

## PŮVODNÍ PRÁCE

# Stanovenie tiamínu a pyridoxínu vo výživových doplnkoch a nápojoch jednoduchou metódou kapilárnej zónovej elektroforézy v spojení s UV detekciou

## Determination of thiamine and pyridoxine in food supplements and beverages by the simple capillary zone electrophoresis in combination with UV detection

Michaela Matušková • Ivana Čižmárová • Peter Mikuš • Juraj Piešťanský

Došlo 10. novembra 2020 / Prijato 8. decembra 2020

### Súhrn

Práca sa zameriava na vývoj jednoduché analytickej metódy na báze kapilárnej zónovej elektroforézy v spojení s UV-detekciou pre simultánne stanovenie tiamínu a pyridoxínu vo vzorkách farmaceutického a potravinárskeho charakteru. Separácia tiamínu a pyridoxínu prebiehala v elektrolytovom systéme 25 mmol · l<sup>-1</sup> GABA + 50 mmol · l<sup>-1</sup> HAc + 0,05% m-HEC. Detekcia bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 260 nm. Medza detekcie pre tiamín bola 0,059 µg · ml<sup>-1</sup> a pre pyridoxín 0,23 µg · ml<sup>-1</sup>. Tieto hodnoty naznačujú, že metóda je vhodná na stanovenie relatívne nízkych koncentrácií tiamínu a pyridoxínu. Uvedená CZE-UV metóda umožnila efektívne stanovenie obsahu dvojice vitamínov v piatich výživových doplnkoch a jedenástich energetických nápojoch a vitamínových vodách.

**KLúčové slová:** tiamín • pyridoxín • kapilárna zónová elektroforéza • UV detekcia • kontrola kvality

### Summary

The paper is focused on development of a simple analytical method based on capillary zone electrophoresis in combination with UV-detection for simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceutical and food samples. The separation of thiamine and pyridoxine was performed in a background electrolyte composed of 25 mmol · l<sup>-1</sup> GABA + 50 mmol · l<sup>-1</sup> HAc + 0.05% m-HEC. The UV detector was set at

the constant wavelength of 260 nm. Limit of detection was 0.059 µg · ml<sup>-1</sup> for thiamine and 0.23 µg · ml<sup>-1</sup> for pyridoxine. These levels suggest that relatively low quantities of thiamine and pyridoxine can be detected. The presented CZE-UV method enabled effective determination of the two vitamins in 5 food supplements and 11 energy drinks and vitamin waters.

**Key words:** thiamine • pyridoxine • capillary zone electrophoresis • UV detection • quality control

### Úvod

Vitamíny predstavujú živiny, ktoré sú potrebné pre zabezpečovanie mnohých fyziologických funkcií nevyhnutných pre život. Na rozdiel od iných tried živín vitamíny nedisponujú štruktúrnymi funkciami, a rovnako tak ich katabolizmus nepredstavuje významný zdroj energie. Ich úlohy v organizme sú však veľmi špecifické, preto sú potrebné iba v malých množstvách<sup>1</sup>. Zvyčajne sú súčasťou procesov spojených so zabezpečením a reguláciou normálneho metabolizmu. Vitamíny skupiny B reprezentujúce skupinu vo vode rozpustných látok, pôsobia prevažne ako koenzýmy energetického metabolizmu alebo sú významné z hľadiska tvorby nových buniek<sup>2</sup>. Mimoriadna pozornosť zo širokého spektra B vitamínov, je v súčasnosti venovaná predovšetkým vitamínu B<sub>1</sub> a B<sub>6</sub>, a to na základe ich pozitívneho vplyvu na liečbu viacerých ochorení<sup>3</sup>.

Vitamín B<sub>1</sub> (tiamín), chemicky 2-(3-((4-amino-2-metylpyrimidin-5-yl)metyl)-4-metyl-1,3-tiazol-3-ium-5-yl) etanol, vo svojej aktívnej forme priamo zasahuje do katabolizmu sacharidov a tvorby energie<sup>4-6</sup>. Absorbácia tiamínu prebieha v tenkom čreve saturabilným mechanizmom, kedy maximálne vstrebané množstvo z jednotlivej dávky predstavuje 2,5 mg. Jeho denná spotreba sa pohybuje na úrovni 0,8 – 1,5 mg<sup>7</sup>. Nedostatok vitamínu B<sub>1</sub> sa prejavuje nešpecifickými symptómami ako anorexia, slabosť, periférna parestézia a vyúsťuje do choroby beri-beri.

PharmDr. Juraj Piešťanský, PhD.\* (✉) • Matušková M. • Čižmárová I. • Mikuš P.\*

Univerzita Komenského, Farmaceutická fakulta

Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie

\*Toxikologické a antidopingové centrum

Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: piestansky@fpharm.uniba.sk

Rizikovými faktormi, ktoré môžu viesť k B<sub>1</sub> hypovitaminóze, sú napr. nadmerná konzumácia alkoholu a kofeínu, dlhodobý stres, namáhavé cvičenie, diabetes alebo gravidita<sup>8)</sup>.

