

Određivanje kvalitete i sigurnosti dodataka prehrani separacijskim tehnikama

Jovanović, Anamaria

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:163141>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-13**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Anamaria Jovanović

Određivanje kvalitete i sigurnosti dodataka prehrani separacijskim tehnikama

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Marija Jozanović

Osijek, 2021

Sažetak

Dodaci prehrani izvor su hranjivih tvari poput vitamina, minerala i biljnih ekstrakata, te se koriste kao nadopuna prehrani ako se hranjive tvari nedovoljno unose putem hrane. Posljednjih godina trend proizvodnje i konzumacije dodataka prehrani raste te danas postoji širok asortiman proizvoda. Mnogi proizvodi osim obogaćivanja prehrane hranjivim tvarima navode i djelotvorne učinke poput smanjenja apetita, povećanja mišićne mase i slično. Da bi se postigli djelotvorni učinci osim dozvoljenih sastojaka dodacima prehrani dodaju se sintetski proizvedene tvari i farmaceutici koji su inače sastavni dio lijekova, to dovodi u pitanje kvalitetu i sigurnost dodataka prehrani, a time i potrebu za razvijanjem novih analitičkih metoda analize. U ovom radu opisane su i objašnjene separacijske metode koje se koriste za analizu dodataka prehrani. Opisani su principi analiza i primjena metoda kod analiza dodataka prehrani.

KLJUČNE RIJEČI: dodaci prehrani, separacijske metode, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, plinska kromatografija, fluidna kromatografija pri super kritičnim uvjetima, elektroforeza

Abstract

Dietary supplements are a source of nutrients such as vitamins, minerals and plant extracts. They are used as a supplement in diet if nutrients are insufficiently ingested through the food. Dietary supplement production and use has increased over recent years, therefore today there is a wide range of products. Many products, in addition to enriching the diet with nutrients, also have a positive effect on reducing appetite, building muscle mass, etc. In addition to the permitted ingredients, components of medications such as synthetic substances and pharmaceuticals, are added to food supplements, this calls into question the quality and safety of dietary supplements, and hence the need for analytical methods of analysis. This thesis describes and explains the separation methods used for the analysis of dietary supplements as well as the principles of analysis and application of methods in the analysis of dietary supplements.

KEY WORDS: dietary supplements, separation methods, high performance liquid chromatography, gas chromatography, supercritical fluid chromatography

Sadržaj

1. UVOD	1
2. DODACI PREHRANI	2
2.1. Vrste dodataka prehrani	2
2.2. Sastav dodataka prehrani	3
2.3. Zakonska regulativa dodataka prehrani	4
2.4. Kontaminanti i farmaceutici u dodacima prehrani.....	5
2.5. Krivotvorenje dodataka prehrani	5
2.6. Nuspojave	7
2.7. Analitičke metode određivanja sastava dodataka prehrani	7
3. SEPARACIJSKE METODE ODREĐIVANJA DODATAKA PREHRANI.....	8
3.1. Kromatografija.....	9
3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	10
3.2.1 UV detektor	12
3.2.2. Maseni detektor	13
3.2.3. Ostali detekcijski sustavi.....	14
3.3. Plinska kromatografija.....	15
3.4. Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima.....	18
3.5. Elektroforeza.....	21
4. ZAKLJUČAK	31
5. LITERATURA.....	32

1. UVOD

Dodaci prehrani uključuju širok asortiman proizvoda čija je svrha uzimanja dopuniti prehranu. Posljednjih nekoliko godina sve je veća proizvodnja i konzumacija dodataka prehrani, a posebice dodataka prehrani biljnog podrijetla. Dodaci prehrani svrstavaju se u kategoriju prehrambenih proizvoda te se time za njih primjenjuju propisi o hrani, što također povećava prodaju. Porast prodaje i opći nedostatak u regulaciji proizvodnje dodataka prehrani dovodi do povećanja vjerojatnosti da se prodaju proizvodi koji sadrže štetne tvari, što dovodi u pitanje sigurnost i kvalitetu. Provjera sigurnosti, kvalitete, onečišćenja te djelotvornosti proizvoda provodi se pomoću analitičkih metoda za identifikaciju, kvantifikaciju i standardizaciju aktivnih tvari da bi se osigurala kontrola kvalitete. Cilj ovog rada je opisati kako se provodi određivanje kvalitete i sigurnosti dodataka prehrani pomoću analitičkih metoda, odnosno pomoću separacijskih metoda kao što su kromatografija i elektorforeza.

2. DODACI PREHRANI

Dodaci prehrani smatraju se hranom te se ubrajaju u jednu od kategorija prehrambenih proizvoda, čiji je cilj nadopuniti uobičajenu prehranu pomoću hranjivih tvari, odnosno tvari koje imaju prehrambeni ili fiziološki učinak. Dodaci prehrani su preparati koji se proizvode iz koncentriranih izvora hranjivih tvari (vitamina i minerala) ili drugih tvari kojima je primarna funkcija dodatno obogatiti prehranu s namjerom održavanja zdravlja [1]. Unošenje i obogaćivanje prehrane dodacima postiže se na različite načine jer ih na tržištu pronalazimo u različitim doziranim oblicima. Dozirani oblici pakiraju se pojedinačno ili kombinacijom više oblika. Tri su oblika dodataka prehrani; dozirani oblici (tablete, kapsule, pastile i slično), oblici koji se unose u odmjerenoj količini ili specifičnim načinom primjene (tekućine, prah i granule) i ostali oblici [2].

Dodaci prehrani ne zahtijevaju liječnički recept te se osim u ljekarnama mogu kupiti u drugim vrstama trgovina i putem internetskih stranica. Ljudi vjeruju da su takvi proizvodi sigurniji od sintetskih lijekova koji se mogu kupiti isključivo u ljekarnama i smatra se da ih danas konzumira više od 50% odraslih kao zamjena za uravnoteženu prehranu, poboljšavanje općeg zdravlja, poboljšanje izgleda ili zbog odgađanja početka bolesti.

2.1. Vrste dodataka prehrani

Vrste dodataka prehrani razlikuju se prema pripravicima proizvedenih iz:

- koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom
- sirovina biljnog podrijetla

U koncentrirane izvore hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim učinkom ubrajaju se: vitamini, minerali, aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, biljne vrste, ekstrakti biljnih vrsta i ostalo. Sirovinama biljnog podrijetla smatraju se osušene ili svježe biljke odnosno dijelovi biljke (cvijet, list, plod, korijen, sjemenka i drugi dijelovi), pojedinačno ili u smjesi [3].

2.2. Sastav dodataka prehrani

Sastojci koji ulaze u sastav dodataka prehrani su vitamini, minerali, esencijalne masne kiseline, vlakna, aminokiseline i dušikovi spojevi te brojne biljne vrste. Vitamini koji se mogu naći u dodacima prehrani su vitamin A, vitamini B kompleksa, vitamin C, vitamin D, vitamin K, vitamin E, pantotenska kiselina, folati, biotin, niacin te njihovi kemijski oblici. Mineralne tvari koje se nalaze u dodacima prehrani su kalcij, magnezij, kalij, željezo, bakar, cink, mangan, natrij, selen, krom, molibden, fluor, jod te njihovi brojni kemijski oblici i spojevi. Aminokiseline koje se mogu naći u sastavu dodataka prehrani su L-alanin, L-asparaginska kiselina, L-glutamin, L-valin, glicin i brojne druge aminokiseline. Biljne vrste koje mogu biti u sastavu dodataka prehrani dane su listom dozvoljenih biljnih vrsta te se na listi nalazi preko tristo biljaka. Osim navedenih sastojaka u proizvodnji dodataka prehrani mogu se upotrebljavati i drugi sastojci, ali prema propisanim pravilima o hrani. Sastav dodataka prehrani potrebno je otisnuti na ambalažu te se preporučuje označavanje najmanje, najviše i preporučene dnevne doze unosa vitamina i minerala za zdrave odrasle osobe kao u tablici 1.

Tablica 1. Primjer prikaza dnevnog unosa vitamina i minerala za zdrave odrasle osobe [3].

	Najmanji dopušteni dnevni unos	Najveći dopušteni dnevni unos	Preporučeni dnevni unos
Vitamin A (retinol) 1 µg	120	1500	800
Vitamin B1 (tiamin) mg	0,21	4	1,4
Vitamin C (askorbinska kiselina) mg	9	350	60
Kalcij (Ca) mg	120	1500	800
Magnezij (Mg) mg	45	600	300
Željezo (Fe) mg	2,1	30	14

Biljne vrste koje mogu biti sastojci u dodacima prehrani su voće i povrće poput češnjaka, brokule, mrkve, paprike, rajčice, jabuke, borovnice, maline, kupine i slično. Uz voće i povrće i začinsko bilje koje koristimo u kućanstvu može se pronaći u dodacima prehrani, poput bosiljka, majčine dušice, timijana, ružmarina i peršina. Osim biljaka koje susrećemo i konzumiramo svakodnevno u našoj prehrani u dodacima prehrani koriste se još brojne biljke koje imaju djelotvorne sastojke, kao što su ginko, neven, lavanda, divlja ruža, sljez, kadulja, lipa i brojne druge. Biljne vrste poput voća, povrća, ljekovitog i začinskog bilja izvor su brojnih aktivnih tvari poput vitamina, minerala, vlakana, aminokiselina, esencijalnih masnih kiselina itd. Upravo zbog toga većina dodataka prehrani bazira se na biljnim vrstama i biljnim ekstraktima.

2.3. Zakonska regulativa dodataka prehrani

U Europi, a time i u Republici Hrvatskoj dodaci prehrani smatraju se hranom, odnosno ne zahtijeva se odobrenje za njihovu učinkovitost prije konzumacije. Na dodatke prehrani primjenjuju se propisi o hrani te vrijede jednaka pravila vezana za opće označavanje, prehrambene aditive, kontaminante, novu hranu, prehrambene i zdravstvene tvrdnje o hrani, itd. U Republici Hrvatskoj sastav, označavanje i stavljanje na tržište regulirano je Zakonom o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima, Pravilnikom o dodacima prehrani, Pravilnikom o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provođenje programa monitoringa dodataka prehrani, hrane kojoj su dodani vitamini, minerali i druge tvari i hrane s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama i Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno. Pravilnikom o dodacima prehrani primjenjuju se odredbe Direktive 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća u cilju usklađivanja zakona država članica. Dodani vitamini i minerali te svi njihovi kemijski oblici koji se koriste u proizvodnji dodataka prehrani propisani su Uredbom Komisije (EZ) Europskog parlamenta i Vijeća [2].

