Jacek Kozioł

METODY OZNACZANIA WITAMIN B_2 I B_6

Po dłuższym okresie względnego zastoju ponownie obserwuje się wzrost zainteresowania wielu ośrodków naukowych problematyką witaminową, a zwłaszcza występowaniem w żywności i rolą w żywieniu witamin rozpuszczalnych w wodzie. Świadczy o tym lawinowy wzrost ilości publikacji, badania inicjowane przez zespoły naukowe Instytutu Żywności i Żywienia, fakt zorganizowania przez Komitet Technologii i Chemii Żywności PAN Szkoły Letniej (Jachranka 1985 r.), a także planowanie w następnych latach kursów i konferencji FEBS na temat chemii i fizjologii witamin rozpuszczalnych w wodzie.

Do najważniejszych przyczyn powodujących wzrost zainteresowania tą problematyką należy zaliczyć:

1 - uzasadnioną wątpliwość czy stare dane o zawartości witamin w żywności są aktualne wobec katastrofalnego zanieczyszczenia środowiska,
2 - zmiany w technologii wytwarzania i przetwarzania żywności oraz niekorzystne zmiany w sposobie odżywiania się (u nas pogłębione kryzysem),
3 - radykalny postęp badań podstawowych w zakresie biochemii i fizjologii pozwalający dziś znacznie lepiej rozumieć złożoną rolę witamin stanowiących integralną część układów enzymatycznych,
4 - kolejną rewolucję techniczną owocującą nową generacją skomputeryzowanych przyrządów pomiarowych o wysokiej czułości i dokładności oraz nowymi technikami laboratoryjnymi.

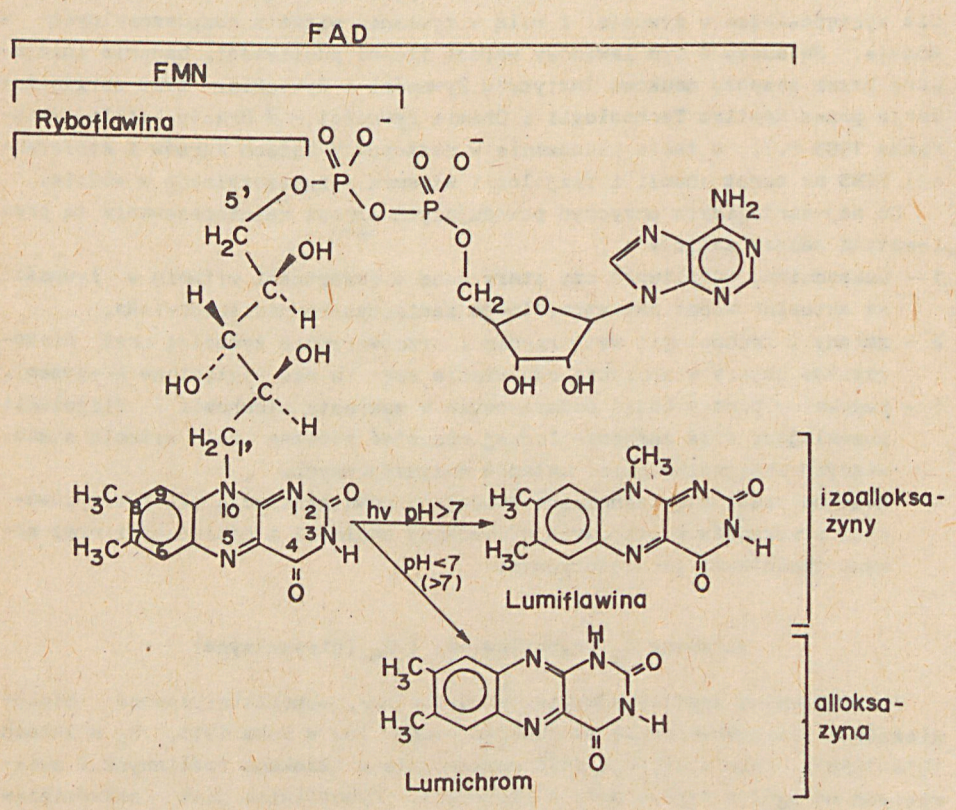
Witaminy B_2 (ryboflawina) i B_6 (pirydoksyna)

Obie witaminy zostały odkryte, wyodrębnione, scharakteryzowane biologicznie i fizykochemicznie stosunkowo późno (B_2 w roku 1933, B_6 w latach 1934-1938), obie występują dość powszechnie w tkankach roślinnych i zwierzęcych na ogół w bardzo małych ilościach. Ryboflawina jest składnikiem oksydaz i dehydrogenaz decydujących o tzw. oddychaniu tkankowym i w wielu układach jest kowalencyjnie związana z białkiem enzymu, pirydoksyna wchodzi w skład aminotransferaz i dekarboksylaz [1].

