



## *In vitro* ispitivanje adsorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit

### *In vitro* study of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> adsorption on zeolite

Zorica Basić\*, Vesna Kilibarda<sup>†</sup>, Silva Dobrić<sup>‡</sup>, Radmila Resanović<sup>§</sup>

Vojnomedicinska akademija, \*Institut za higijenu, <sup>†</sup>Centar za kontrolu trovanja, <sup>‡</sup>Institut za naučne informacije, Beograd, Srbija; <sup>§</sup>Veterinarski fakultet, Beograd, Srbija

#### Apstrakt

**Uvod/Cilj.** Zeoliti su hidratisani alumosilikati alkalnih i zemnoalkalnih katjona koji imaju dugu trodimenzionalnu kristalnu strukturu. Preparati na bazi zeolita koriste se za adsorpciju toksičnih materija organskog i neorganskog porekla i nalaze sve širu primenu u veterinarskoj i humanoj medicini i farmaciji. Cilj ovog rada bio je ispitivanje sposobnosti zeolita da adsorbuje vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> u kiselom i neutralnom rastvoru, kao i karakteristike tog procesa (saturabilnost, reverzibilnost i konkurentnost).

**Metode.** Za određivanje vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> korišćena je HPLC metoda, uz primenu fluorescentnog detektora. Separacija analita izvedena je primenom reverznofazne metode na koloni C18. U *in vitro* uslovima vršeno je ispitivanje uticaja pH (2 i 7), koncentracije rastvora vitamina (1, 2 i 5 mg/L), dužine kontakta sa zeolitom (0–180 min) i konkurentnosti katjona na kapacitet izmene koji se postiže u kontaktu medijuma i zeolita, kao i moguća desorpcija vitamina promenom pH vrednosti rastvora pri temperaturi od 37 °C. Uticaj konkurentnosti jona na stepen adsorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit ispitivana je dodavanjem standardne hrane za tov pilića sa definisanim sadržajem ispitivanih vitamina u rastvor zeolita pH = 2 i pH = 7.

**Rezultati.** Vitamini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> bili su stabilni u rastvoru pH = 2 i 7 na 37 °C, u vremenskom intervalu praćenja do 180 min. U kiselom rastvoru vitamina, dodatkom 1% zeo-

lita, koncentracija vitamina značajno je opadala prvih 10 min, a nakon 30 minuta neznatno za sve tri posmatrane koncentracije. U neutralnom rastvoru, dodatkom 1% zeolita, sniženje koncentracije vitamina bilo je nešto manje nego u kiselom rastvoru, ali, takođe, značajno prvih 10 min. Ustanovljeno je da zeolit koji je adsorbovao vitamine u kiselom rastvoru prenet u neutralan rastvor, nakon 30 min ekstrakcije na 37 °C, otpušta značajnu količinu adsorbovanih vitamina. Vitamini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> iz hrane u rastvoru pH = 2 na 37 °C, posle 30 minuta kontakta, značajno su adsorbovali na zeolit (21,87%, 20,15% i 4,53%, redom), dok je u neutralnom rastvoru izostala njihova statistički značajna adsorpcija. **Zaključak.** Postoji značajna adsorpcija vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit u kiselom i neutralnom rastvoru na 37 °C već posle 10 min kontakta. Adsorpcija je ireverzibilna u pojedinačnim rastvorima, a reverzibilna nakon promene pH rastvora iz kiselog u neutralan. U neutralnom rastvoru postoji značajna konkurentnost jona za adsorpciju vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit, pa ne dolazi do njihove statistički značajne adsorpcije, za raličku od kiselog rastvora u kome je konkurentnost manja i zeolit značajno adsorbuje ove vitamine, premda u znatno manjem stepenu od onog, u uslovima odsustva konkurentnih jona.

#### Ključne reči:

zeoliti; adsorpcija; vitamin B<sub>1</sub>; vitamin B<sub>2</sub>; vitamin B<sub>6</sub>; hromatografija, tečna, pod visokim pritiskom.

#### Abstract

**Background/Aim.** Zeolites are the hydrated aluminosilicates of alkali and earthalkali cations, which have a long three-dimensional crystal structure. Preparations on the basis of zeolites are used for adsorption of organic and nonorganic toxic substances and they, also, find more and more use in veterinary and human medicine and pharmacy. The aim of this study was to evaluate the possibilities of zeolite to adsorb vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in acid and neutral solutions, as well as the characteristics of the process (saturability, reversibility and competitiveness). **Methods.** The specific and sensitive HPLC method with fluorescent detector was used for determination of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub>. Analyte separation and detection were carried out by applying the