Međutim još uvijek se neispitani proizvodi mogu staviti na tržište, što je rezultat nejasnih zakonskih odredbi za regulaciju i provjeru učinkovitosti. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) isto tako dodatke prehrani ne smatra lijekovima već proizvodima za nadopunu prehrane. Prema tome ne koriste se u cilju liječenja bolesti te skladno tome nisu

nužni dobiti odobrenje od FDA-a prije njihovog stavljanja na tržište. Proizvođači moraju imati dokaze da proizvodi nisu štetni, ali se i prije provjera proizvodi mogu lako staviti na tržište. Mogućnost lakog stupanja na tržište dovodi do pitanja kvalitete i sigurnosti proizvoda [1].

2.4. Kontaminanti i farmaceutici u dodacima prehrani

Dodacima prehrani često se pripisuju djelotvorni učinci poput gubitka tjelesne mase, izgradnje i rasta mišića te liječenja erektilne disfunkcije. Za postizanje djelotvornih učinaka u dodatke prehrani dodaju se nedozvoljeni farmaceutici i sintetska sredstva za postizanje bržih i boljih rezultata. Na deklaracijama dodataka prehrani često se neki od sastojaka izostave ili se količina sastojaka razlikuje od stvarne količine [4].

Proizvodi za mršavljenje ili smanjenje apetita jedni su od najraširenijih proizvoda, a postoje i dodaci prehrani koji pomažu pri mršavljenju. Takvi dodaci prehrani često mogu sadržavati sintetske tvari kao što su sibutramin, antidepresive te razne diuretike ili laksative. Istraživanja su pokazala da su najčešći kontaminanti u dodacima prehrani koji pomažu pri mršavljenju sibutramin i njegovi spojevi, laksativ fenolftalein i antidepresivi fluoksetin. Štetni sastojci mogu se izolirati i iz biljaka, primjer toksičnog djelovanja su supstance izolirane iz biljke kositrenice. Aktivni sastojci iz biljke pronađeni su u preparatu za mršavljenje, nakon utvrđivanja toksičnosti proizvod je povučen s tržišta [4].

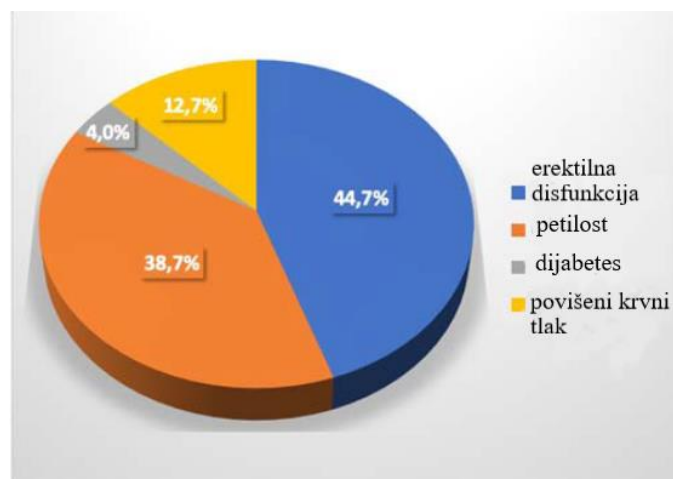
U dodacima prehrani za liječenje erektilne disfunkcije koji navode da su isključivo biljnog podrijetla pronađene su nedozvoljene supstance, kemijske modifikacije sildenafilu. Sildenafil je djelotvorna tvar koja se stavlja u lijekove za liječenje erektilne disfunkcije i uvrštava se u inhibitore fosfodiesteraze tipa 5. Sildenafil je u dodatak prehrani dospio sintetskim putem tijekom proizvodnje [5].

2.5. Krivotvorenje dodataka prehrani

Dodaci prehrani razlikuju se od lijekova u tome što se ne koriste za liječenje nego samo služe za održavanje zdravlja. Pri tome dodaci prehrani lakše dopijevaju na tržište jer ne prolaze

kroz zahtjevan proces odobravanja poput lijekova. Kod dodataka prehrani ispituje se zdravstvena i sanitarna ispravnost, međutim ne i farmaceutska kvaliteta, sigurnost i djelotvornost kao što je to potrebno za lijekove. Lakše stupanje na tržište dovodi do lakšeg krivotvorenja i falsificiranja sastava dodataka prehrani. Proizvođačima se pruža mogućnost stavljanja sintetskih tvari bez dokazivanja sigurnosti i djelotvornosti proizvoda. Dodatkom sintetskih tvari raste djelotvornost dodataka prehrani, a time raste prodaja proizvoda. Međutim korištenje krivotvorenih dodataka prehrani može predstavljati zdravstveni rizik za osobe koje koriste takve proizvode budući da se radi o farmaceutskim supstancama koje nisu kontrolirane. Pojedine formulacije mogu sadržavati visoke koncentracije aktivnih tvari te na organizam djelovati toksično [5].

Kao što je već spomenuto većina krivotvorenja dodataka prehrani odnosi se na proizvode za mršavljenje i liječenje erektilne disfunkcije. Prema istraživanjima provedenim u razdoblju od 2009. do 2019. godine, izvještaji su pokazali da se najviše krivotvore dodaci prehrani za liječenje problema erektilne disfunkcije (44,7%), a slijede dodaci za mršavljenje (38,7%). Zatim dodaci prehrani za dijabetičare (12,7%) i dodaci prehrani za smanjenje povišenog krvnog tlaka (4%), što je prikazano na slici 1 [4].



Slika 1. Izvještaj o krivotvorenju dodataka prehrani u periodu od 2009-2019 godine [4].

2.6. Nuspojave

Dodaci prehrani koriste se s ciljem poboljšanja zdravlja i dopune prehrani, međutim posljednjih godina s porastom prodaje i sve većeg broja dodataka prehrani na tržištu u pitanje se dovodi kvaliteta proizvoda. Mogućnost lakog stupanja na tržište bez većih provjera dovodi do raznih kontaminanata i krivotvorenja proizvoda. Krivotvorenje proizvoda i ne navođenje stvarnog sastava proizvoda dovodi do štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Primjerice dodaci prehrani u kojima je pronađena sintetska tvar sildenafil za liječenje erektilne disfunkcije mogu dovesti do preosjetljivosti na djelatnu ili bilo koju pomoćnu tvar. Kod ljudi s teškim kardiovaskularnim bolestima navedene tvari mogu izazvati nuspojave i njima se ne preporuča uzimanje takvih preparata [5]. Dodaci prehrani kupuju se i uzimaju bez liječničkog recepta što također može dovesti do neželjenih nuspojava ako se uzimaju u većoj količini od preporučene. Osim sintetskih tvari, nuspojave mogu izazvati tvari poput vitamina ili minerala ako se unose u prekomjernoj količini. Vitamini imaju nisku stopu toksičnosti i na organizam djeluju pozitivno, međutim prekomjerno uzimanje može dovesti do nuspojava. Prekomjerno i dugotrajno uzimanje vitamina B6 može dovesti do oštećenja živaca, dok dugotrajno visok unos vitamina B3 može izazvati oštećenje jetre. Vitamin C se najčešće unosi prehranom, ali prekomjerne količine koje se često unose uporabom dodataka prehrani mogu izazvati proljev, grčeve, mučninu i povraćanje. Vitamin A predstavnik je vitamina topljivih u mastima i unosi se prehranom, a najčešće se prekomjerno unosi preko dodataka prehrani što dovodi do mučnine i povišenog krvnog tlaka. Zbog toga se na deklaraciji dodataka prehrani propisuje preporučena dnevna doza unosa kako bi se izbjegle neželjene nuspojave.

2.7. Analitičke metode određivanja sastava dodataka prehrani

Poznavanje sastava i sadržaja dodataka prehrani važne su informacije vezane uz konzumaciju proizvoda. Za povjerenje potrošača o sigurnosti i djelotvornosti dodataka prehrani potrebne su analitičke metode za identifikaciju, kvantifikaciju i standardizaciju aktivnih i bioaktivnih tvari za osiguranje kontrole i kvalitete proizvoda. Ispitivanje kvalitete važno je za utvrđivanje učinkovitosti tvari nakon unosa, odnosno kvantificiranje tvari prije unosa, a potom nakon unosa, također važno je i određivanje njihovih metabolita. Ispitivanja

zahtijevaju analitičke tehnike poput kromatografija sa različitim detektorima, uporabu masene spektrometrije ili kombinaciju više detekcijskih tehnika. Masena spektrometrija visoke rezolucije koristi se za izvođenje analiza biljnih ekstrakata. Izbor analitičkih metoda i priprema uzorka postupak je koji ovisi o ispitivanom analitu te njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima, kao i o svojstvima prisutnog matriksa. U ispitivanju sastava i onečišćenja dodataka prehrani koriste se analitičke metode poput plinske kromatografije, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima i elektroforeze. Metode koje se također koriste za testiranje dodataka prehrani su indukcijski spregnuta masena spektrometrija plazme (ICP-MS), nuklearna magnetska rezonancija (NMR), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) i tankoslojna kromatografija visokih performansi (HPTLC) [1].

3. SEPARACIJSKE METODE ODREĐIVANJA DODATAKA PREHRANI

Separacijske metode su analitičke tehnike koje se koriste za izoliranje, separaciju i određivanje analita. Cilj separacije odnosno odjeljivanja je precizna identifikacija i pouzdana detekcija analita i/ili interferenta u kompleksnom uzorku. Separacija se odvija na temelju razlika između kemijskih ili fizikalnih svojstava analita i interferenta. Da bi separacijska metoda bila učinkovita važno je osigurati dobru selektivnost, osjetljivost i učinkovitost. Separacijske metode klasificiraju se prema principu razdvajanja u odnosu na veličinu čestica, masu i gustoću, stvaranje kompleksa, promjenu fizikalnih i kemijskih svojstava i razdvajanja između faza, kao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Klasifikacija separacijskih metoda prema principu razdvajanja [7].