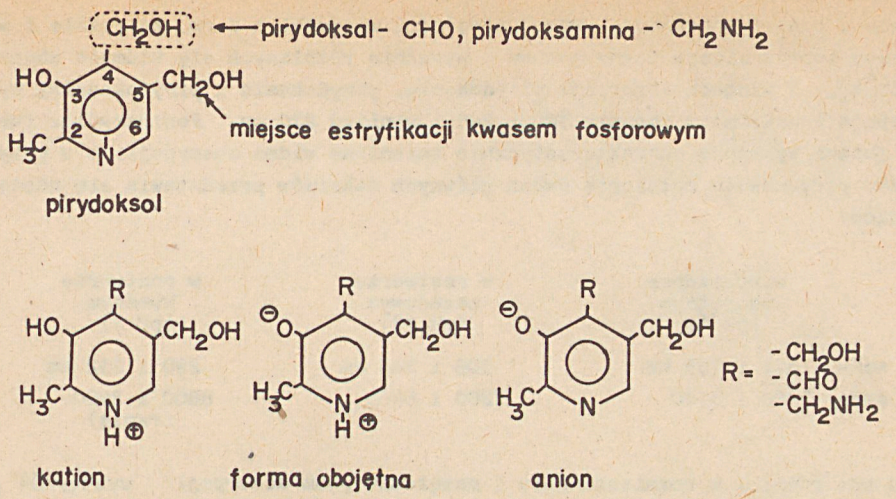
W naszej strefie klimatycznej do rzadkości należy awitaminoza B_2 lub B_6, często występuje hipowitaminoza (zwłaszcza B_6). Zapotrzebowanie dobowe organizmu człowieka przyjmuje się na 2 mg witaminy B_2 i 1,5-2 mg witaminy B_6. Obie witaminy są wrażliwe na światło, ulegają wypłukiwaniu z tkanek w czasie gotowania potraw oraz powolnemu rozkładowi termicznemu. Głównymi źródłami witaminy B_2 są zboża, wątroba i mleko, a B_6 zboża, mięso i warzywa [1,2].

Obie witaminy występują w kilku formach, a biologiczną aktywność przejawiają tylko ich fosforany. Poszczególne formy witamin B_2 (rys. 1) i B_6 (rys. 2) różnią się znacznie właściwościami fizykochemicznymi ważnymi dla celów analitycznych, tj. rozpuszczalnością, absorpcją światła w różnych zakresach, reaktywnością chemiczną i biochemiczną, odpornością na działanie czynników zewnętrznych [1-4].

Ryboflawina jest trudno rozpuszczalna w wodzie, 5-fosforan ryboflawiny tzw. flawinomononukleotyd (FMN) i flawinoadeninodinukleotyd (FAD) znacznie lepiej, wszystkie są trudno rozpuszczalne w środowiskach o niskiej polarności. W wodnych roztworach kwasów rozpuszczalność wszystkich form jest dobra, ale zwłaszcza przy ogrzewaniu następuje degradacja FAD do FMN, tego ostatniego do ryboflawiny, która z kolei w obecności światła fotoli-



Rys. 1. Ryboflawina, jej nukleotydy i produkty rozpadu



Rys. 2. Pirydoksyna, główne witaminy i formy jonowe

zuje do lumichromu. W roztworach alkalicznych następuje szybka defosforylacja FAD i FMN oraz fotochemiczna degradacja wolnej ryboflawiny do lumiflawiny (i częściowo lumichromu). Właściwości spektralne wszystkich form izoalloksazynowych (ryboflawiny, FMN, FAD i lumiflawiny) są podobne, w obojętnych roztworach wodnych maksima absorpcji występują przy 220, 262, 373 i 445 nm, maksimum fluorescencji przy ok. 535 nm (fluorescencja FAD w roztworach o pH 3 stanowi zaledwie 15% obserwowanej przy pH 6). Dla celów analitycznych wykorzystuje się dwa długofalowe maksima absorpcji [1,3]. Właściwości fizykochemiczne flawin silnie związanych z białkami ulegają istotnym zmianom.

Flawiny ulegają łatwo odwracalnej redukcji (utleniają się tlenem powietrza) do semichinonów i chinonów (formy kationowe obojętne i anionowe), są dość odporne na działanie łagodnych środków utleniających. Wszystkie znane formy flawin tworzą łatwo wiązania wodorowe z innymi związkami (FAD również wewnątrzcząsteczkowe), a także tzw. kompleksy z przeniesieniem ładunku.

Przyjmuje się, że ryboflawina, FMN i FAD są równocenne biologicznie przy podawaniu organizmom testowym [1,2,3,].