reverse-phase method on column C18. An *in vitro* experiment was done by testing the influence of pH value (2 and 7), concentration of vitamin solution (1, 2 and 5 mg/L), the length of contact with zeolite (10–180 min) and cation competitiveness on the exchange capacity, which is achieved by media and zeolite contact, as well as a possible vitamins desorption through changing pH value of the solution at 37 °C. Ion competitiveness was examined by adding commercial feed mixture (grower) with a defined content of the examined vitamins in zeolite solutions the pH = 2 and pH = 7. **Results.** Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> were stable in both pH=2 and pH = 7 solutions at 37 °C, in the defined time intervals. In acid solution concentrations of vitamins significantly declined in the first 10 min, with no significant decline in further 30 min for all the three concentrations

testch. In neutral solution, after the addition of 1% zeolite, decrease in vitamins concentrations was slightly lower than in acid solution, but also significant in the first 10 min of the contact with zeolite. It was found that zeolite, which adsorbed vitamins in acid solution, transferred in the neutral one released a significant quantity of adsorbed vitamins after 30 min of extraction on 37 °C. Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> from a commercial feed mixture in pH = 2 solution, at 37 °C, were significantly adsorbed on zeolite after 30 min of the contact (21.87%, 20.15% and 4.53%, respectively), while in neutral solution there was no statistically significant adsorption. **Conclusion.** Zeolite significantly adsorbs vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in acid and neutral solutions at 37 °C, al-

ready in the first 10 min of the contact. Adsorption was irreversible, but partly reversible after changing pH from acid to neutral. This is a significant ions competition for adsorption on zeolite in neutral solution, so no statistically significant vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> adsorption occurs, while in acid solution competition is less, thus zeolite significantly adsorbs these vitamins, although in less degree than in conditions with no concurrent ions.

**Key words:**  
zeolites; adsorption; thiamine; riboflavin; vitamin B<sub>6</sub>; chromatography, high pressure liquid.

## Uvod

Zeoliti su kristalni, hidratirani alumosilikati alkalnih i zemnoalkalnih katjona koji poseduju beskonačnu trodimenzionalnu kristalnu strukturu. Karakterišu se sposobnošću da gube i primaju vodu i izmenjuju neke od svojih konstitucionih katjona jonima iz rastvora elektrolita, bez većih promena strukture<sup>1</sup>. Kapacitet katjonske izmene prirodnih zeolita je funkcija stepena supstitucije silicijuma aluminijumom u tetraedarskoj mreži, a zavisen je i od dimenzije kanala, oblika i veličine jona, gustine naelektrisanja i valence jona sastava elektrolita. Kristalni zeoliti su pogodni adsorberi i karakterišu se slobodnom zapreminom od 20 do 50% i velikom specifičnom površinom. Velike šupljine i ulazni kanali zeolitskog minerala popunjeni su molekulima vode koji grade hidratacione sfere oko izmenjivih katjona. Reakcije jonske izmene su povratne, slede zakon o dejstvu masa i, kinetički posmatrano, ove reakcije su difuzioni procesi. U praktičnim uslovima, na kapacitet izmene, koji se postiže u kontaktu medija i zeolita, mogu uticati brojni parametri kao što su: pH vrednost, temperatura, konkurentnost katjona, izbor rastvarača, vrste prisutnih katjona i koncentracija rastvora<sup>2-4</sup>. Osim prirodnih, postoje i sintetski zeoliti sa poboljšanim adsorptivnim svojstvima<sup>5</sup>.

Modifikovani mineralni adsorbenti nalaze sve širu primenu u veterinarskoj i humanoj medicini i farmaciji<sup>6-9</sup>. U veterini zeoliti se često koriste kao dodatak ishrani životinja prilikom tova u cilju adsorpcije toksičnih materija organskog i neorganskog porekla. Međutim, zbog mogućnosti da zeoliti adsorbuju i nutritivne sastojke hrane, poslednjih godina vrše se ispitivanja sposobnosti zeolita da vežu na sebe različite supstance neophodne za rast i razvoj organizma. Tako npr, vršena su ispitivanja uticaja zeolita na sadržaj vitamina A i E u krvi goveda i ovaca nakon primene hrane bez i sa zeolita i nije nađena statistički značajna razlika u sadržaju pomenutih vitamina s obzirom na prisustvo, odnosno odsustvo zeolita<sup>10</sup>. Kada su u pitanju hidrosolubilni vitamini, vršena su ispitivanja adsorptivnog efekta zeolita na vitamin B<sub>6</sub> u *in vitro* uslovima i ustanovljeno je da između različitih vrsta zeolita postoji značajna razlika u adsorpciji ovog vitamina<sup>11</sup>.

Vitamini se nalaze u namirnicama u različitim količinama, ali je njihov fiziološki efekat uvek veoma značajan. Za vitamine grupe B karakteristično je da, iako su različite he-

mijske strukture, imaju nekoliko sličnih osobina: funkcionišu kao koenzimi u različitim enzimskim sistemima, sadržani su u istim namirnicama i, s obzirom na to da su rastvorljivi u vodi, ne zadržavaju se duže u organizmu. Sadržaj vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> kreće se u rasponu od nekoliko mikrograma do nekoliko miligrama u 100 g namirnice. U cilju optimalnog unosa vitamina postoji nekoliko naučno zasnovanih stavova i preporuka o prosečnim potrebama za pojedinim vitaminima. Američka Nacionalna akademija nauka izdala je tabele koje sadrže preporučene dnevne unose za pojedine vitamine i mineralne materije (*Recommended Dietary Allowances* – RDA). Ove vrednosti koriste se kao osnova za procenu potreba za vitaminima i mineralima<sup>12</sup>.