PRINCIP RAZDVAJANJA	SEPARACIJSKA TEHNIKA
Veličina čestica	filtracija, dijaliza, razdvajanje na osnovu veličine čestica
Masa i gustoća	centrifugiranje
Stvaranje kompleksa	maskiranje
Promjene fizikalnih svojstava	destilacija, sublimacija, rekristalizacija
Promjene kemijskih svojstava	precipitacija, ionska izmjena, elektrodepozicija, isparavanje-ishlapljivanje
Razdjeljivanje između faza	ekstrakcija, kromatografija

Separacijske metode za određivanje dodataka prehrani koje će biti objašnjene u ovom radu su plinska kromatografija, tekućinska kromatografija, fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima i elektroforeza.

Uzevši u obzir da se većina dodataka prehrani nalazi u čvrstom stanju te je potrebna priprema uzorka usitnjavanjem to je prvi korak u analizi. Za određivanje bioaktivnih tvari u dodacima prehrani u krutom obliku najčešće se koristi ekstrakcija tekuće-tekuće nakon čega slijedi filtracija, centrifugiranje ili obje metode za pripremu uzorka za daljnju analizu.

3.1. Kromatografija

Kromatografija je separacijska metoda koja se koristi za separaciju i kvantitativnu analizu sastojaka prisutnih u složenim smjesama, te za identifikaciju organskih i anorganskih spojeva za daljnju analizu, a temelji se na razdvajanju komponenti uzorka između dviju faza. Mobilna faza se pomiče kroz stacionarnu fazu te sa sobom nosi spojeve uzorka kroz stacionarnu fazu. Na različitim točkama u stacionarnoj fazi različite komponente spoja će se apsorbirati i prestat će se kretati s mobilnom fazom, to dovodi do razdvajanja komponenti smjese [6]. Prvu kromatografsku metodu separacije osmislio je početkom 20. stoljeća ruski botaničar M. S. Cvet proučavanjem biljnih pigmenta klorofila i ksantofila kako prolaze kroz kolonu napunjenu usitnjenim kalcijevim karbonatom. Obojeni sastojci odvojili su se na koloni kao obojene vrpce, odakle potječe ime metode (grč. *Chroma* = boja). Danas postoje

i koriste se brojne kromatografske tehnike koje se mogu podijeliti prema stacionarnoj fazi na plošnu (planarnu) kromatografiju i kromatografiju na stupcu. Plošna kromatografija sadrži stacionarnu fazu naneseu na ravnu plohu kroz koju prolazi mobilna faza pod utjecajem gravitacije ili kapilarnih sila. Plošna kromatografija dijeli se na papirnu kromatografiju, tankoslojnu kromatografiju i elektrokromatografiju. Kromatografija na stupcu ima stacionarnu fazu koja ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije. Kromatografija na stupcu podijeljena je na plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.

Da bi razumjeli kromatografske metode treba poznavati osnovne pojmove:

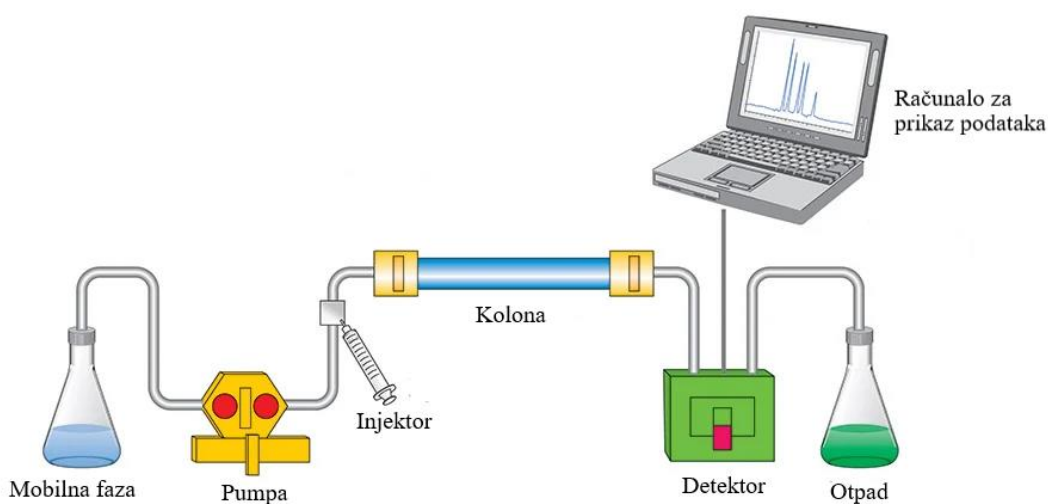
- Eluens – otapalo koje nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu.
- Eluiranje – proces kojim mobilna faza ispire analizirane sastojke sa stacionarne faze.
- Kromatogram – ispis funkcije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu eluiranja ili o volumenu eluensa. Sastoji se od niza pikova elucije nekog specifičnog slijeda, veličine i međusobnog razmaka [6].

3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC što potječe iz engl. high performance liquid chromatography, separacijska je metoda gdje mobilna faza nosi komponente uzorka kroz kolonu koja je ispunjena česticama stacionarne faze. Mehanizam separiranja odnosno odvajanja komponenti ovisi o polarnosti samih komponenti. Mobilnu fazu u tekućinskoj kromatografiji čini tekućina odnosno otapalo u kojem je otopljen uzorak te mobilna faza predstavlja smjesu otopljenih tvari [6]. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti analitička je metoda koja ima sposobnosti odvajanja, identifikacije i kvantifikacije spojeva prisutnih u uzorku koji se može otopiti u otapalu. Primjenjuje se za analizu farmaceutskih proizvoda, hrane, kozmetike, uzoraka iz okoliša, industrijskih kemikalija i slično. Razlikujemo nekoliko vrsta HPLC s obzirom na mehanizam razdvajanja ili vrstu stacionarne faze; razdjelna kromatografija, adsorpcijska kromatografija, ionsko-izmjenjivačka kromatografija, kromatografija isključenjem. Razdjelna kromatografija dijeli se s obzirom na polarnost pokretne i nepokretne faze na kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Mobilna faza kod kromatografije normalnih faza je nepolarno otapalo, a stacionarna

faza je polarna. Kod kromatografije obrnutih faza, mobilna faza je polarno otapalo, a stacionarna faza je nepolarna. Adsorpcijska kromatografija zasniva se na adsorpciji tvari, a ionsko-izmjenjivačka kromatografija na diferencijaciji fizikalno-kemijskih svojstava kationa i aniona u smjesi. Kromatografija isključenjem tehnika je odvajanja komponenti na temelju veličina čestica [7].

Uređaj na kojem se izvodi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti naziva se tekućinski kromatograf. Dijelovi osnovnog sustava tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti su spremnik s mobilnom fazom, pumpa visokog tlaka, injektor, uzorak, kolona i detektor. Shema uređaja prikazana je na slici 2. U spremniku se nalazi mobilna faza, koja treba biti čista, kemijski inertna i kompatibilna s detektorom. Pumpa pod visokim tlakom prenosi mobilnu fazu kroz kolonu. Injektor unosi uzorak u pokretnu fazu u tok koji nosi uzorak u kolonu. Kolona je ispunjena sitnim zrcima silikagela koje čine stacionarnu fazu, gdje dolazi do odvajanja komponenti smjese na osnovu fizikalno-kemijskih svojstava. Interakcije između mobilne i stacionarne faze, odnosno između komponenti uzorka i čestica silikagela stvaraju razlike u kretanju i time razdvajaju komponente u odnosu na vrijeme zadržavanja u koloni. Detektor služi za vidljivo odvajanje komponenti nakon prolaska kroz kolonu, detektira promjene i šalje podatke računalu u obliku električnog signala, nakon čega nastaje kromatogram. Prilikom odabira detektora potrebno je da zadovoljava uvjete: detektor treba biti dovoljno osjetljiv i na vrlo male koncentracije uzorka, obnovljiv, stabilan, imati širok temperaturni raspon, te dati brz i linearan odziv [6].

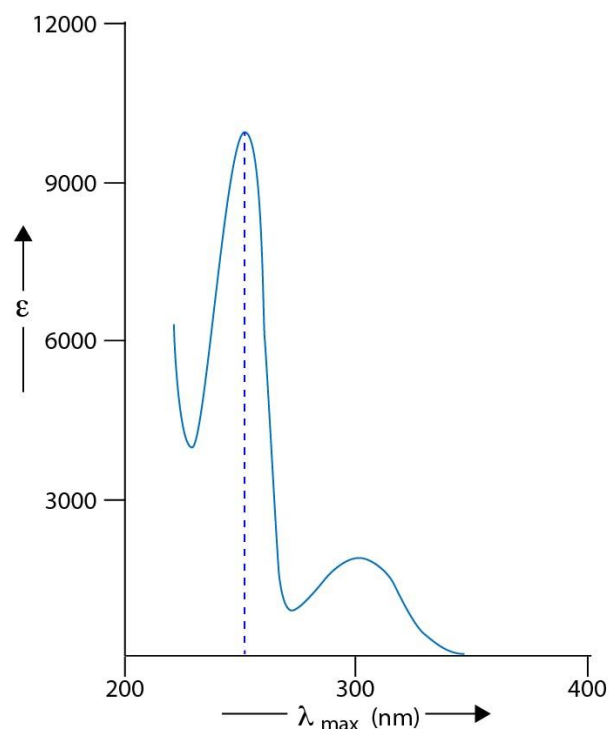


Slika 2. Shematski prikaz tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti [8].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koristi se za utvrđivanje identiteta sastojaka i kontaminanata u dodacima prehrani. Koristi se HPLC s različitim detektorima, poput UV detektora, detektora fluorescentnih zraka (FLD), masenog detektora (MS), foto-diodnog detektora (DAD) i detektora električne vodljivosti (ECD).

3.2.1 UV detektor

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV detektorom jedna je od najčešće korištenih metoda za analizu bioaktivnih tvari u dodacima prehrani na bazi biljnih ekstrakata kao i za detekciju vitamina. Koristi se za pronalaženje tvari koje nisu navedene u deklaraciji proizvoda, odnosno za otkrivanje krivotvorina i kvantitativno određivanje onečišćenja. UV detektor se koristi da bi se postigla bolja selektivnost i osjetljivost analize [1]. Princip rada HPLC s UV detektorom je sljedeći: mobilna faza prolazi kroz kolonu u kojoj snop UV zračenja generira spektrofotometar. Prolaskom mobilne faze kroz kolonu apsorbira se UV zračenje i detektor šalje signal proporcionalan koncentraciji analita, kromatogram prikazan na slici 3. UV detektor detektira apsorpciju elektromagnetskog zračenja od ultraljubičastog (UV) do vidljivog spektra [6]. Jedno od ograničenja HPLC metode s UV detektorom za analizu spojeva sa sličnim svojstvima je mogućnost pogrešne identifikacije analita pri nedostatku autentičnosti standarda. Da bi se izbjeglo to ograničenje i moguće pogreške, danas se najčešće koristi maseni detektor, odnosno HPLC spregnut sa masenim spektrometrom [9].