Vitamín B<sub>6</sub> (pyridoxín), chemicky 4,5-bis(hydroxymetyl)-2-metylpyridín-3-ol, je najdôležitejším koenzýmom v metabolizme aminokyselín, homocysteínu, glukózy a lipidov, zároveň je nevyhnutý v procese tvorby neurotransmiterov a syntéze DNA a RNA<sup>9)</sup>. Špecifickú úlohu zohráva i v metabolizme proteínov a červených krviniek, súčasne je dôležitý pre správne fungovanie imunitného systému<sup>10)</sup>. Denná dávka pyridoxínu u dospelého jedinca je v rozpätí 1,2 – 2 mg. Jeho nedostatok sa prejavuje veľmi zriedkavo, pričom vedie ku kožným lézám, poruchám v metabolizme aminokyselín, zvýšenej neuromuskulárnej dráždivosti a môže dôjsť i k epileptickým záchvatom<sup>4)</sup>. Pyridoxín veľmi často vstupuje do interakcií s rozličnými liečivami. Ako príklad možno uviesť zníženú biologickú dostupnosť pyridoxínu pri podávaní penicilamínu, cykloserínu, hydralazínu alebo hormonálnej antikoncepcie<sup>7)</sup>, prípadne zníženie účinnosti levodopy pri súčasnom podávaní pyridoxínu už v dávke 5 mg<sup>11)</sup>.

V súčasnej hektickej dobe čoraz viac ľudí siaha po multivitaminových prípravkoch, pretože ich užívanie považujú za súčasť zdravého životného štýlu. Vitamínové prípravky sú k dispozícii vo forme liekov, výživových doplnkov alebo dietetických potravín. Vitamíny skupiny B sú zároveň i súčasťou nápojov modernej doby – energetické nápoje a vitamínové vody, ktoré sú mimoriadne obľúbené najmä u mladších užívateľov. Zámerom energetických nápojov je poskytovať energiu na zlepšenie výkonu. Ich spotreba v súčasnosti neustále rastie aj vďaka vysokým nárokom na výkon jednotlivca v spoločnosti. Usudzuje sa, že prítomnosť B vitamínov v energetických nápojoch je prínosná, keďže sú schopné efektívnym spôsobom konvertovať cukor, ktorý je obsiahnutý v takýchto nápojoch vo veľkom množstve, na energiu<sup>10)</sup>. Na druhej strane dlhodobý príjem vysokých dávok pyridoxínu prítomného v daných nápojoch môže viesť k vzniku neuropatie<sup>12)</sup>.

Stabilita niektorých vitamínov je ovplyvnená viacerými externými faktormi, ako je napríklad pH, teplota alebo svetlo, ktoré výrazným spôsobom môžu redukovat' ich obsah vo výživových doplnkoch alebo spomínaných energetických a funkčných nápojoch. I z tohto dôvodu je potrebné realizovať kontrolu ich obsahu v predmetných vzorkách, a to analytickými metódami charakterizovanými vysokou presnosťou, správnosťou, robustnosťou, adekvátnou citlivosťou, selektivitou, rýchlosťou analýzy, jednoduchosťou prevedenia, ale i nízkymi nákladmi. Popri chromatografických metódach reprezentujúcich zlatý štandard v oblasti analýzy vzoriek farmaceutického, potravinárskeho alebo biomedicínskeho charakteru sa ako perspektívne javia metódy kapilárnej elektroforézy (CE). Je to na základe viacerých výhod, ktorými CE disponuje, a to: 1. vysoká separačná účinnosť, 2. relatívne krátky čas analýzy, 3. minimálne nároky na spotrebu rozpúšťadiel a vzoriek, 4. práca vo vodnom prostredí (ekologický aspekt)<sup>13)</sup>. Preferovanými CE módmi v prípade analý-