Chlorowodorek pirydoksolu oraz jego fosforan są łatwo rozpuszczalne w wodzie, fosforan pirydoksalu trudno, ale chlorowodorek łatwo, dwuchlorowodorek pirydoksaminy i fosforan pirydoksaminy są łatwo rozpuszczalne w wodzie; wszystkie formy są trudno rozpuszczalne w alkoholu i innych rozpuszczalnikach organicznych. W wodnych roztworach kwasów rozpuszczalność wszystkich form jest znacznie lepsza, długotrwałe podgrzewanie prowadzi do defosforylacji i powolnego rozkładu lub reakcji z innymi związkami obecnymi w roztworze. Wszystkie formy są bardzo wrażliwe na działanie światła, nie mogą być poddawane redukcji ani utlenianiu. Pirydoksol jest najtrwalszym z witamerów B_6, pozostałe są znacznie labilniejsze, zwłaszcza w środowisku alkalicznym, a najmniej trwały jest fosforan pirydoksalu. Zwią-

zanie z białkiem powoduje wzrost trwałości wszystkich form. Wszystkie 3 witamery tworzą liczne formy jonowe o wyraźnie różniących się widmach absorpcji [4]. W widmach absorpcji pirydoksolu, pirydoksalu i pirydoksaminy występują 3 maksima w rejonie 320 i 245 i poniżej 220 nm. Poszczególne formy jonowe wykazują charakterystycznie zmienione widma absorpcji, a w przypadku pirydoksalu położenie dwóch głównych maksimów przedstawia się następująco:

	w roztworze obojętnym (pH 6)	w roztworze zasadowym (pH 12)	w roztworze kwaśnym (pH 2)
maks.	322 i 253 nm	308 i 245 nm	290 i 232 nm
maks.	7200 i 3700	7200 i 6400	8800 i 2200 (ramię)

Podobne różnice w rozmieszczeniu i natężeniu pasm absorpcji występują w przypadku pozostałych witamerów B_6. Do celów analitycznych wykorzystywane są najczęściej długofalowe maksima absorpcji. Wszystkie witamery wykazują zdolność do fluorescencji emitowanej w rejonie 385-400 nm z niską wydajnością kwantową (~0.1). Najwyższe natężenie fluorescencji obserwuje się dla form obojętnych wszystkich witamerów [1,4].

Przyjmuje się, że najaktywniejszą formą witaminy B_6 jest pirydoksal (najbardziej labilny) występujący razem z pirydoksaminą w produktach zwierzęcych. W produktach pochodzenia roślinnego przeważa pirydoksol (najtrwalszy). Wszystkie witamery mogą w komórkach tkankowych łatwo ulegać fosforylacji i przechodzić w inne formy (np. pirydoksylo-5'-fosforan może zostać utleniony do pirydoksalu, a ten ulec transaminacji do pirydoksaminy). Niektóre mikroorganizmy wykazują zróżnicowaną wrażliwość na poszczególne formy witaminy B_6 [1,5,6].

Metody oznaczania

Oznaczanie składników występujących w bardzo małych ilościach, w tak złożonych układach jakimi są produkty pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, jest zadaniem wymagającym dokonywania wyboru pomiędzy licznymi sposobami przygotowania i obróbki materiału, wyodrębniania i rozdzielania składników oraz metodami pomiaru zawartości interesującego nas związku. Wybór odpowiedniego sposobu postępowania jest zawsze wynikiem kompromisu możliwego do zaakceptowania przy uwzględnieniu wielu, często sprzecznych ze sobą kryteriów.

Do najważniejszych kryteriów, które należy wziąć pod uwagę przy wyborze procedury analitycznej można zaliczyć:

- właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne oznaczanego związku oraz form w jakich występuje,
- rodzaj pożądanego wyniku oraz granice czułości i dokładności metody (czy wystarczy wynik jako suma występujących form, czy trzeba oznaczyć poszczególne formy, czy wystarczy wynik w skali mikro-, czy też potrzebny jest w skali nano-),

praco- i czasochłonność metody oraz możliwość automatyzacji pomiarów; na ogół opłaca się stosowanie szybkich i łatwych metod i statystyczne opracowanie wyników,

specyficzność metody; zwykle metoda specyficzna mimo niższej czułości daje lepsze wyniki niż czulsza niespecyficzna (np. fluorymetria w w porównaniu z absorpcjometrią),

pomiar zjawiska zależnego liniowo od zawartości oznaczanego składnika, czy też zakłócenie tego obrazu (to ostatnie zwykle daje podwyższenie czułości i specyficzności metody),

dostępność próbki: wybór pomiędzy metodami zużywającymi i nie zużywającymi próbki w czasie pomiaru,

rodzaj dostępnego wyposażenia i aparatury pomiarowej; często opłaca się skorzystać z aparatury nowocześniejszej w cudzym laboratorium,