Slika 3. Prikaz HPLC UV kromatograma [10].

HPLC metoda s UV detektorom pokazala se učinkovitim metodom za analize dodatka prehrani koji sadrže đumbir. U istraživanju je korištena HPLC kolona s površinski poroznim česticama te se metoda pokazala pogodnom za analizu bioaktivnih sastojaka đumbira. Rezultati istraživanja pokazali su da je metoda selektivna, linearna, točna i precizna. Za metodu je korištena samo jedna kolona, izbjegla se dugotrajna priprema uzoraka, osjetljivost analize je relativno visoka i vrijeme potrebno za analizu je 12 minuta. Učinkovitim HPLC metodom omogućilo se otkrivanje osam sastojaka đumbira koji ne isparavaju [11].

3.2.2. Maseni detektor

HPLC spregnut sa masenom spektrometrijom metoda je koja omogućuje analizu sa vrlo niskim granicama detekcije i točnu identifikaciju tvari. Maseni detektor omogućuje fizičko odvajanja komponenata uzorka prema masi. Posjeduje izvrsnu osjetljivost i selektivnost te se može spregnuti sa različitim ionizacijskim tehnikama koje omogućuju ionizaciju širokog raspona spojeva. Navedene prednosti dovode do sve šire upotrebe masenog detektora u

tekućinskoj kromatografiji [6]. Masena spektrometrija za analizu dodataka prehrani najčešće se koristi za detekciju biljaka i biljnih ekstrakata. Za analizu metala ili minerala, bioaktivnih spojeva i toksičnih spojeva u biljnim ekstraktima primjenjuje se indukcijsko spregnuta masena spektrometrija plazmom (ICP-MS). Uporabom ICP-MS metode određivanja tvari omogućuje se brza analiza s visokom preciznosti i točnosti. Korištenjem ICP-MS metode za ispitivanje dodataka prehrani i ljekovitih biljaka dobiju se podaci u rasponu $\mu\text{g/g}$ sadržaja tvari u uzorku. Dobivene mase iz ljekovitih biljaka uspoređuju se s masom dodataka prehrani koje navode da sadrže ljekovito bilje, iz toga se izražava koja je koncentracija biljnih ekstrakata prisutna u dodacima prehrani. Također, IPC-MS metoda spregnuta s HPLC koristi se za određivanje selena i kobalta u dodacima prehrani [1].

3.2.3. Ostali detekcijski sustavi

Osim UV detektora i masenih detektora u analizi sastava i identifikaciji dodataka prehrani koriste se foto-diodni detektori (DAD) i detektori fluorescentnih zraka. Ponekad UV detektori nisu dovoljno osjetljivi zbog kemijske prirode analita, tada se koristi HPLC s foto-diodnim detektorom koji je osjetljiv za otkrivanje krivotvorenih proizvoda. U slučaju niskih područja detekcije u kojima UV detektori nisu dovoljno osjetljivi koriste se detektori s nabijenim aerosolom (engl. charged aerosol detector, CAD) i detektori raspršenja svjetla u uparenom uzorku (engl. evaporative light scattering detectors, ELSD). Iako su to detektori koji se rijetko koriste u analizama dodataka prehrani, a razlog tome je uzak linearni raspon detektora i nedostatak spektralnih podataka [1].

Napredak u opremi i priboru uvelike je poboljšao kvalitetu HPLC metoda u posljednjih nekoliko godina. Za analizu vitamina, minerala i biljnih ekstrakata danas se koriste i alternativne tehnike odvajanja i određivanja tvari. Koriste se kolone s manjim česticama i core-shell tehnologija čime se povećava učinkovitost odvajanja i brzina ispiranja sa zadovoljavajućom razlučivosti i osjetljivosti. Drugi način za povećanje brzine ispiranja je upotreba monolitnih kolona. Za postizanje učinkovitije selektivnosti koriste se alternative stacionarne faze poput cijanopropila, pentafluorofenila i fenil-heksila mjesto standardne stacionarne faze C18 ugljikovodika. Takve alternativne faze pružaju bolju selektivnost, kraće vrijeme separacije i veću učinkovitost separacije [9].

Istraživanjem dodataka prehrani razvijena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i kemiluminiscencije (engl. Chemiluminescence, CL) za osjetljivu analizu vardenafila u dodacima prehrani na biljnoj bazi. Vardenafil je tvar koja se stavlja u lijekove za liječenje erektilne disfunkcije, te se smatra da je u ispitivanim dodacima prehrani na biljnoj bazi vardenafil došao sintetskim putem. Kemiluminiscencijom dolazi do oslobađanja energije u kemijskoj reakciji u obliku elektromagnetskog zračenja. HPLC-CL uređaj sastoji se od CL analizatora s negativnim visokim generatorom napona, CL pumpe konstantnog protoka, CL detektora, HPLC pumpe i kolone C18, mjesta za uzorke i računala za prikaz podataka. Kao mobilna faza korišten je etanol (25%-tna vodena otopina etanola). Da bi se postigla osjetljiva i brza detekcija vardenafila s opisanim HPLC-CL uređajem, proveden je niz eksperimenata radi utvrđivanja optimalnih analitičkih performansi. Na temelju istraživanja pokazalo se da je mobilna faza s etanolom netoksična, ekološki prihvatljiva i kompatibilna s CL detektorom. Iako CL detektor nije toliko univerzalan kao UV detektor, selektivniji je za osjetljivije analize jer ima osjetljiviji omjer signal/šum i širi linearni raspon. CL detektor pokazao se jednostavnim, jeftinim i sofisticiranim. HPLC-CL metoda pokazala se osjetljivom, preciznom i jednostavnom u detektiranju spojeva u složenoj smjesi. HPLC metoda pokazala je kratko vrijeme analize uz uštedu reagensa i visoku preciznost [12].

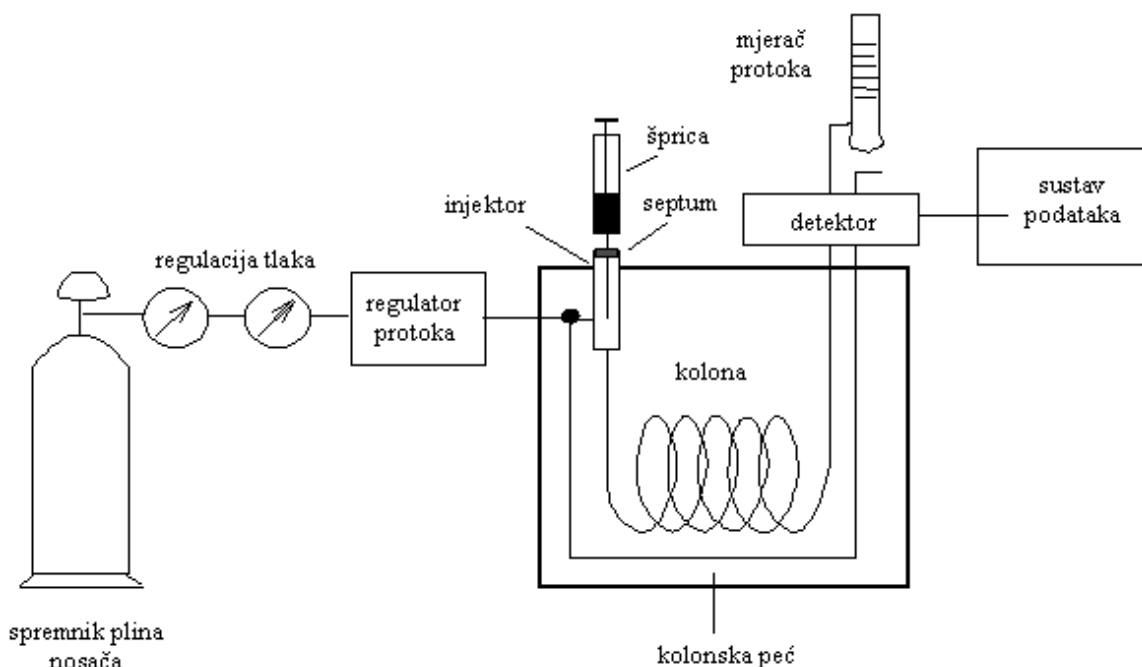
3.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je analitička metoda odvajanja komponenti hlapljivog uzorka u plinskoj fazi. Temelji se na razdvajanju tvari između mobilne plinovite i stacionarne tekuće ili čvrste faze. Prema stacionarnoj fazi razlikujemo plinsko-tekućinsku kromatografiju (GLC) ili plinsko-čvrstu kromatografiju (GSC) [7].

Plinsko-tekućinska kromatografija ili GLC, skraćeno od engl. gas-liquid chromatography, temelji se na odvajanju komponenti uzorka između pokretne plinske faze i nepokretne tekuće faze. Metoda se odvija tako da pokretna plinska faza pomoću plina eluira uzorak uzduž kolone, pri čemu ne dolazi do interakcija s analitom jer je mobilna faza plin nosač. Nepokretna faza je pričvršćena kemijskom vezom ili adsorpcijom za stijenje kolone ili za površinu inertne čvrste faze [6].

Plinsko-čvrsta kromatografija ili GSC, skraćeno od engl. gas-solid chromatography, temelji se na adsorpcijsko-desorpcijskim procesima između mobilne plinovite faze i

stacionarne čvrste faze. U koloni dolazi do zadržavanja analita, a uzrokuje ga fizička adsorpcija analita na čvrstoj stacionarnoj fazi. Stacionarne faze najčešće predstavljaju anorganski adsorbensi kao silikagel, aluminijev hidroksid, diatomijske zemlje te porozni polimeri poput aktivnog ugljena ili teflona. Plinsko-čvrsta kromatografija ima prednost pred plinsko-tekućinskom kromatografijom zbog sposobnosti brzog uravnoteženja, stabilnosti bazne linije i širokog radnog temperaturnog intervala. Nedostaci GSC metode su: mogućnost nastanka asimetričnih pikova zbog uskog linearnog područja adsorpcijske izoterme, duže vrijeme retencije zbog velike adsorpcijske entalpije, kao i ograničen broj adsorpcijskih medija koji se mogu standardizirati. Važna je metoda za odvajanje plinova sličnih vrelišta poput kisika, vodika, dušika, metana, ugljikovog dioksida i ugljikovog monoksida, ugljikovodika te za analizu plinova u zraku [6]. Plinski kromatograf prikazan na slici 4, sastoji se od sustava za dovod plina nosača, injektora, uzorka, kolone, kolonske peći i detektora.