zy vitamínov sú kapilárna zónová elektroforéza (CZE) a predovšetkým micelárna elektrokinetická chromatografia (MEKC)<sup>2, 14)</sup>. Vyvinuté metódy MEKC v spojení s UV alebo DAD detekciou aplikované na hodnotenie predmetných vitamínov v multivitaminových doplnkoch stravy<sup>15–20)</sup> alebo energetických nápojoch<sup>17, 21)</sup> poskytovali hodnoty medze dôkazu (LOD) na úrovni 0,05 – 5 µg · ml<sup>-1</sup> pre tiamín a na úrovni 0,08 – 0,2 µg · ml<sup>-1</sup> pre pyridoxín. Popísané bolo i spojenie MEKC s ampérometrickou elektrochemickou detekciou<sup>22)</sup>. Metódou CZE v spojení s UV detekciou boli analyzované vitamíny v rozličných liekových formách<sup>23–26)</sup>, pričom dosiahnuté boli hodnoty LOD na úrovni 1,5 – 5,2 µg · ml<sup>-1</sup> pre tiamín a na úrovni 0,9 – 2,6 µg · ml<sup>-1</sup> pre pyridoxín. CZE v spojení s pokročilým typom detekcie reprezentovaným tandemovou hmotnostnou spektrometriou bol taktiež použitý pri hodnotení obsahu vitamínov v liekových formách a výživových doplnkoch, pričom boli dosiahnuté hodnoty LOD 0,1047 µg · ml<sup>-1</sup> pre tiamín a 0,1398 µg · ml<sup>-1</sup> pre pyridoxín<sup>27)</sup>. Všetky z uvedených CE metód boli realizované v zariadeniach pracujúcich v hydrodynamickej otvorenej móde. Nevýhodou takýchto systémov je vysoká medza dôkazu (LOD) determinovaná limitovaným množstvom vzorky (niekoľko desiatok nl), ktoré je možné do systému injektovať. Z tohto dôvodu je potrebné pristúpiť pred samotným analytickým krokom často k predúprave vzoriek spojených s ich zakonzentrovaním, alebo k použitiu citlivejších detekčných techník, ako je napríklad fluorescencia alebo hmotnostná spektrometria. Na druhej strane systémy pracujúce v hydrodynamickej uzatvorenej móde sú charakteristické použitím separačných kapilár s väčším vnútorným priemerom, čo zároveň umožňuje dávkovať vzorku na úrovni stoviek nl až desiatok µl. Takýmto spôsobom je výrazne zvýšená schopnosť analýzy látok prítomných vo vzorke na nízkych koncentračných úrovniach<sup>28)</sup>.

Cieľom našej práce bolo vyvinutie jednoduchej CZE metódy v spojení s UV detekciou realizovanej v hydrodynamickej uzatvorenej elektroforetickom móde, ktorá by umožňovala simultánnu analýzu tiamínu a pyridoxínu vo vzorkách farmaceutického i potravinárskeho charakteru.

## Pokusná časť

### Inštrumentácia

Na prevedenie CZE experimentov bol použitý elektroforetický analyzátor EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovenská republika) v jednokolónovom usporiadaní umožňujúcom CZE analýzu. Vzorka bola do analyzátora injektovaná prostredníctvom dávkovacieho bloku s integrovanou 200 nl vnútornou slučkou. Separčná kolóna bola tvorená polytetrafluóretylénovou kapilárkou s vnútorným priemerom 300 µm a celkovou dĺžkou 160 mm, pričom bola súčasťou bloku so zabudovaným vodivostným detektorom a UV koncovkou. K elektroforetickému analyzátoru bol pomocou UV koncovky a optických vlákien (J & M, Aalen, Nemecko) pripojený UV detektor (ECOM, Praha, Česká republika), ktorý bol

nastavený na konštantnú vlnovú dĺžku 260 nm. Merania boli realizované pri laboratórnej teplote. Údaje získavané z CZE analyzátora boli zaznamenávané a vyhodnocované s použitím softvérového programu ITP Pro32 (Villa Labeco).

### **Chemikálie a vzorky**

Všetky chemikálie použité na prípravu elektrolytových roztokov boli p. a. analytickej čistoty a boli zakúpené v spoločnostiach Merck (Darmstadt, Nemecko), Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko) a Fluka (Buchs, Švajčiarsko). Štandardy vitamínov skupiny B analytickej čistoty – hydrochlorid tiamínu a hydrochlorid pyridoxínu – boli získané zo Sigma Aldrich. Na prípravu elektrolytových roztokov, roztokov štandardov a vzoriek bola použitá demineralizovaná voda získaná s použitím purifikačného systému Millipore Simplicity 185 (UV) (Millipore, Molsheim, Francúzsko). Všetky pripravené roztoky elektrolytov boli pred použitím filtrované membránovými filtrami s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) a skladované pri teplote 2 – 8 °C. Súčasťou elektrolytových roztokov bola i metylhydroxyetylcelulóza (m-HEC), s koncentráciou 0,05 % (w/v), ktorá bola získaná zo spoločnosti Fluka.

Vzorky multivitaminových efervescentných tabliet (ADDITIVA Multivitamin Tropic tbl eff, B-komplex GENERICA forte plus tbl eff, CEMIO Switzerland Multivitamin tbl eff, ZDROVIT MM tbl eff, GS Multivitamin tbl eff) boli zakúpené v miestnej lekárni. Vzorky energetických nápojov (Hell Active, Tiger, Semtex Energy High, Powerking, Red Bull, Monster Energy, Steiger Radler Energy, Alcohol  $\beta\text{G}$  Killer, Oshee Vitamin Energy Magnesium + B6 + vitamin B5) a vitamínových vôd (Body & Future Vitamin Water Active, Dr. Witt Relax) boli zakúpené v miestnom obchode.