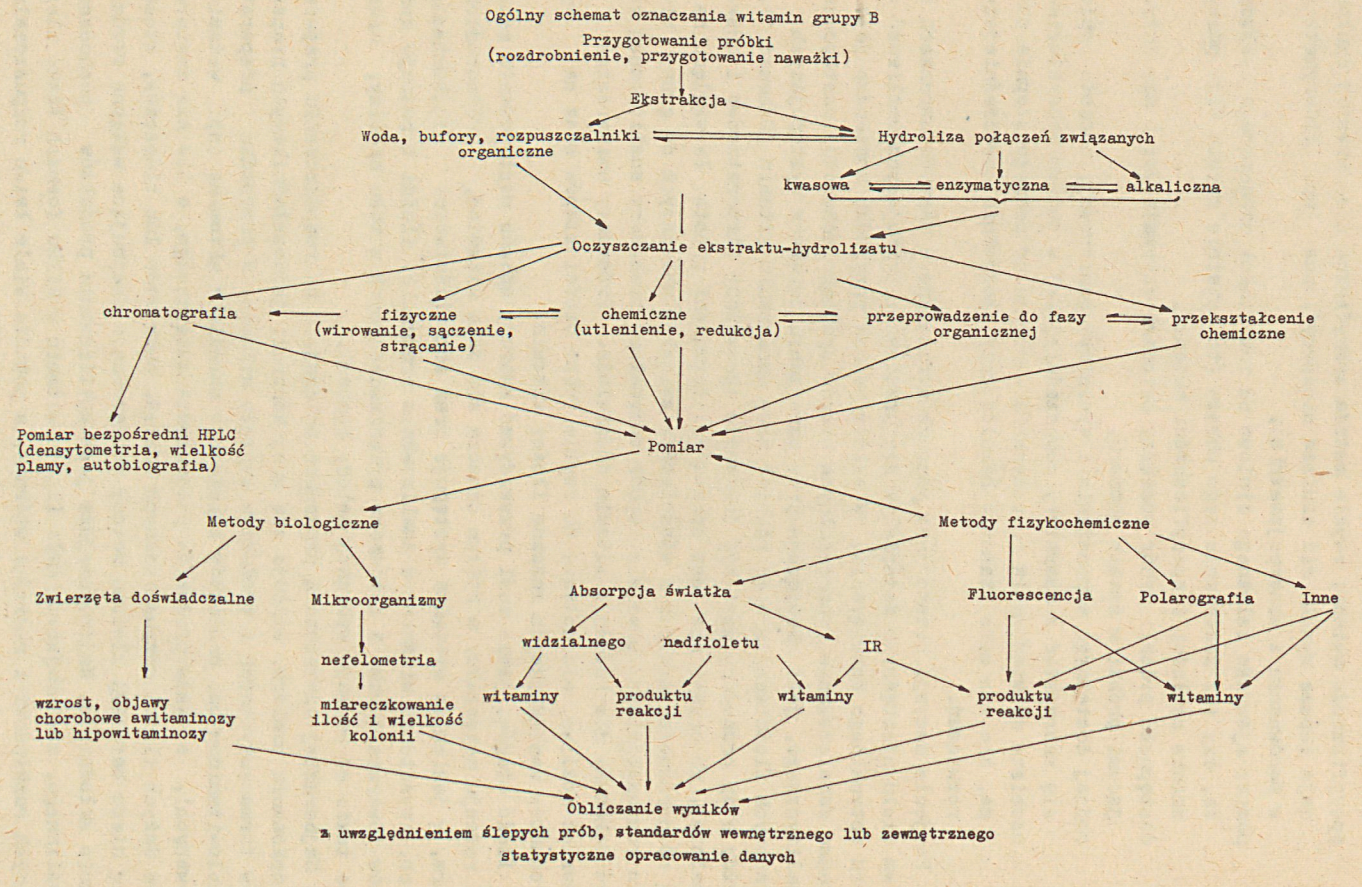
osobiste doświadczenia i upodobania - rutyna do pewnego stopnia pomaga, ale nie może stanowić hamulca przy stosowaniu nowocześniejszych rozwiązań.

Podjęcie decyzji często jest jeszcze utrudniane w naszych warunkach brakiem wielu niezbędnych materiałów czy urządzeń eliminujących możliwość wyboru optymalnego rozwiązania. W każdym jednak przypadku konieczne jest dokładne zanalizowanie poszczególnych etapów ogólnego schematu postępowania analitycznego, jaki obowiązuje przy oznaczaniu związków występujących w śladowych ilościach, a więc również przy oznaczaniu witamin (Schemat 1). Każdy etap procedury musi być dokładnie sprawdzony (literaturowo i doświadczalnie), co często nie jest sprawą ani łatwą ani prostą. Ze względu na dużą różnorodność struktur i właściwości związków należących do grupy witamin rozpuszczalnych w wodzie, wybór optymalnej procedury analitycznej musi być dokonany dla każdej z witamin oddzielnie. Procedury uniwersalne są również możliwe, ale dotyczy to zwykle tylko części etapów oraz na ogół produktów zawierających znaczne ilości witamin.