Slika 4. Shematski prikaz plinskog kromatografa [7].

Princip rada plinskog kromatografa je sljedeći: smjesa koja se želi odvojiti injektira se u struju plina te pri tome uzorak ishlapi. Uzorak se unosi što je moguće bliže kromatografskoj koloni. Mjesto za unošenje uzorka ili injektor čini ulazni dio kolone, te se uzorci najčešće unose injekcijskom štrcaljkom. Temperatura u injektoru treba biti visoka da dođe do brzog i potpunog isparavanja uzorka. Nakon isparavanja uzorka struja plina odnosi smjesu u

kolonu u kojoj dolazi do otapanja ili adsorpcije na stacionarnoj fazi a zatim se ponovno isparava tvar u mobilnoj fazi. Komponente smjese imaju različitu hlapljivost i polarnost te se različito zadržavaju u koloni, čime dolazi do odvajanja. Kromatografska kolona čini najvažniji dio kromatografa, može biti staklena, metalna ili plastična. Ovisno koliko puta se uspostavlja ravnoteža između stacionarne i mobilne faze izražava se efikasnost kolone. Detektor na temelju fizikalnih ili kemijskih svojstava komponenti detektira prisutnost analita u plinu nosaču [7].

Kao plin nosač koriste se inertni plinovi visoke čistoće, najčešće se koristi vodik, dušik, helij, argon ili ugljikov dioksid. Sustav za dovod plina nosača sastoji se od sustava za regulaciju i protok tlaka plina odnosno redukcijskog ventila i spremnika za plin. Regulacijskim ventilom kontrolira se protok plina, jer protok treba biti konstantan. Protok ne smije biti prebrz niti prespor da bi se uspostavila ravnoteža između faza i razdvojile komponente smjese. Kolona kromatografa ima važnu ulogu te je duljina kolone važan faktor za dobivanje odvojenih komponenti. Korištenjem dužih kolona dolazi do boljeg odvajanja komponenti koje imaju blisko retencijsko vrijeme [6]. Odabir stacionarne faze ovisi o sastavu smjese koju treba odvojiti. Temperatura unutar kolone također ovisi o stacionarnoj fazi te mora biti niža od njezinog vrelišta, te niža od vrelišta sastojaka smjese, ali opet dovoljno visoka da dođe do isparavanja nakon otapanja u tekućoj fazi. Previsoke temperature u koloni dovele bi do isparivanja svih komponenti smjese te neuspješnog odvajanja [7].

Detektori koji se najčešće koriste za analizu i identifikaciju uzoraka su maseni detektor (MS), detektor toplinske vodljivosti (engl. thermal conductivity detector, TCD) i plameno-ionizacijski detektor (engl. flame ionisation detector, FID) [6].

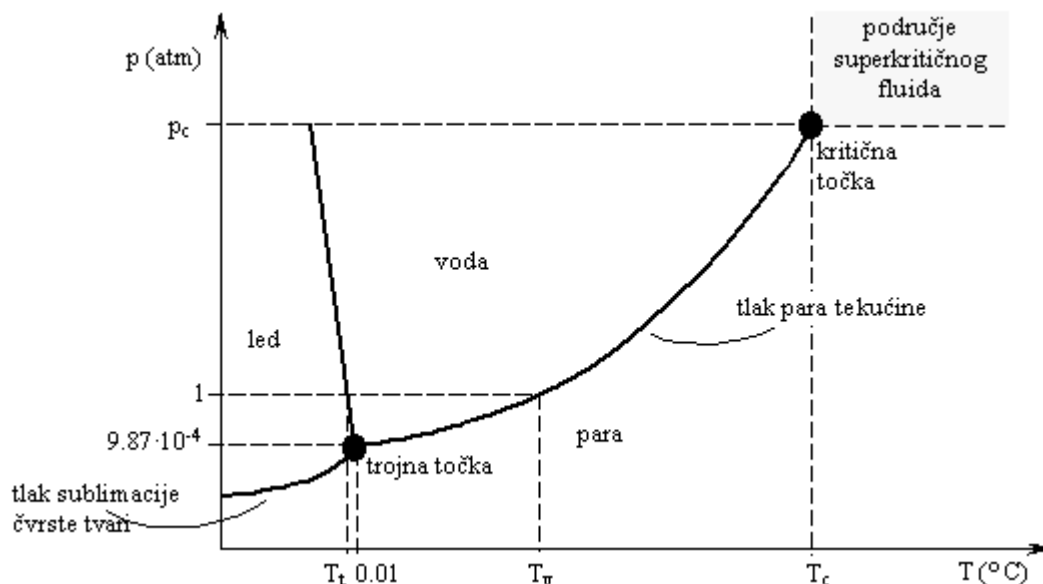
Plinska kromatografija metoda je koja se koristi u analizi dodataka prehrani za određivanje bioaktivnih spojeva i primjesa. U dodacima prehrani koji sadržavaju više komponenata te za određivanje sterola i stanola koristi se plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (FID). Princip rada plameno-ionizacijskog detektora je sljedeći, prolaskom analita kroz kolonu dolazi do miješanja analita s vodikom i zrakom i potom spaljivanja u plamenu. U detektoru iznad plamena smještena je kolektorska elektroda pomoću koje se mjeri električni potencijal. Organske molekule pirolizom na plamenu stvaraju ione i elektrone koji proizvode struju kojom se detektiraju prisutne tvari [1]. Za analizu kontaminanata u niskim koncentracijama potrebna je osjetljiva i selektivna tehnika detekcije kao što je masena spektroskopija (MS). Nedostatak plinske kromatografije kod analize

polarnih ili nepolarnih tvari je osiguravanje zadovoljavajuće preciznosti separacije i detekcije spojeva. To je jedan od razloga zašto se češće koristi tekućinska kromatografija za analizu bioaktivnih tvari i određivanje primjesa u dodacima prehrani [9].

Plinska kromatografija s trostrukim četveropolnim masenim detektorom (engl. triple quadrupole MS detector) korištena je za identifikaciju i kvantificiranje specifičnih anaboličkih steroida i drugih spojeva slične strukture u dodacima prehrani. Falsificiranje dodataka prehrani navedenim spojem može dovesti do pozitivnog rezultata na doping testu kod sportaša. Navedena metoda pokazala je separacijsku točnost i preciznost u različitim oblicima dodataka prehrani. Granice detekcije bile su niže od 7 ng/g ili ng/ml [13].

3.4. Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima

Superkrični fluid je fluid zagrijan iznad kritične temperature i komprimiran iznad kritičnog tlaka. Kritična temperatura je maksimalna temperatura na kojoj se plin može ukapljiti pri kritičnom tlaku. Kritični tlak je minimalna količina tlaka potrebna za ukapljavanje plina na njegovoj kritičnoj temperaturi. Superkrični fluid ima svojstva tekućina i plinova. Superkrični fluid ponaša se kao plin kada napuni spremnik i poprimi oblik spremnika te je kretanje molekula slično kretanju molekula plina. S druge strane, ponaša se i kao tekućina jer ima svojstva slična tekućinama kao što su gustoća, viskoznost, difuzija i druga fizikalna svojstva. Nastanak superkričnog fluida rezultat je dinamičke ravnoteže. Zagrijavanjem fluida na njegovoj kritičnoj temperaturi u zatvorenom sustavu pri konstantnom tlaku stvara se dinamička ravnoteža. Dinamička ravnoteža uključuje jednak broj molekula koje iz tekuće faze prelaze u plinsku fazu uz dobivanje energije i jednak broj molekula koje iz plinske faze prelaze u tekuću fazu uz gubitak energije. U trenutku dinamičke ravnoteže nastaje krivulja između tekuće i plinske faze i pojavljuje se superkrični fluid, što je vidljivo iz slike 5. Superkrični fluidi imaju sposobnost otapanja velikih nehalapljivih molekula te se analiti otopljeni u takvim fluidima lako regeneriraju izjednačavanjem tlaka otopine s atmosferskim tlakom pri niskim temperaturama [7]. Superkrični fluidi trebaju zadovoljiti uvjete: stabilnost, održivost, toksičnost, cijena i mogućnost otapanja određenih komponenti. Spojevi koji zadovoljavaju superkrične uvjete su: voda, CO₂, etan, propan, butan, heksan, etilen i dimetil eter [6].



Slika 5. Fazni dijagram vode [7].

Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima ili SFC, što potječe iz engl. supercritical fluid chromatography, separacijska je metoda. Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima spaja svojstva i prednosti plinske i tekućinske kromatografije. Kombinacijom svojstava HPLC i GC omogućuje se bolja identifikacija i razdvajanje spojeva. Kada se analiziraju spojevi koji se raspadaju na visokim temperaturama u plinskoj kromatografiji ili nema funkcionalnih skupina koje se lako detektiraju pomoću tekućinske kromatografije koristi se SFC. Učinkovitost i osjetljivost prednosti su korištenja SFC. Mobilna faza je superkrični fluid, a izbor ovisi o primjeni, fizikalnim svojstvima poput kritičnog tlaka i temperature i drugih čimbenika prikazanih u tablici 3. Stacionarna faza ispunjava kolonu i može biti različitog sastava, najčešće polarni silikagel ili nepolarni silikagel s C18 jedinicama ovisno o svojstvima analita. Uređaj za SFC sličan je HPLC uređaju uz nekoliko razlika. Kromatograf za SFC sadrži termostatiranu kolonsku peć i regulator tlaka. U SFC kromatografu mogu se koristiti punjene i kapilarne kolone. Na zadržavanje analita u koloni utječu gustoća mobilne faze, temperatura, tlak i sastav faza. Gustoća mobilne faze se s porastom temperature nelinearno povećava te uzrokuje jačanje mobilne faze i skraćuje vrijeme eluiranja. Koriste se isti detektori kao za HPLC: UV detektor, maseni spektrometar, detektor fluorescentnih zraka i drugi. Osim detektora koji se koriste za HPLC mogu se koristiti i detektori za plinsku kromatografiju kao što je plameno-ionizacijski detektor [14].