### **Príprava roztokov štandardov a vzoriek**

Zásobný roztok štandardov dvojice vitamínov skupiny B bol pripravený rozpustením 10 mg ich štandardov v 10 ml demineralizovanej vody. Pracovné roztoky zmesi štandardov o požadovaných koncentráciách (koncentračný rozsah tiamínu 0,19 – 78,68  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , koncentračný rozsah pyridoxínu 0,41 – 82,27  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) sme pripravili riedením základných roztokov štandardov demineralizovanou vodou.

Vzorky šumivých tabliet boli pripravené rozpustením jednej šumivej tablety v 100 ml demineralizovanej vody. Takto pripravený zásobný roztok vzorky bol následne vystavený pôsobeniu ultrazvukového kúpeľa počas 15 minút a potom filtrovaný membránovými filtrami s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Vzorky šumivých tabliet boli následne injektované do CZE analyzátora priamo alebo po vhodnom nariadení demineralizovanou vodou. Vzorky energetických nápojov a vitamínových vôd boli vystavené pôsobeniu ultrazvukového kúpeľa počas 15 minút. Takto upravené vzorky boli filtrované cez membránové filtre s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) a priamo injektované do CZE analyzátora. Každá zo vzoriek bola premeriavaná trikrát.

### **Príprava vzoriek pre hodnotenie výťažnosti**

Pre hodnotenie výťažnosti boli do roztoku reálnych matric (šumivá tableta, energetický nápoj) pridávané štandardné prídavky tiamínu a pyridoxínu. Pripravené boli tri vzorky s koncentraciami pridaného roztoku štandardu tiamínu na úrovni 0,59; 3,93 a 59,01  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a štandardu pyridoxínu na úrovni 0,62; 4,11 a 61,70  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Súčasne bola pripravená i jedna vzorka bez prídavku štandardu. Všetky vzorky boli následne mechanicky pretrepávané počas 5 minút a pred vlastnou analýzou filtrované cez membránové filtre s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$ . Každá zo vzoriek bola premeriavaná trikrát.

### **Výsledky a diskusia**

#### **Optimalizácia CZE-UV metódy**

Proces optimalizácie CZE-UV metódy pre analýzu dvojice vitamínov skupiny B (tiamín, pyridoxín) spočíval vo výbere vhodného zloženia, iónovej sily a pH nosného elektrolytu (BGE), nastavenia hodnoty separačného prúdu a výbere vhodných detekčných podmienok. Výber zloženia BGE a veľkosti separačného prúdu boli realizované s cieľom dosiahnutia rýchlych analýz charakterizovaných vysokou separačnou účinnosťou a zároveň s cieľom minimalizácie tepelných a elektromigračných disperzných procesov. V našej práci bola detailne testované tri typy elektrolytov, a to kyselina mravčia – HFO, kyselina octová – HAc, a zmes kyseliny  $\gamma$ -aminomaslovej (GABA) s kyselinou octovou. Z uvedených testovaných elektrolytových systémov bol na základe stanovených kritérií napokon pre ďalšie experimenty zvolený elektrolyt pozostávajúci zo zmesi 25 mmol  $\cdot \text{l}^{-1}$  GABA a 50 mmol  $\cdot \text{l}^{-1}$  HAc (pH = 4,05), ktorého súčasťou bola i 0,05% m-HEC. Prídavok m-HEC do BGE zabezpečil dynamické pokrytie vnútorného povrchu separačnej kapiláry, čo na jednej strane zabránilo adhézii analytov na jej povrch a na strane druhej viedlo k supresii elektroosmotického toku, ktorý je v prípade elektroforetických systémov pracujúcich v hydrodynamicky uzatvorenom móde nežiadúci. Separácia tiamínu a pyridoxínu bola optimálna pri hodnote prúdu 50  $\mu\text{A}$ . Detekcia prostredníctvom UV bola realizovaná pri konštantnej vlnovej dĺžke 260 nm reprezentujúcej kompromis medzi absorpčnými maximami jednotlivých analyzovaných látok. Uvedené separačné a detekčné podmienky reprezentujúce vhodný kompromis medzi rozlíšením analytov, časom analýzy, reprodukovateľnosťou meraní a medzou dôkazu viedli k úspešnej separácii požadovaných analytov z matric testovaných vzoriek.

#### **Validácia**

Zoptimalizovaná CZE-UV metóda pre analýzu tiamínu a pyridoxínu bola následne validovaná na základe odporúčaní smernice ICH<sup>29</sup>. Parametrami hodnotenými v procese validácie boli: linearita, presnosť (vyjadrená ako opakovateľnosť), medza dôkazu (limit of detection – LOD), medza stanovenia (limit of quantification – LOQ), robustnosť a správnosť. Niektoré z validačných a operačných parametrov sú zosumarizované v tabuľke 1.