Ilość etapów, jakie musi przewidywać wybrany sposób postępowania zależy od rodzaju materiału, w którym oznacza się daną witaminę, różnorodności form, w jakich ta witamina występuje oraz ich właściwości fizykochemicznych, zawartości witaminy w analizowanym produkcie, ilości i rodzaju związków towarzyszących, a zwłaszcza przeszkadzających w toku analizy, wreszcie także od rodzaju wybranej metody pomiaru.

Najbardziej uproszczoną procedurę polegającą na rozpuszczeniu preparatu i dokonaniu pomiaru, stosuje się przy kontroli jednoskładnikowych preparatów farmaceutycznych i produktów syntezy witamin. W przypadku preparatów wielowitaminowych, produktów bogatych w określoną witaminę (np. witaminizowanych), a także produktów pochodzenia zwierzęcego, o ile nie zawierają one dużych ilości rozpuszczalnych białek, cukrowców lub tłuszczów, stosuje się nieco bardziej złożone metody postępowania obejmujące wstępne rozdzielenie składników. Najtrudniejsze jest analizowanie produktów pochodzenia roślinnego, zawierających małe ilości witamin w kilku formach łatwo ulegających rozkładowi i reakcjom wtórnym, a ponadto wiele łatwo rozpuszczalnych białek, cukrowców, barwników i innych związków utrudniających wyodręb-

Schemat 1


Ogólny schemat oznaczania witamin grupy B
Przygotowanie próbki
(rozdrobnienie, przygotowanie naważki)
Ekstrakcja
Woda, bufory, rozpuszczalniki organiczne
Hydroliza połączeń związanych
kwasowa
enzymatyczna
alkaliczna
Oczyszczanie ekstraktu-hydrolizatu
chromatografia
fizyczne (wirowanie, sączenie, strącanie)
chemiczne (utlenienie, redukcja)
przeprowadzenie do fazy organicznej
przekształcenie chemiczne
Pomiar bezpośredni HPLC (densytometria, wielkość plamy, autobiografia)
Pomiar
Metody biologiczne
Metody fizykochemiczne
Zwierzęta doświadczalne
Mikroorganizmy
Absorpcja światła
Fluorescencja
Polarografia
Inne
widzialnego
nadfioletu
IR
nefelometria
wzrost, objawy chorobowe awitaminozy lub hipowitaminozy
miareczkowanie ilość i wielkość kolonii
witaminy
produktu reakcji
witaminy
produktu reakcji
witaminy
Obliczanie wyników
z uwzględnieniem ślepych prób, standardów wewnętrznego lub zewnętrznego
statystyczne opracowanie danych

nienie oznaczanych składników. Wówczas konieczne jest zastosowanie wieloetapowej procedury analitycznej i szczegółowej standaryzacji warunków przeprowadzania analizy.

W przypadku witamin B_2 i B_6, ze względu na ich różne właściwości fizykochemiczne, możliwości zastosowania identycznej procedury analitycznej właściwie ograniczają się do przygotowania próbki (rozdrobnienie i przygotowanie naważki).

Ekstrakcja

F l a w i n y. W zależności od rodzaju produktu, oznaczania poszczególnych form flawin lub ich sumy (po hydrolizie FAD i FMN) oraz obecności flawin silnie związanych z białkami, ekstrakcję prowadzi się: gorącą wodą lub buforem (denaturacja fosfataz), gorącymi rozcieńczonymi kwasami czy mieszaninami rozpuszczalników organicznych. Następnie przeprowadza się hydrolizę enzymatyczną towarzyszących związków wielkocząsteczkowych, z którymi flawiny są związane (białka) lub na których się absorbują (skrobia, błonnik) oraz ewentualnie hydrolizę połączeń fosforanowych (FAD i FMN). Wraz z flawinami do ekstraktu przechodzą ich metabolity o strukturze izoalloksazynowej i alloksazynowej [3,5,6].

W i t a m e r y B_6. Ze względu na brak silnych połączeń z białkami poszczególne formy witaminy B_6 dają się łatwo wyekstrahować rozcieńczonymi kwasami (mniej stężonymi dla produktów pochodzenia zwierzęcego) na gorąco. W tych warunkach niekontrolowanej hydrolizie ulegają połączenia fosforanowe. W przypadku oznaczania fosforylowanych form witamerów B_6 stosuje się ekstrakcję na zimno lub na ciepło rozcieńczonymi wodnymi roztworami kwasów, ostatnio również takich jak wolframowy, nadchlorowy, metafosforowy, sulfosalicylowy czy trójchlorooctowy, buforami, a także roztworami alkoholi (desorpcja witamerów z makrocząsteczek). W razie potrzeby połączenia fosforanowe są następnie hydrolizowane enzymatycznie [4,5,6].

Oczyszczanie ekstraktu-hydrolizatu

W niektórych przypadkach (preparaty farmaceutyczne, niektóre produkty witaminizowane lub użycie metody pozwalającej na pomiar w obecności związków towarzyszących) ten etap może być pominięty.