Tablica 3. Svojstva otapala kao mobilne faze u kritičnoj točki [7].

Otapalo	Kritična temperatura (°C)	Kritični tlak (bar)
Ugljični dioksid (CO₂)	31,1	72,0
Etan (C₂H₆)	32,3	47,6
n-butan (C₄H₁₀)	152	70,6
Dietil eter (C₂H₅)₂O	193,6	63,8
Voda	374,1	218,3

Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima primjenjuje se u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Koristi se za analizu širokog spektra lijekova, vitamina i raznih aktivnih tvari, a time i za analizu dodataka prehrani. SFC metoda koristi se za određivanje bioaktivnih spojeva, za odvajanje izomera poput L/D-aminokiselina i tvari sličnih struktura. Ugljikov dioksid najčešće se koristi kao mobilna faza u SFC, te se smatra ekološki prihvatljivom metodom. Superkritični fluid CO₂ ima kritični tlak 7,3 MPa pri temperaturi od 31 °C, ima nižu viskoznost i veću difuziju u odnosu na konvencionalne tekućine, te veću gustoću i sposobnost u usporedbi s konvencionalnim plinovima. Ova specifična svojstva čine SFC učinkovitim analitičkom metodom za analizu nestabilnih i nehlapljivih spojeva [1]. U usporedbi HPLC-om, analiza pomoću SFC omogućuje veće brzine protoka i kraće vrijeme analize. Zbog niske polarnosti CO₂, SFC je učinkovita metoda pri odvajanju hidrofobnih spojeva koji se teško odvajaju korištenjem tekućinske kromatografije [15].

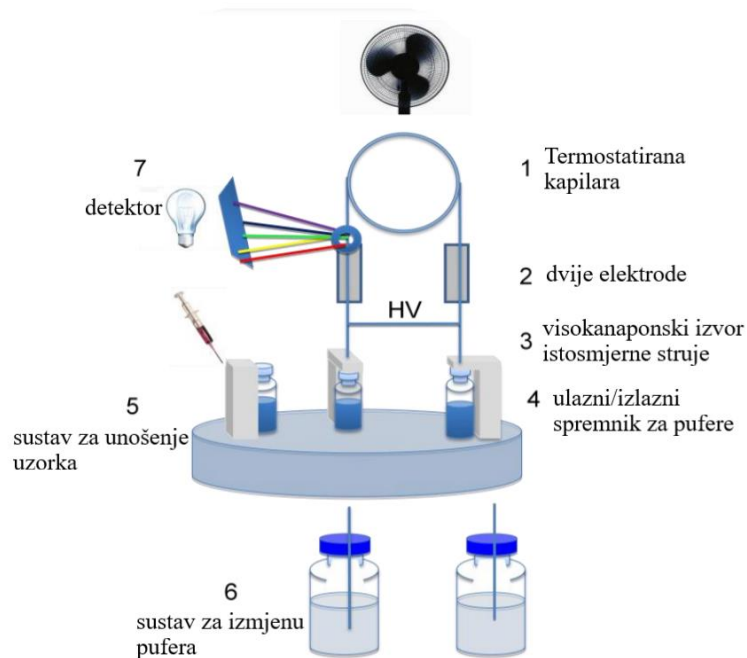
Usporedba HPLC metode s fluidnom kromatografijom pri superkritičnim uvjetima provedena je u istraživanju dodataka prehrani s ekstraktima indijskog tamjana (bosvelija). Biljni ekstrakti bosvelije sadrže aktivne sastojke poput bosvelične kiseline koja ima djelotvorne učinke na upalne procese. Bosvelična kiselina može se nalaziti u nekoliko različitih strukturnih oblika. HPLC metodom s masenim detektorom u biljnim ekstraktima bosvelije uspješno je kvantificirano šest oblika bosveličnih kiselina u manje od 13 minuta. Fluidnom kromatografijom pri super kritičnim uvjetima s masenim detektorom provedena je analiza na istim uzorcima dodataka prehrani. Za SFC-MS analizu korišten je ugljikov dioksid kao mobilna faza. Dobiveni rezultati SFC-MS metode pokazuju da se uspješno

kvantificiralo svih šest obilka bosvelične kiseline u manje od 6 minuta. Osim neusporedive brzine SFC-MS metoda pokazala je bolju selektivnost u odnosu na HPLC [16].

3.5. Elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (engl. capillary electrophoresis, CE) je relativno nova separacijska tehnika razvijena 1981. godine. Kapilarna elektroforeza analitička je metoda koja nadopunjava ili zamjenjuje tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti. Koristi se za analizu velikih molekula poput proteina, peptida, nukleinskih kiselina, organskih molekula, hormona, biljnih metabolita, lijekova, anorganskih iona i sastojaka prehrambenih proizvoda. Često se koristi u farmaceutskoj industriji te se smatra farmaceutskom tehnikom jer služi za analizu raznih ljekovitih oblika poput tableta, kapsula, pastila, krema, različitih složenih uzoraka poput biljnih materijala i hrane. Prednosti kapilarne elektroforeze su kratko vrijeme analize, bez prethodne znatnije predobrade uzorka, visoka učinkovitost, mogućnost analize svih vrsta analita uz male količine uzorka i otapala, te jednostavnost i ekološka prihvatljivost [17].

Kapilarna elektroforeza temelji se na putovanju električki nabijenih čestica u otopini elektrolita u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda. Kretanje čestica je uzrokovano djelovanjem električnog polja visokog potencijala (od 10 do 30kV). Kod kapilarne elektroforeze glavnu ulogu ima kapilara, o njoj ovisi učinkovitost razdvajanja, razlučivost i značajke signala te odziv detektora. Dužina kapilare može biti od 10 do 110 cm s unutarnjim promjerom od 50 do 300 μm . Kapilare se izrađuju od kvarca u obliku tankih kvarcnih stijenki i od fluorirane ugljikovodične smole [18]. Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu prikazana je na slici 6. Krajevi kapilare uronjeni su u dva spremnika za otopine separacijskog elektrolita. Električno polje kroz kapilaru uspostavlja se iz visokonaponskog izvora istosmjerne struje preko dvije elektrode. Uzorak se automatski injektira uz pomoć sustava za unošenje uzorka. U kapilarnoj elektroforezi temperatura je bitna za puno parametara te je termostat važan dio uređaja. Detektori koji se najčešće koriste su UV detektori (engl. diode array detector, DAD), maseni spektrometar i fluorescencijski detektori [19].



Slika 6. Shematski prikaz uređaja za kapilarnu elektroforezu [17].

U kapilarnoj elektroforezi razdvajanje analita zasniva se na razlici brzina kojima čestice putuju kroz kapilaru:

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (1)$$

gdje je v_{ep} brzina putovanja iona, μ_{ep} elektroforetska pokretljivost čestica, a E je jakost primijenjenog električnog polja.

Jakost primijenjenog električnog polja (E) ovisi o primijenjenom naponu i duljini kapilare:

$$E = \frac{V}{L} \quad (2)$$

gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L duljina kapilare u cm, dok je elektroforetska pokretljivost čestica (μ_{ep}) dana izrazom:

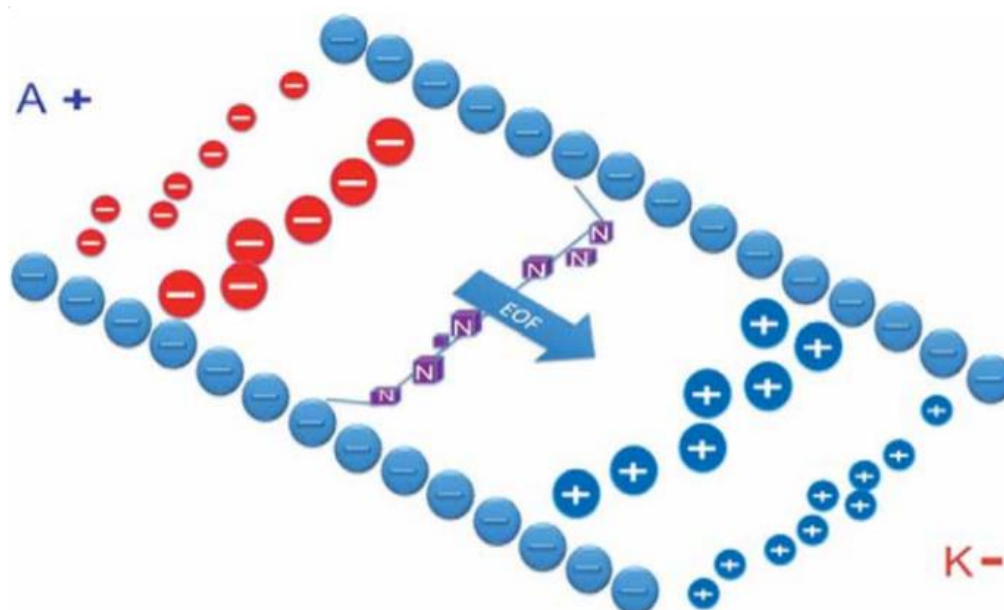
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

gdje je q naboj čestice, r polumjer čestice (Stokesov polumjer), a η viskoznost otopine elektrolita.

Povezivanjem jednadžbi (1), (2) i (3) dobije se izraz za brzinu putovanja analita (4):

$$v_{ep} = \mu_{ep}E = \frac{q}{6\pi\eta r} \cdot \frac{V}{L} \quad (4)$$

Iz dobivenih jednadžbi vidljivo je da djelovanjem električnog polja analiti unutar kapilare putuju različitom brzinom. Osim nabijenih čestica kapilarnom elektroforezom mogu se razdvojiti i neutralni analiti koji putuju kapilarnom pod djelovanjem elektroosmotskog (elektroendoosmotskog) toka (engl. electroosmotic flow, EOF) [18]. Elektroosmotskim tokom smatra se tok čiste otopine separacijskog elektrolita u kapilari, koji nastaje kao posljedica površinskog naboja u unutarnjoj stijenci kapilare. Unutarnja površina stijenke kapilare najčešće je izrađena od kvarca i ima silanolne grupe koje mogu biti u anionskoj formi ovisno o pH vrijednosti elektrolita. Elektroosmotski tok postaje značajan kod pH većeg od 4, a ovisno o pH elektrolita silanolne grupe su manje ili više ionizirane. Elektroosmotski tok se javlja i kod kapilara izrađenih od neionskog materijala, pri adsorpciji aniona na unutarnju površinu kapilare. Kod kapilara s negativno nabijenim silanolnim skupinama stvara se dvostruki električni sloj zbog djelovanja elektrostatskih sila. U čvrstom dijelu sloja raspoređeni su kationi, a u difuzijskom dijelu sloja nalaze se kationi i anioni. Promjenom napona na krajevima kapilare, kationi iz difuznog dijela dvosloja privlače se prema katodi. Obzirom da su otopljeni, prilikom kretanja prema katodi povlače i okolnu tekućinu za sobom, što uzrokuje tok cijele otopine prema katodi odnosno elektroosmotski tok što prikazuje slika 7 [17].