Linearita bola hodnotená na základe opakovaných meraní zmesi štandardov tiamínu a pyridoxínu na šiestich koncentračných úrovniach, a to v rozsahu kalibračných meraní ( $0,19 - 78,68 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pre tiamín a  $0,41 - 82,27 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pre pyridoxín). Z nameraných hodnôt bola zostrojená kalibračná krivka vyjadrujúca závislosť plochy píku od koncentrácie štandardu daného analytu. Parametre kalibračnej krivky boli vyhodnotené s použitím softvérového programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) a sú predmetom tabuľky 1. Na základe príslušných parametrov a hodnôt koeficientov stanovenia ( $r^2$ ) pre dané analyty možno konštatovať dobrú linearitu kalibračných kriviek v zvolenom koncentračnom rozmedzí. Súčasne pri hodnotení parametrov kalibračných kriviek bol vykonaný test štatistickej významnosti úseku kalibračnej krivky. Hodnoty  $p$  úseku jednotlivých kalibračných kriviek boli v rozmedzí  $0,35 - 0,86$  na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Uvedené dáta indikujú, že parameter  $a$  (úsek kalibračných kriviek) sa štatisticky významne nelíši od nulovej hodnoty.

Hodnoty medze dôkazu (LOD) a medze stanovenia (LOQ) boli vyjadrené na základe pomeru signál/šum (S/N), pričom platilo, že  $\text{LOD} = 3\text{S/N}$  a  $\text{LOQ} = 10\text{S/N}$ . Predikované hodnoty LOD a LOQ tiamínu a pyridoxínu boli na sub  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  úrovniach, ktoré sú dokonca porovnateľné s hodnotami dosiahnutými metódou kapilárnej elektroforézy v hydrodynamicky otvorenom móde v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou<sup>27)</sup>.

Presnosť metódy bola určená na základe hodnôt relatívnej štandardnej odchýlky plochy analytického signálu ( $\text{RSD}_{\text{plocha}}$ ) a migračného času ( $\text{RSD}_{\text{tm}}$ ) vzoriek s koncentráciou v rozsahu kalibračnej krivky. Každá vzorka o požadovanej koncentrácii bola opakovane premeraná šesťkrát. Dosiahnuté výsledky RSD hodnôt reflektujú veľmi dobrú optimalizáciu metódy a jej opakovateľnosť (RSD migračného času bola na úrovni menej ako 1,5 % a RSD plochy píku bola úrovni okolo 5 %). Rovnakým spôsobom bola hodnotená i medziľahlá presnosť, kedy analýzy boli vykonané iným pracovníkom. Dosiahnuté hodnoty  $\text{RSD}_{\text{tm}}$  a  $\text{RSD}_{\text{plocha}}$  boli na úrovni 1,4 %, resp. 4,4 %.

Správnosť metódy bola overená na základe testu výťažnosti. Ten bol prevedený ako štandardný prídavok roztoku štandardu tiamínu a pyridoxínu o troch rozličných koncentráciách do roztokov matric – lieková forma (šumivá tableta), energetický nápoj (obr. 1). Výťažnosť bola počítaná na základe vzťahu: výťažnosť (%) =  $100 \times [c(\text{matrica} + \text{prídavok}) - c(\text{matrica})]/c(\text{prídavok})$ . Výsledky získané z daného experimentu sú zosumarizované v tabuľke 2 a svedčia o zanedbateľnom vplyve matrice na analytický signál testovaných vitamínov. Zároveň preukazujú akceptovateľnú mieru správnosti vyvinutej CZE-UV metódy.

Robustnosť, ktorá reprezentuje spoľahlivosť metódy pri vykonaní malých zmien operačných parametrov, bola testovaná prostredníctvom: 1. zmeny koncentrácie nosného elektrolytu o  $\pm 2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a 2. prostredníctvom

Tab. 1. Kalibračné a vybrané separačné parametre tiamínu a pyridoxínu

	Tiamín	Pyridoxín
$t_m$ (min)	10,33	16,19
$\text{RSD}_{\text{tm}}$ (%), n = 6	1,49	1,07
$\text{RSD}_{\text{plocha}}$ (%), n = 6	3,79	5,07
a (counts)	16,189	-6,496
$\text{RSD}_a$ (%), n = 6	5,40	5,22
b (counts $\cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{ml}$ )	140,10	46,41
$\text{RSD}_b$ (%), n = 6	1,72	0,38
$r^2$	0,9956	0,9998
LOD ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	0,059	0,23
LOQ ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	0,197	0,411
N	15238	12320
H ( $\mu\text{m}$ )	0,11	0,13
R	12,7	

$t_m$  – migračný čas, N – účinnosť, H – výškový ekvivalent teroretickej priehradky, R – rozlíšenie. Separačná účinnosť (N) bola počítaná na základe vzťahu  $N = 5,545(t_m/w_{1/2})^2$ , kde  $w_{1/2}$  je šírka píku v polovici jeho výšky. Kalibračná krivka bola vyjadrená vzťahom  $y = b \cdot x + a$ .  $\text{RSD}_{\text{tm}}$  a  $\text{RSD}_{\text{plocha}}$  boli počítané zo vzoriek na koncentračnej úrovni zodpovedajúcej LOQ.