F l a w i n y. Tradycyjnie stosuje się rozkład zanieczyszczeń tzw. utlenianiem przy pomocy $KMnO_4$ (powoduje jednak częściowy rozkład flawin w roztworach o małej zawartości zanieczyszczeń - raczej nie powinno być stosowane), redukcję ditioninem sodu oraz różne metody rozdziału chromatograficznego, np. na kolumnach wypełnionych żelem krzemionkowym czy niedostępnym u nas Florosilem. Dobre wyniki uzyskano stosując żywicę rezorcynowo-formaldehydową R-15, na której ulegają ilościowej sorpcji: wolna ryboflawina, FMN, FAD oraz liczne metabolity, w tym alloksazyny. Ilościowo przebiegająca elucja pozwala na rozdzielenie sumy FAD i FMN, ryboflawiny oraz na końcu różnie podstawionych alloksazyn [3].

Bywa również stosowana fotoliza flawin (po hydrolizie FAD i FMN) w środowisku alkalicznym do lumiflawiny, ekstrakcja tej ostatniej chloroformem i oznaczenie metodą fluorymetryczną. Mimo wysokiej specyficzności tego przekształcenia i zastosowania ekstrakcji z fazy wodnej do organicznej (pozwala na dodatkowe usunięcie zanieczyszczeń) metoda ta nie może być polecana ze względu na nieilościowy przebieg reakcji oraz równoległe powstawanie pochodnych o strukturze alloksazynowej [3,7].

W i t a m e r y B_6. Właściwie jedynymi, od dawna stosowanymi metodami oczyszczania ekstraktów i rozdzielenia poszczególnych form B_6 są metody chromatograficzne z wykorzystaniem anionitów, chromatografii cienkowarstwowej czy elektroforezy. Na ogół uzyskuje się dobry ilościowy rozdział wolnych form witamerów B_6. Wstępnie obiecujące wyniki uzyskano również przy zastosowaniu żywicy rezorcynowoformaldehydowej R-15. Rozdział wszystkich form B_6 (wolnych i fosforylowanych) może być uzyskany przy zastosowaniu chromatografii opartej na tworzeniu par jonowych w układzie z odwróconymi fazami. W przypadku dużej zawartości B_6 w badanym produkcie można przeprowadzać reakcje barwne z 2,6-dichlorochinochlorimidem, z p-dimetyloaniliną w obecności utleniacza (witamery trzeba wstępnie przeprowadzić w formę reagującą z danym odczynnikiem). Stosuje się również przeprowadzenie wszystkich obecnych form B_6 w kwas pirydoksonowy a następnie w lakton silnie fluoryzujący niebiesko w roztworach alkalicznych (pH 10). Inną możliwość daje przeprowadzenie pirydoksolu i pirydoksalu w pochodną cyjanohydrynową o silnej fluorescencji (pirydoksaminę trzeba wstępnie przeprowadzić w pirydoksal). Wszystkie te reakcje, mimo znacznej specyficzności, nie przebiegają całkowicie ilościowo i nie powinny być zalecane [7,8].

Pomiar zawartości witamin

Ten etap procedury analitycznej daje pozornie największe możliwości wyboru. Jednak przy wnikliwym rozpatrzeniu wszystkich wariantów, uwzględnieniu najważniejszych kryteriów i nieuniknionych kompromisów możliwy wybór ogranicza się do jednej z metod biologicznych i rzadko do więcej niż jednej metody fizykochemicznej.

M e t o d y b i o l o g i c z n e. Wykorzystanie doświadczalnych organizmów żywych jest nieuniknione w określonych przypadkach, ponieważ tylko w ten sposób można uzyskać wiążące dane o rzeczywistej, biologicznej wartości poszczególnych form witamin w określonych warunkach. Ze względu na uciążliwość i koszt tego rodzaju badań z wykorzystaniem wyższych organizmów zwierzęcych (dla flawin: szczury i kurczęta, dla witamerów B_6: szczury, kurczęta Leghorn, larwy Coreyra cephalonica) w analizach rutynowych powszechnie są stosowane mikroorganizmy. Wyselekcjonowane szczepy o ściśle określonej wrażliwości reagują na zawartą w pożywce witaminę wydzielając do podłoża metabolity (np. kwasy), zwiększając rozmiary kolonii lub stopień zmętnienia pożywki płynnej - natężenie tych objawów jest mierzone i powinno być w określonych granicach liniowo zależne od stężenia witaminy [5-7].