Slika 7. Elektroosmotski tok [17].

Elektroosmotski tok pufera ima utjecaj na vrijeme zadržavanja čestica u kapilarama u odnosu na činjenicu da se njegova elektroosmotska pokretljivost zbraja ili oduzima elektroforetskoj pokretljivosti čestica, što je dano jednadžbom:

$$t = \frac{L}{v_{ep} \pm v_{eo}} = \frac{L^2}{(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})V} \quad (5)$$

gdje je t vrijeme putovanja čestice kroz dužinu kolone.

Brzina elektroosmotskog toka u kapilari ovisi o elektroosmotskoj pokretljivosti pufera i jakosti električnog polja [17]. Elektroosmotski tok u kapilari karakterizira ravan profil toka, uzrok tome je sila koja pokreće tok i jednoliko ga raspoređuje uzduž kapilara. Odnosno uz stijenke kapilara jer nema pada tlaka unutar njih i tok je gotovo homogen cijelom duljinom kapilare. Ravan profil djeluje pozitivno jer direktno ne pridonosi disperziji analita. Prednost elektroosmotskog toka je u tome što uzrokuje kretanje svih analita u istom smjeru, neovisno o naboju. Elektroosmotski tok je usmjeren od anode prema katodi kod negativno nabijenih površina kapilara. Anioni također putuju prema katodi, jer je elektroosmotski tok veći od njihove elektroforetske pokretljivosti. Zbog toga se anioni, kationi i neutralne molekule mogu analizirati istovremeno, jer se svi kreću u istom smjeru. Najbrže putuju kationi jer je njihov elektroosmotski tok i elektroforetsko privlačenje usmjereno u istom smjeru odnosno prema katodi. Neutralne molekule se ne odvajaju jedna od druge i nošene su brzinom elektroosmotskog toka. Anioni su privučeni prema anodi i najsporije putuju [20].

Tijekom razvoja nove kapilarne elektroforetske metode potrebno je optimizirati nekoliko uvjeta koji utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita. To uključuje vrstu, koncentraciju i pH pufera, dodatak organskih otapala, vrstu i koncentraciju površinski aktivnih tvari, te napon i temperaturu pri analizi i izboru kapilara [18]. Također je potrebna kontrola nad elektroosmotskim tokom, a neki od načina kontrole prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Načini kontrole elektroosmotskog toka [18].

Parametar	Utjecaj	Komentar
električno polje	proporcionalno	smanjenjem el. polja može doći do smanjenja učinkovitosti i razlučivanja; povećanjem el. polja može doći do Jouleovog zagrijavanja unutar kapilare
pH pufera	pri većem pH, povećanje EOF-a	najučinkovitiji način promjene EOF-a; utječe i na naboj i strukturu analita
ionska jakost ili koncentracija pufera	povećanjem se smanjuje zeta potencijal i EOF	visoka ionska jakost uzrokuje visoku struju unutar kapilare i moguće Jouleovo zagrijavanje; niska ionska jakost može dovesti do adsorpcije uzorka
temperatura	mijenja viskoznost pozadinskog pufera (2-3% za svaki °C)	jednostavno se kontrolira softverom
organsko otapalo	mijenja zeta potencijal ili viskoznost (najčešće smanjuje EOF)	utjecaj je složen i učinci se najčešće određuju eksperimentalno; mogu promijeniti selektivnost metode
surfaktant	adsorpcija na stijenku kapilare hidrofobnim ili ionskim interakcijama	anionski povećavaju EOF; kationski mogu promijeniti smjer EOF-a
neutralni hidrofilni polimeri	adsorpcija na stijenku kapilare hidrofobnim interakcijama	smanjuje EOF promjenom površinskog naboja ili povećanjem viskoznosti
kovalentne modifikacije	kemijsko vezanje na stijenku kapilare	trajne su; stabilnost upitna

Kapilarna elektroforeza uključuje različite mehanizme razdvajanja, različito modificirane kapilare ili pufere te pruža različite načine detekcije i brojne prednosti. Kapilarna elektroforeza se dijeli na nekoliko vrsta prema mehanizmu razdvajanja analita, podjela je prikazana u tablici 5.

Tablica 5. Podjela kapilarne elektroforeze prema mehanizmu razdvajanja [17].

Vrste kapilarne elektroforeze	Vrste analita
Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)	Nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza (CGE)	DNA, RNA, proteini
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza (CITP)	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija (CEC)	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)	Analiti netopljivi u vodi

Kapilarna zonska elektroforeza (engl. capillary zone electrophoresis, CZE) ili drugi naziv kapilarna elektroforeza slobodne otopine najjednostavnija je vrsta kapilarne elektroforeze. Kapilara je punjena samo puferom te se princip razdvajanja tvari temelji na različitoj elektrostatskoj pokretljivosti u puferu. Različitom elektrostatskom pokretljivošću tvari putuju odvojenim zonama pri različitim brzinama. Kapilarnom zonskom elektroforezom mogu se odjeliti anionske i kationske otopljene tvari odnosno nabijeni analiti, dok neutralne otopljene tvari nije moguće odijeliti ovom metodom. Anionske i kationske otopljene tvari mogu se odvojiti kapilarno zonskom elektroforezom zahvaljujući elektroosmotskom toku [17].

Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC) smatra se kombinacijom elektroforetske i kromatografske metode, što je vidljivo iz naziva metode. Micelarna elektrokinetička kromatografija jedina je elektroforetska metoda kojom se mogu razdvojiti i neutralni analiti. Do razdjeljivanja neutralnih analita dolazi pomoću površinski aktivnih tvari (surfaktanata) koje se dodaju u pufer. Kod koncentracija surfaktanata iznad kritičnih micelarnih koncentracija stvaraju se

nakupine molekula surfaktanta, koje se nazivaju micide. Micide sadrže hidrofilni i hidrofobni dio te su sferičnog oblika. Hidrofobni repovi okrenuti su prema središtu, dok se hidrofilne polarne glave nalaze na površini s hidrofilnim puferom. Zahvaljujući različitim interakcijama između neutralnih molekula i micela dolazi do razdvajanja. Molekule surfaktanta koje tvore micide nabijene su molekule, što uzrokuje određeni naboj micela. Micide mogu biti kationi, anioni, zwitter ioni ili neionski surfaktanti, a najčešće su korištene micide anionskih surfaktanata. Anionske micide negativno su nabijene i putuju prema anodi. Međutim ukupno kretanje usmjerava se prema katodi na detektorski kraj kapilare, jer je elektroosmotski tok pri bazičnim ili neutralnim pH vrijednostima brži od brzine putovanja micela. Osim neutralnih analita i nabijeni analiti mogu ulaziti u interakcije i razdvojiti se. Analit ulazi u interakcije s micelom i duže se zadržava jer ga micela vuče u suprotnom smjeru od elektroosmotskog toka. Hidrofobniji analiti čvršće i jače ulaze u interakcije s micelom te se duže zadržavaju u kapilari [18].

Kapilarna gel elektroforeza (engl. capillary gel electrophoresis, CGE) je kapilarna elektroforeza u kojoj je kapilara ispunjena gelom. Razdvajanje kapilarnom gel elektroforezom temelji se na veličini analita koji prolaze kroz otopinu polimera te se stvara gel koji djeluje kao molekularno sito. Gelovi koji se mogu koristiti su linearno povezani gelovi (poliakrilamid), kovalentno unakrsno povezani gelovi (bis-poliakrilamid) i gelovi vezani vodikovim vezama (agaroza). Metoda kapilarne gel elektroforeze koristi se za analizu molekula DNA, RNA, proteina i peptida [17].

Kapilarno izoelektrično fokusiranje (engl. capillary isoelectric focusing, CIEF) je gel elektroforeza s visokim razlučenjem te se koristi za razdvajanje proteina i peptida. Razdvajanje kapilarno izoelektričnim fokusiranjem temelji se na razlici izoelektričnih točaka proteina i peptida. Kapilara je ispunjena analitom i amfolitom (zwitter ionom) koji sadrži kiseli i bazični dio. Katoda sadrži bazičnu otopinu, a anoda kiselu otopinu, djelovanjem električnog polja nabijeni amfoliti i analiti prolaze kroz otopinu dok ne dosegnu izoelektričnu točku. Proces se zaustavlja u izoelektričnoj točki i struja više te teče, razdvojeni analiti odlaze do detektora nošeni tlakom. Ovom metodom mogu se razdvojiti proteini čija je razlika u izoelektričnoj točki svega 0,004. Zahvaljujući visokom razlučivanju moguće je razdvojiti oko 1000 analita u kapilari od 65 cm [18].

Kapilarna izotahoforeza (engl. capillary isotachopheresis, CITP) elektroforetska je metoda u kojoj se koriste dvije elektrolitske tekućine različitih pokretljivosti za razdvajanje iona analita. Koriste se vodeća i terminalna elektrolitska tekućina, a djelovanjem električnog polja stvaraju se odijeljene zone analita između vodećeg i terminalnog elektrolita. Vodeća elektrolitska tekućina ima veću pokretljivost od analita, a terminalna elektrolitska tekućina ima manju pokretljivost. Ova metoda koristi se za analizu seruma, plazme, urina i cerebrospinalnih tekućina, a u kombinaciji s drugim metodama koristi se za koncentriranje uzorka [18].