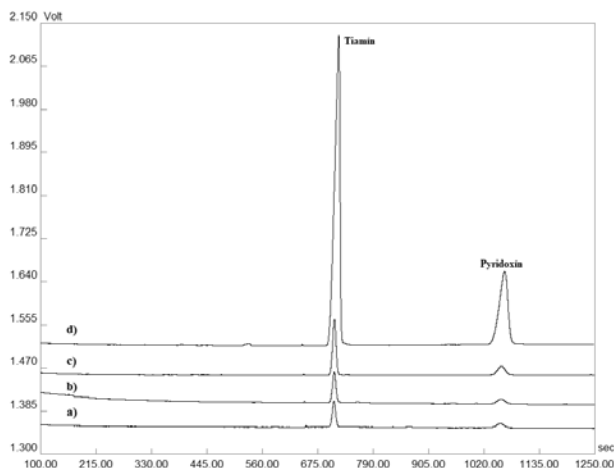
Tab. 2. Správnosť CZE-UV metódy overená ako výťažnosť

	Tiamín			Pyridoxín		
Prídavok ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	0,590	3,934	59,008	0,617	4,114	61,703
Priemer ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	0,584	3,850	57,778	0,623	4,140	62,679
RSD (%)	6,9	4,3	3,7	9,0	4,4	4,0
Výťažnosť (%)	98,9	97,9	97,9	101,0	100,6	101,6

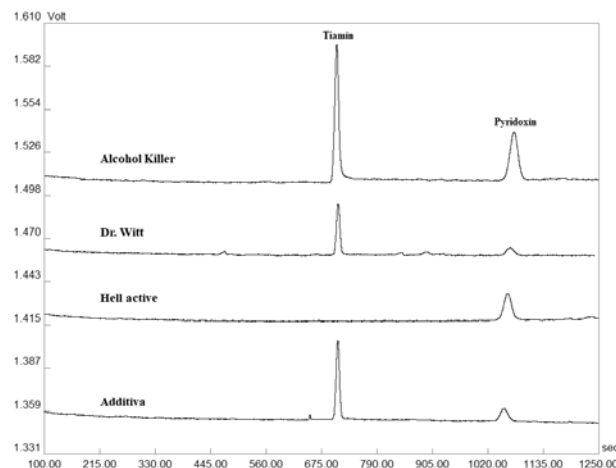
zmeny hodnoty pH nosného elektrolytu o  $\pm 0,1$  jednotky. Zmeny uvedených parametrov nemali významný vplyv na priebeh analýzy a zároveň ani na intenzitu analytického signálu testovaných látok. Z uvedeného vyplýva, že metódu je možné pokladať za dostatočne robustnú.

### Aplikácia

Na základe mimoriadne priaznivých validačných parametrov bola zoptimalizovaná CZE-UV metóda aplikovaná pri simultánnom stanovení dvojice vitamínov skupiny B – tiamínu a pyridoxínu – v piatich vzorkách farma-



Obr. 1. Reprezentatívne elektroforeogramy získané z validačného procesu testovania výťažnosti: a) matrica (šumivá tableta), b) matrica s prídavkom  $0,590 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  tiamínu a  $0,617 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pyridoxínu, c) matrica s prídavkom  $3,934 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  tiamínu a  $4,114 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pyridoxínu, d) matrica s prídavkom  $59,008 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  tiamínu a  $61,703 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pyridoxínu. Detekcia bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 260 nm. Veľkosť separačného prúdu bola  $50 \mu\text{A}$ . Ostatné separačné podmienky sú uvedené v časti Optimalizácia CZE-UV metódy.



Obr. 2. Reprezentatívne elektroforeogramy získané z analýzy tiamínu a pyridoxínu v reálnych vzorkách šumivých tabliet, energetických nápojov a vitamínových vôd. Detekcia bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 260 nm. Veľkosť separačného prúdu bola  $50 \mu\text{A}$ . Ostatné separačné podmienky sú uvedené v časti Optimalizácia CZE-UV metódy.

Tab. 3. Stanovenie obsahu tiamínu a pyridoxínu vo výživových doplnkoch, energetických nápojoch a vitamínových vodách

