin preparation. Liquid chromatography coupled with electrospray ionization and mass spectrometer (HPLC-ESI-MS/MS) was used for analysis.

The content and mobile phase flow rate were selected first. Isocratic elution with mobile phase consisting of water:methanol:formic acid = 70:30:0,1 (v/v/v), at the flow rate of 0.8 ml/min was used followed by the fragmentation and MSⁿ analysis, resulting in the identification of the characteristic fragments and the structural identification of biotin in the sample.

No chemical reference standard of biotin was available, hence another monovitamin food supplement was used as reference substance. The same reference substance was also used for quantification. The results show that biotin is present in the analysed vitamin food supplement, which were purchased through internet shopping. The defined amount of biotin in the sample is 8.4 mg that approximately corresponds to the sample declaration of 10 mg of biotin.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA BIOTINA U TABLETAMA PRIMJENOM VEZANOG SUSTAVA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE I MASENE SPEKTROMETRIJE

Barbara Matelić

SAŽETAK

Vitamini su esencijalni nutrijenti za ljudski organizam i sudjeluju u mnogim fiziološkim procesima te doprinose zdravlju, ali i izgledu. Postoje vitamini koji su topljivi u mastima i vitamini topljivi u vodi. Ovaj rad se temelji na vitaminima topljivim u vodi jer je biotin dio vitamina B-kompleksa topljivih u vodi.

Zbog nemogućnosti unosa preporučene dnevne doze vitamina hranom, i potencijalnog rješavanja zdravstvenih tegoba, ljudi sve više posežu za dodacima prehrani. Tržište je bogato multivitaminskim pripravcima koji ne podliježu strogoj kontroli kvalitete, a mnogi od njih sadrže količinu suplemenata manju od deklarirane.

Cilj ovog rada je potvrditi prisutnost biotina u monovitaminom pripravku masenom spektrometrijom, optimizirati uvjete kromatografske analize za njegovu analizu te odrediti sadržaj biotina u vitaminskom pripravku. Za analizu je korišten vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, elektrosprej ionizatora i masene spektrometrije (HPLC-ESI-MS/MS).

Najprije je odabran udio i brzina protoka mobilne faze. Primjenjena je izokratna elucija s mobilnom fazom sastava voda:metanol:mravlja kiselina = 70:30:0,1 (v/v/v), pri brzini protoka od 0.8 ml/min. Zatim je provedena fragmentacija i MSⁿ analiza uz pomoć masenog spektrometra, što je rezultiralo utvrđivanjem karakterističnih fragmenata i strukturnom identifikacijom biotina u uzorku.

Za analizu nije bila dostupna kemijska poredbena tvar te se kao referentna supstanca koristio drugi uzorak monovitaminog dodatka. Ista referentna supstanca se koristila i za kvantitativnu analizu. Dobiveni rezultati potvrđuju da se u analiziranom vitaminskom preparatu, kupljenom internet kupovinom, nalazi biotin i da je prisutan u količini od 8,4 mg što približno odgovara deklariranom sadržaju od 10 mg.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 32 stranica, 15 grafičkih prikaza, 3 tablice i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: biotin, vitamin, HPLC/DAD/MS

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ana Mornar Turk, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF BIOTIN CONTENT IN TABLETS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY

Barbara Matelić

SUMMARY

Vitamins are the essential nutrients in the human organism involved in many physiological processes, contributing to both, the health and the good look. There are water-soluble and fat-soluble vitamins. This thesis is based on water-soluble vitamins since biotin is part of vitamin B complex which are water-soluble.

Due to the inability of the intake of recommended dietary allowance of vitamins via food, and the potential of resolving the health issues, people are increasingly reaching out for the food supplements. There are multivitamin preparations on the market that are not subject to strict quality control, many of which containing less than the declared amount of supplements.

The aim of this study is to confirm the presence of the biotin in the monovitamin food supplement by mass spectrometry, to optimize the conditions of its chromatographic analysis and to determine the biotin content in vitamin preparation. Liquid chromatography coupled with electrospray ionization and mass spectrometer (HPLC-ESI-MS/MS) was used for analysis.

The content and mobile phase flow rate were selected first. Isocratic elution with mobile phase consisting of water:methanol:formic acid = 70:30:0.1 (v/v/v), at the flow rate of 0.8 ml/min was used followed by the fragmentation and MSⁿ analysis, resulting in the identification of the characteristic fragments and the structural identification of biotin in the sample.

No chemical reference standard of biotin was available, hence another monovitamin food supplement was used as reference substance. The same reference substance was also used for quantification. The results show that biotin is present in the analysed vitamin food supplement, which were purchased through internet shopping. The defined amount of biotin in the sample is 8.4 mg that approximately corresponds to the sample declaration of 10 mg of biotin.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 15 figures, 3 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: biotin, vitamin, HPLC/DAD/MS

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019