Kiralna kapilarna elektroforeza (engl. chiral capillary electrophoresis, CCE) je elektroforetska metoda pomoću koje se analiziraju kiralne molekule uz dodatak kiralnih selektora u otopinu pufera. Kiralni selektori koji se koriste su ciklodekstrini, krunski eteri, žučne soli, kompleksi bakar(II)-aspartata, itd. Kiralna kapilarna elektroforeza jeftinija je tehnika od plinske ili tekućinske kromatografije. Kiralna elektroforeza koristi se za razdvajanje i analizu aminokiselina i kiralnih spojeva [18].

Kapilarna elektrokromatografija (engl. capillary electrochromatography, CEC) je najnovija vrsta kapilarne elektroforeze. Povezuje kapilarnu elektroforezu i kromatografiju, a karakterizira ju vrlo visoka učinkovitost. Kapilara je ispunjena kromatografskom stacionarnom fazom, a metoda se zasniva na razlici elektroforetske pokretljivosti i konstanti raspodjele između mobilne i stacionarne faze. Koristi se za razdvajanje malih molekula [17].

Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (engl. microemulsion electrokinetic chromatography, MEEKC) je elektroforetska metoda razdvajanja analita između dvije faze emulzije. Mikroemulzija se može sastojati od kapljica ulja raspršenih u vodenoj fazi ili kapljica vode u uljnoj fazi. Osim vode i organskih otapala najčešće heptana ili oktana u otopinu se dodaje surfaktant i kosurfaktant zbog stabilizacije emulzije. Koristi se za analizu tvari koje su teško topljive ili netopljive u vodi [17].

Nevodena kapilarna elektroforeza (engl. nonaqueous capillary electrophoresis, NACE) je metoda u kojoj se koriste samo organska otapala. Temelji se na odabiru odgovarajućih organskih otapala, jer viskoznost i dielektrična konstanta organskih otapala utječu na elektroforetsku mobilnost analita i elektroosmotski tok te dovode do razdvajanja. Nevodena kapilarna elektroforeza koristi se za analizu tvari netopljivih u vodi [17].

Kapilarna elektroforeza velikim se dijelom primjenjuje u analizi lijekova zahvaljujući različitim metodama za različite analite, od velikih biomakromolekula kao što su proteini, do malih organskih molekula, neutralnih molekula i iona. Koristi se za različite dozirne oblike poput tableta, kapsula, pastila, injekcijskih otopina, krema i sl. Upravo zbog toga primjenjuje se u analizi dodataka prehrani budući da oni dolaze u nekima od navedenih dozirnih oblika. Kapilarna elektroforeza je korisna, jednostavna, brza i jeftina metoda koja zahtjeva manje količine uzoraka, a pruža precizno određivanje sastava u svim dozirnim oblicima. Primjenjuje se za provjeru kvalitete i čistoće dodataka prehrani zbog visoke mogućnosti razlučivanja koje pruža. Od navedenih vrsta kapilarne elektroforeze najčešće se koristi micelarna elektrokromatografija [17]. MEKC se koristi za analizu nabijenih i nenabijenih analita te za različite tvari s hidrofobnim ili hidrofilnim karakteristikama poput vitamina, aminokiselina i brojnih aktivnih tvari. Kod vitamina poput vitamina B kompleksa i vitamina C koristi se upravo zbog minimalne pripreme uzorka i potrošnje reagensa, te ekološke prihvatljivosti i pouzdanosti metode. Kapilarna elektroforeza koristi se za analizu aminokiselina, metoda se uglavnom provodi korištenjem UV detektora za povećanje učinkovitosti i osjetljivosti pri razdvajanju. Kapilarna elektroforeza koristi se s ciljem određivanja onečišćenja i aktivnih tvari u dodacima prehrani, kao i za ispitivanje djelotvornih sastojaka koji se mogu naći kao kontaminanti i farmaceutici u dodacima prehrani [21].

Istraživanjem dodataka prehrani razvijene su tri različite elektroforetske metode korištene za određivanje karnitina u dodacima prehrani te su metode uspoređene s HPLC metodom. L-karnitin je spoj koji se formira iz aminokiselina lizina i metionina, česti je sastojak dodataka prehrani koje koriste sportaši jer ima funkciju oporavka mišića nakon vježbanja. Prva razvijena elektroforetska metoda temelji se na izotahoforezi (ITP), gdje se separacija odvija u kapilari za predseparaciju izrađenoj od poli(tetrafluor-etilena) (PTFE) i pomoću UV detektora. Druge dvije metode temelje se na kapilarno zonskoj elektroforezi (CZE) s neizravnim i izravnim UV detektorom. Kod HPLC metode također je korišten UV detektor. Usporedbom metoda i karakterističnih parametara poput linearnosti i faktora korelacije, najbolje performanse za analizu karnitina u dodacima prehrani pokazala je CZE metoda s neizravnim UV detektorom. Iako elektroforetske metode nisu pokazale statističke razlike u odnosu na HPLC metodu, elektroforetske metode dale su brže rezultate, uz smanjenu potrošnju otapala i ukupno jeftinije troškove rada. Još jedna elektroforetska metoda korištena

za analizu karnitina je kapilarna elektroforeza sa kapacitivno spregnutim beskontaktnim detektorom vodljivosti (engl. capacitively-coupled contactless conductivity detection, C⁴D). Metodom je pokazala dobru selektivnost prema karnitinu i ostalim anorganskim kationima prisutnima u analiziranim dodacima prehrani. Vrijeme potrebno za analizu iznosilo je manje od 300 sekundi s granicom kvantifikacije od 2,6 mmol/L odnosno 7,9 mmol/L za dva različita dodatka prehrani koji sadrže karnitin [22].

4. ZAKLJUČAK

Posljednjih godina sve veći broj ljudi konzumira neku vrstu dodataka prehrani, a jedan od razloga je laka dostupnost na tržištu. Dodaci prehrani ne smatraju se lijekom, nego hranom u obliku dodataka koji djelotvornim i hranjivim sastojcima nadopunjuju i poboljšavaju prehranu. Međutim postoje dodaci prehrani koji ističu i svoja ljekovita svojstva. Od zakonskih regulativa propisuju im se pravila o hrani i time nisu potrebna farmakološka ispitivanja njihovih djelotvornosti na zdravlje. Upravo zbog zakonskih regulativa proizvođačima se pruža mogućnost krivotvorenja i dodavanja sintetskih farmaceutika s ciljem što boljeg učinka na zdravlje i veću prodaju proizvoda. Da bi se izbjegla prodaja takvih proizvoda, a time i zavaravanje i štetno djelovanje na korisnike proizvoda, poseže se za detaljnijim analizama. Analitičke metode analize poput separacijskih tehnika korisne su metode za analizu sastava, kvalitete i sigurnosti dodataka prehrani. U ovom radu opisane su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, plinska kromatografija, fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima i kapilarna elektroforeza. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti metoda je koja se najčešće koristi za analizu bioaktivnih komponenti u dodacima prehrani s biljnim ekstraktima. Detektori koji se najčešće primjenjuju su UV detektor i maseni detektor. Plinska kromatografija koristi se za analizu aktivnih i bioaktivnih komponenti, te nepoznatih supstanci odnosno kontaminanta koji nisu navedeni u sastavu. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima koristi se kod analize nestabilnih i nehalapljivih spojeva, za odvajanje izomera aminokiselina i spojeva sličnih struktura. Kapilarna elektroforeza pogodna je metoda za analizu svi dozirnih oblika i ima sposobnost razdvajanja različitih molekula. Primjenjuje se za analizu tvari poput vitamina i aminokiselina te za provjeru kvalitete i onečišćenja dodataka prehrani. Sve opisane tehnike povoljne su za analizu dodataka prehrani i pružaju selektivno, učinkovito i osjetljivo razdvajanje komponenti.

5. LITERATURA

- [1] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts, *Analytica Chimica Acta*, Republika Češka, 2018.
- [2] <https://zdravstvo.gov.hr/djelokrug-1297/javnozdravstvena-zastita/hrana-1359/dodaci-prehrani-1841/sto-su-dodaci-prehrani/2203> (20.07.2021.)
- [3] Pravilnik o dodacima prehrani, NN 148/2008.
- [4] L. Muschietti, F. Redko, J. Ulloa, Adulterants in selected dietary supplements and their detection methods, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 2020.
- [5] M. Begić, Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u dodacima prehrani za erektilnu disfunkciju, Diplomski rad, Rijeka, 2018.
- [6] M. Matanović, Primjena separacijskih metoda u analitičkoj kemiji, Završni rad, Osijek, 2020.
- [7] S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2002.
- [8] <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (23.07.2021.)
- [9] T. Rocha, J. S. Amaral, M. Beatriz P.P. Oliveira, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **15** (2015) 43-62.
- [10] <https://www.crawfordscientific.com/chromatography-blog/post/hplc-uv-detection> (23.07.2021.).
- [11] H. You, B. Ireland, M. Moeszinger, H. Zhang, L. Snow, S. Krepich, V. Takagawa, *Talanta*, **194** (2019), 795-802.
- [12] Y. Di, M. Zhao, Y. Nie, F. Wang, J. Lv, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry Volume*, **2011** (2011), 1-6.
- [13] G. Micalizzi, K. Huszti, Z. Pálinkás, F. Mandolfino, É. Martos, P. Dugo, L. Mondello, M. Utczás, *Drug testing and analysis*, **13** (2021), 128-139.
- [14] Terry A. Berger, *Supercritical fluid chromatography*, Agilent Technologies, 2015.

- [15] M. F. Noh , R. Devi-Nair Gunasegavan , N. M. Khalid, V. Balasubramaniam , S. Mustar, A. A. Rashed, *Molecules*, **25** (2020), 2-45.
- [16] M. Zwerger, M. Ganzera, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **201** (2021).
- [17] M Damić, B Nigović, *Farmaceutski glasnik*, **66** (2010), 195-207.
- [18] M. Sertić, *Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom*, Završni specijalistički, Zagreb, 2016.
- [19] M. Hranilović, *Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za istovremeno određivanje gemcitabina i njegovog onečišćenja*, Diplomski rad, Zagreb, 2017.
- [20] I. Piljac, *Elektroforeza*, Media Print, Zagreb, 2006.
- [21] E. M Mudge, J. M Betz, P. N Brown, *Adv Nutr*, **7** (2016), 390-398.
- [22] A. Rocco, E. Donati, E. Touloupakis, Eleftherios, Z. Aturki, *Trends in Analytical Chemistry* **103** (2018), 156-183.