W przypadku flawin stosowany jest Lactobacillus casei subspecies rhamnosus ATCC No. 7469 [5-7]. Dla witamerów B_6 wykorzystywać można kilka szczepów: Saccharomyces carlsbergensis (ATCC No. 4228) i uvarum (ATCC No. 9080), Neurospora sitophila, Kloeckera brevis (wszystkie prawie w jednakowym stopniu wrażliwe na poszczególne witamery B_6), Lactobacillus casei (o dwa-trzy rzędy wielkości bardziej wrażliwy na pirydoksal niż na pozostałe formy), Streptococcus faecalis (mało wrażliwy na pirydoksol) i ponadto Streptobacterium planetarum, Escherichia coli i inne. Możliwość różnicowego oznaczania poszczególnych form witaminy B_6 przy zastosowaniu kilku mikroorganizmów ostatnio jest rzadko wykorzystywana. Najczęściej rozdzielone chromatograficznie witamery B_6 są oznaczane przy zastosowaniu tego samego organizmu testowego [5-7].

Metody mikrobiologiczne mające walor wysokiej specyficzności i czułości są jednak kłopotliwe w stosowaniu, czaso- i pracochłonne, ich automatyzacja wydaje się nierealna. Uzyskiwane wyniki po opracowaniu statystycznym są dokładne i powtarzalne.

M e t o d y f i z y k o c h e m i c z n e . Większość znanych metod nie zapewnia dostatecznej czułości i specyficzności. Dlatego też jedynie w przypadkach czystych preparatów i produktów witaminizowanych stosuje się metody elektrochemiczne (miareczkowanie potencjometryczne, polarografię) czy pomiary absorpcjometryczne (spektrofotometryczne) w stosunku do oddzielnych form witamin B_2 i B_6 (dla tej ostatniej częściej do produktów ich reakcji) [5-7].

Metodami odpowiadającymi w optymalnym stopniu kryteriom wyboru są metody oparte na pomiarze fluorescencji, a w przypadku B_6 również fosforescencji (ze względu na konieczność spełnienia dodatkowych warunków, rzadko stosowana). Wysoka czułość i specyficzność pomiarów fluorescencji jest wykorzystywana zarówno w klasycznym układzie (fluorymetry i spektrofluorymetry), jak i w detektorach stosowanych w chromatografii cieczowej. Względnie niska popularność metod fluorymetrycznych jest powodowana głównie:

a. trudnościami aparaturowymi; obecnie powszechnie dostępne są dobre źródła światła, filtry, monochromatory oraz bardzo czułe detektory i dysponując tymi elementami można z łatwością zbudować dobry fluorymetr, dostępne są również dobre absorpcjometry typu Spekol (Spekol-10, Spekol-11) z przystawkami do pomiarów fluorescencji,
b. zależnością zjawiska fluorescencji od takich warunków, jak: temperatura, pH roztworu, polarność rozpuszczalnika, obecność tlenu i innych wygaszaczy fluorescencji, możliwość zachodzenia reakcji fotochemicznej, co wymaga ścisłej standaryzacji metody.

Flawiny. Pomiary fluorescencji flawin mogą być przeprowadzone na dowolnym fluorymetrze, ponieważ wzbudzać należy światłem o długości fali około 445 lub 375 nm, co można łatwo uzyskać stosując palniki halogenowe lub rtęciowe. Naturalna fluorescencja flawin (w wodnych roztworach maksimum emisji przy ok. 535 nm) jest mierzona przed i po dodaniu ditioninu sodu, który redukuje flawiny do formy nie fluoryzującej w tym zakresie widma.

W przypadku obecności w roztworze pochodnych alloksazyny (metabolitów flawin) należy wykonać również pomiar wzbudzając fluorescencję przy ok. 390 nm (emisja fluorescencji w rejonie 480 nm, w obecności kwasu octowego lub pirydyny ~530 nm).

Fluorescencja tych związków silnie zależy od polarności środowiska, przy stosowaniu rozpuszczalników organicznych ich stężenie w roztworze musi być ściśle określone lub muszą być usunięte [3].

Witamery B_6. Do pomiarów fluorescencji form witaminy B_6 (a także silniej fluoryzujących produktów ich reakcji) trzeba stosować światło wzbudzające o długości fali 320-330 nm, fluorymetr z optyką kwarcową w części wzbudzającej i oczywiście kwarcowe kuwety pomiarowe. Emitowana fluorescencja (385-400 nm) występuje w rejonie dużej czułości większości detektorów.

Słabą fluorescencję witamerów B_6 można mierzyć wówczas, gdy dysponuje się czystymi roztworami (po chromatografii) o pH odpowiadającym ściśle najsilniej fluoryzującej formie obojętnej. Oznaczenie poszczególnych witamerów B_6 jest możliwe przez dodanie czteroboranu sodu do części próby (tłumi fluorescencję pirydoksolu) i dokonanie pomiaru, następnie dodanie H_2O_2 (rozkłada pirydoksal) i ponowny pomiar. Zniszczenie wszystkich form B_6 dla uzyskania tzw. ślepej próby można uzyskać przez kilkuminutowe naświetlanie roztworu światłem nadfioletowym [7,8].

Obliczanie wyników

Pomiary muszą być wykonywane wielokrotnie. Przeprowadzenie pomiarów co najmniej trzech równoległych prób daje w przypadku zbieżności wyników podstawę do uśrednienia, a także możliwość wykrycia podstawowych błędów. Oczywiście pożądana jest zawsze statystyczna weryfikacja wyników.