	Tiamín ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	RSD (%)	Deklarovaný obsah ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	Pyridoxín ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	RSD (%)	Deklarovaný obsah ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
Additiva	$22,88 \pm 0,77$	3,4	22	$27,51 \pm 0,28$	1,0	28
Generica	$101,69 \pm 2,08$	2,1	100	$96,44 \pm 1,69$	1,8	100
Cemio	$10,63 \pm 0,33$	3,1	11	$15,29 \pm 0,44$	2,9	14
Zdrovit MM	$15,36 \pm 0,51$	3,3	14	$21,36 \pm 0,82$	3,8	20
GS Multivit	$9,96 \pm 0,06$	0,6	11	$14,55 \pm 0,06$	0,4	14
Hell active				$7,87 \pm 0,18$	2,3	8
Red Bull				$18,46 \pm 0,23$	1,3	20
Powerking				$14,31 \pm 0,42$	2,9	14
Monster				$7,85 \pm 0,07$	0,9	8
Semtex				$14,25 \pm 0,32$	2,3	14
Tiger				$6,01 \pm 0,07$	1,1	7
Alcohol Killer	$6,49 \pm 0,13$	1,9	8	$11,56 \pm 0,14$	1,2	11
Steiger energy				$2,07 \pm 0,07$	3,5	2,8
Oshee				$5,46 \pm 0,08$	1,6	5,6
Dr. Witt	$1,92 \pm 0,04$	2,0	1,65	$2,14 \pm 0,04$	1,7	2,1
Body & Future				$3,43 \pm 0,09$	2,6	3,5

ceutického charakteru (komerčne dostupné vitamínové výživové doplnky reprezentované šumivými tabletami) a jedenástich vzorkách potravinárskeho charakteru (energetické nápoje a vitamínové vody). Výsledky z jednotlivých stanovení sú predmetom tabuľky 3 a na obrázku 2 sú znázornené ilustratívne reálne elektroforeogramy získané z analýzy tiamínu a pyridoxínu v šumivej multivitaminovej tablete (Additiva), energetických nápojoch (Hell active, Alcohol Killer) a vitamínovej vode (Dr. Witt). Z príslušných elektroforeogramov je možné potvrdiť i požadovanú mieru špecificity vyvinutej metódy, keďže neboli pozorované žiadne interferujúce píky v migračných pozíciách zodpovedajúcich sledovaným analytom – pyridoxínu a tiamínu. Zistený obsah dvojice vitamínov sa v jednotlivých testovaných prípravkoch pohyboval na 81 – 116 % (tiamín) a 74 – 109 % (pyridoxín) úrovni deklarovanej výrobcom. Vysoká miera zhody s hodnotami deklarovanými výrobcom bola dosiahnutá u vzoriek farmaceutického charakteru. Markantnejšie rozdiely boli pozorované v prípade niektorých vzoriek energetických nápojov a vitamínových vôd. Uvedené fluktuácie mohli byť spôsobené napr. podmienkami skladovania (teplo, svetlo), ale i absenciou efektívnej analytickej metódy použitej pri hodnotení finálneho produktu. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že nami vyvinutá metóda je uplatniteľná v oblasti rutinného stanovenia tiamínu a pyridoxínu vo vzorkách farmaceutického i potravinárskeho charakteru.

## Záver

Zámerom práce bolo navrhnutie, vypracovanie a validácia jednoduchej CZE-UV metódy realizovanej v hydrodynamicky uzatvorenom systéme, ktorá by umožňovala simultánnu analýzu dvojice vitamínov skupiny B – tiamínu a pyridoxínu – v multikomponentných vzorkách farmaceutického a potravinárskeho charakteru reprezentovaných šumivými tabletami, energetickými a vitamínovými nápojmi. Optimalizovaná CZE-UV metóda vo validačnom procese preukázala dobrú linearitu v testovaných koncentračných rozsahoch, vyznačovala sa relatívnou rýchlosťou (celkový čas analýzy na úrovni 20 min.) a hodnotami LOD na  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  úrovni. Dosiahnuté výsledky preukázali jednoduchosť, vysokú separačnú účinnosť, nízke finančné nároky a ekologickosť vypracovanej metódy. Uvedenými atribútmi tak spĺňa kritériá kladené modernými laboratóriami zaoberajúcimi sa hodnotením kontroly kvality farmaceutických alebo potravinárskych produktov.

Práca vznikla s podporou grantu APVV–15–0585, VEGA 1/0463/18, KEGA 027UK–4/2020.