Niezależnie od tych oczywistych wymogów jeden szczegół jest dyskusyjny - czy należy stosować tzw. standard wewnętrzny czy też zewnętrzny. Zdając sobie sprawę z intuicyjnie wyraźnych zalet standardu wewnętrznego, przy pomiarach metodami fizykochemicznymi bezpieczniejsze jest stosowanie standardu zewnętrznego, jako bardziej wiarygodnego i powodującego mniej trudności interpretacyjnych. Oczywiście powinien to być roztwór standardowy zawierający wszystkie odczynniki stosowane w toku analizy i poddany całej procedurze analitycznej równolegle z próbką [3-5].

Wydaje się bliski moment radykalnych zmian w zakresie procedury analitycznej jakościowego i ilościowego oznaczania poszczególnych form witamin. Świadczą o tym rezultaty osiągane ostatnio przez ośrodki opracowujące metodykę rozdziału i ilościowej interpretacji wyników z wykorzystaniem wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) [8], zwłaszcza przy zastosowaniu tzw. chromatografii par jonowych w układzie faz odwróconych i detektora fluorymetrycznego.

Najciekawsze prace na temat nowych procedur analitycznych opublikowali ostatnio w odniesieniu do flawin - H. Ohkawa i in. [9], wydzielając i oznaczając obok zwykłych form flawin nowe metabolity powstające w organiź-

mie człowieka, I.D. Lumley i R.A. Wiggins [10], wydzielając i oznaczając ilościowo ryboflawinę i FMN w produktach spożywczych z dużą dokładnością, a w odniesieniu do witaminy B_6 - J.T. Vanderslice i in. [11] po cyklu prób przeprowadzając rozdzielenie i oznaczenie wszystkich 6 witamerów obecnych w produktach spożywczych (wyniki oznaczeń ilościowych są w zgodzie z wynikami oznaczeń mikrobiologicznych wg standardowej procedury AOAC [5]).

Analiza przy pomocy HPLC jest najprostszym możliwie postępowaniem, pomiaru dokonuje się w momencie zakończenia rozdziału chromatograficznego, cały tok postępowania jest łatwy do standaryzacji i może być całkowicie zautomatyzowany przy użyciu prostych mikroprocesorów [11]. Wyposażenie chromatografu cieczowego w dodatkowy detektor masowy pozwala już obecnie na identyfikację struktury oznaczanej formy witaminy lub nawet metabolitu, a użycie detektora typu diode-array pozwala na zobaczenie i zarejestrowanie widm absorpcji oraz/lub emisji oznaczonej formy.

Literatura

[1] D.E. Metzler - Biochemistry, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1977.

[2] Praca zbiorowa - Towaroznawstwo Produktów Spożywczych, Red. A. Lempka, Wyd. 2, PWE, Warszawa 1975.

[3] J. Kozioł w: "Vitamins and Coenzymes", (wyd. D.B. McCormick, L.D. Wright) w: "Methods in Enzymology" (wyd. S.P. Collowick, N.O. Kaplan) Academic Press, New York-London 1970, cz. B, t. 18, s. 253-285.

[4] R.J. Johnson, D.E. Metzler w: "Vitamins and Coenzymes", (wyd. D.B. McCormick, L.D. Wright) w: "Methods in Enzymology" (wyd. S.P. Collowick, N.O. Kaplan) Academic Press, New York-London, 1970, t. 18, cz. A, s. 433-471.

[5] "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", Wyd. W. Horwitz, Washington D.C., 13-th ed. 1980, s. 734-774.

[6] Praca zbiorowa: „Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności", Red. U. Rutkowska, PZWL, Warszawa 1981.

[7] R. Strohecker, H.M. Henning - "Vitamin Assay", Verlag Chemie, Weinheim, 1965.

[8] J.N. Thompson w "Trace Analysis", Ed. J.F. Lawrence, Vol. 2, Academic Press, New York 1982, s. 1-61.

[9] H. Ohkawa, N. Ohishi i K. Yagi - J. Biol. Chem., 258, 5623-5628 (1983).

[10] J.D. Lumley i R.A. Wiggins - Analyst, 106, 1103-1108 (1981).

[11] J.T. Vanderslice, S.R. Brownlee i M.E. Cortissoz - J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 999-1007 (1984).

METHODS OF VITAMIN B_2 AND B_6 DETERMINATION

Summary

A review is presented dealing with properties of riboflavin, pirydoxol and their derivatives, general criteria of selecting analytical methods and a scheme of multistep universal analytical procedure.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ B_2 И B_6

Резюме

На основе результатов собственных исследований и данных, опубликованных другими авторами, дается характеристика свойств рибофравина, пиридоксина и их важнейших производных; а также рассматриваются критерии выбора метода анализа и ход его проведения.