**Stret záujmov:** žiadny.

## Literatúra

1. **Combs F. G.** The Vitamins. Fundamental Aspects in nutrition and health, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Elsevier Health Science 2008.
2. **Zhang Y., Zhou W., Yan J.-Q., Liu M., Zhou Y., Shen X., Ma Y.-L., Feng X.-S., Yang J., Li G.-H.** A review of extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules* 2018; 23, 1484.
3. **Jenčo J., Kujovská Krčmová L., Sobotka L., Bláha V., Solich P., Švec F.** Development of novel liquid chromatography method for clinical monitoring of vitamin B1 metabolites and B6 status in whole blood. *Talanta* 2020; 211, 120702.
4. **Ba A.** Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2008; 28, 923–931.
5. **Rodwell V., Bender D., Botham K., Kennelly P., Weil P., Harper H.** Harper's Illustrated Biochemistry. 28<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Publishing 2009.
6. **Whitfield K. C., Bourassa M. W., Adamolekun B., Bergeron G., Bettendorff L., Brown K. H., Cox L., Fattal-Valevski A., Fischer P. R., Frank E. L., Hiffler L., Hlaing L. M., Jeffers M. E., Kapner H., Kounnavong S., Mousavi M. P. S., Roth D. E., Tsaloglu M.-N., Wieringa F., Combs Jr. G. F.** Thiamine deficiency disorders: diagnosis, prevalence, and roadmap for global control programs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2018; 1430, 3–43.
7. **Lüllmann H., Mohr K., Hein L.** Pharmakologie und Toxikologie. 17. auflage. Stuttgart: Geort Thieme Verlag 2010.
8. **Griffiths J. K.** Vitamin deficiencies. In: Ryan E., Hill D., Solomon T., Endy T., Aronson N. (eds.) Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases, 10<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier 2020.
9. **Spinneker A., Sola R., Lemmen V., Castillo M. J., Pietrzik K., Gonzalez-Gross M.** Vitamin B6 status, deficiency and its consequences – an overview. *Nutr. Hosp.* 2007; 45, 527–534.
10. **Higgins J. P., Tuttle T. D., Higgins C. L.** Energy beverages: Content and safety. *Mayo Clin. Proc.* 2010; 85, 1033–1041.
11. **Lincová D.** Základní a aplikovaná farmakologie, 2. vydání. Praha: Galén 2007.
12. **Wolk B. J., Ganetsky M., Babu K. M.** Toxicity of energy drinks. *Curr. Opin. Pediatr.* 2012; 24, 243–251.
13. **Landers J. P.** Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques, 3<sup>rd</sup> ed. London: CRC Press 2008.
14. **Trenerry V. C.** The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages. *Electrophoresis* 2001; 22, 1468–1478.
15. **Serni E., Audino V., del Carlo S., Manera C., Saccomanni G., Macchia M.** Determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary supplements and in artichokes by micellar electrokinetic chromatography. *Nat. Prod. Res.* 2013; 27, 2212–2215.
16. **da Silva D. C., Visentainer J. V., de Souza N. E., Oliveira C. C.** Micellar electrokinetic chromatography method for determination of the ten water-soluble vitamins in food supplements. *Food Anal. Methods* 2013; 6, 1592–1606.
17. **Schreiner M., Razzazi E., Luf W.** Determination of water-soluble vitamins in soft drinks and vitamin supplements using capillary electrophoresis. *Nahrung* 2003; 47, 243–247.
18. **Blanco-Gomis D., González L. L., Álvarez D. G.** Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins. *Anal. Chim. Acta* 1999; 396, 55–60.
19. **Delgado-Zamarreño M. M., González-Maza I., Sánchez-Pérez A., Carabias-Martínez R.** Separation and simultaneous determination of water soluble and fat-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 2002; 953, 257–262.

20. **Su S.-C., Chou S.-S., Hwang D.-F., Chang P.-C., Liu C.-H.** Capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography for determining water-soluble vitamins in commercial capsules and tablets. *J. Food Sci.* 2001; 66, 10–14.
21. **Navarro-Pascual-Ahuir M., Lerma-García M. J., Simó-Alfonso E. F., Herreo-Martínez J. M.** Determination of water-soluble vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Control* 2016; 63, 110–116.
22. **Hu Q., Zhou T., Zhang L., Li H., Fang Y.** Separation and determination of three water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations and food by micellar electrokinetic chromatography with amperometric electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* 2001; 437, 123–129.
23. **Franco M., Jasionowska R., Salvatore E.** Application of CZE method in routine analysis for determination of B-complex vitamins in pharmaceutical and veterinary preparations. *Int. J. Anal. Chem.* 2012; 2012, 592650.
24. **Hu W., Tao J., Wang Q.** Simultaneous determination of vitamins B1, B2, B6, niacinamide and calcium pantothenate in compound vitamin B tablets by high performance quantitative capillary electrophoresis. *Se Pu.* 2019; 37, 661–665.
25. **Fotsing L., Fillet M., Chiap P., Hubert P., Crommen J.** Elimination of adsorption effects in the analysis of water-soluble vitamins in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1999; 853, 391–401.
26. **Schiewe J., Mrestani Y., Neubert R.** Application and optimization of capillary zone electrophoresis in vitamin analysis. *J. Chromatogr. A* 1995; 717, 255–259.
27. **Maráková K., Piešťanský J., Havránek E., Mikuš P.** Simultaneous analysis of vitamins B in pharmaceuticals and dietary supplements by capillary electrophoresis hyphenated with triple quadrupole mass spectrometry. *Pharmazie* 2014; 69, 663–668.
28. **Kaniánsky D., Marák J., Masár M., Iványi F., Madajová V., Šimuničová E., Zelenská V.** Capillary zone electrophoresis in a hydrodynamically closed separation system with enhanced sample loadability. *J. Chromatogr. A* 1997; 772, 103–114.
29. **ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2 (R1) Step 4 Version.** 2005.