Vitamin B<sub>2</sub> i vitamin B<sub>6</sub> poseduju osobinu prirodne fluorescencije, a vitamin B<sub>1</sub> može se pogodnim agensom derivatizovati do tioroma, jedinjenja koje fluorescira. Zbog toga je fluorimetrija oficijalna detekciona metoda za ovu grupu vitamina. Međutim, kombinacijom separacione instrumentalne tehnike za razdvajanje (tečna hromatografija) sa fluorescentnim detektorom, kao detekcionim sistemom, postižu se optimalni uslovi za pouzdanu kvantifikaciju, dobru osetljivost i selektivnost<sup>13-18</sup>.

Cilj ovog rada bio je da se ispita mogućnost adsorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit u rastvoru pH = 2 i pH = 7, na temperaturi 37 °C, kao i karakteristike tog procesa (saturabilnost, reverzibilnost i konkurentnost).

## Metode

U eksperimentu korišćen je zeolit sa preko 90% zeolitskog minerala klinoptilolita (Minazel plus, Patentkomerc, Beograd). Kao izvor konkurentnih jona korišćena je komercijalna hrana za ishranu brojlera (Grover 19%, Beograd), sa tačno određenim sadržajem vitamina.

Za analizu vitamina upotrebljen je analitički standard vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> (Sigma Co, St Louis, MO, USA), metanol HPLC čistoće (Merck, Nemačka), voda HPLC čistoće (demineralizovana voda prečišćena na komercijalnom Millipore Milli Q sistemu), dok su ostale korišćene supstance bile čistoće *pro analysis* (p.a.).

Za određivanje vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> korišćen je HPLC sistem sa fluorescentnim detektorom, sledećih karakteristika: pumpa – Waters M600 E, izokratsko eluiranje; injektor –

Rheodyne 7125, petlja 20  $\mu\text{L}$ ; analitička kolona – Nucleosil 50-5 C18; detektor – RF-535 Shimadzu, Fluorescence HPLC monitor; mobilna faza – za B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> 450 mL CH<sub>3</sub>OH + 620 mL 5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, za B<sub>6</sub> 250 mL CH<sub>3</sub>OH + 770 mL 5 mM heksansulfonska kiselina; protok – 0,8 mL/min; temperatura kolone ~20 °C; talasne dužine – za B<sub>1</sub>:  $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$ ; za B<sub>2</sub>:  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ ; za B<sub>6</sub>:  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 392 \text{ nm}$ ; aktivacija/obrada podataka – Shimadzu C-R4A CHROMATOPAC.

Određivanje sadržaja vitamina B vršeno je metodom standardne krive. Za analizu pripremani su rastvori vitamina za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije (niz rastvora od 0,01 do 0,05  $\mu\text{g/mL}$ ), kao i rastvori za kalibracionu krivu (0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 1,00 i 5,00  $\mu\text{g/mL}$ ).

Vrednost površine pika za svaku koncentraciju predstavljala je srednja vrednost četiri uzastopna merenja. Preciznost HPLC metode za određivanje vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> ispitana je za koncentraciju 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , nakon šest injiciranja. Za određivanje prinosa obe metode izvedeno je deset nezavisnih analiza rastvora standarda vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> za koncentraciju 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Za određivanje sadržaja vitamina B<sub>1</sub> bilo je potrebno izvršiti oksidaciju tiamina do tiohroma alkalnim rastvorom kalijumfericijanida.

Za eksperimentalni model uzeti su elektroliti slični sokovima digestivnog trakta – rastvor natrijumhlorida i hlorovodonične kiseline. Da bi se ispitao uticaj pH sredine na adsorpcione karakteristike zeolita, ispitivanja su vršena pri pH = 2 i pH = 7. Vršeno je određivanje sadržaja vitamina koncentracija 1, 2 i 5  $\mu\text{g/mL}$  u vremenskim intervalima od 10, 30, 60 i 180 minuta u rastvorima elektrolita bez i sa dodatkom 1% zeolita, na 37 °C.

Za ispitivanje uticaja drugih jona na adsorpcione karakteristike zeolita prema vitaminima grupe B pripremljena je 10% suspenzija smeše za ishranu brojlera i 1% zeolita u kiselom i neutralnom rastvoru elektrolita. Određivanje sadržaja vitamina vršeno je nakon 30 minuta ekstrakcije iz smeše ek-

strakcionim rastvorima pH = 2 i pH = 7, kao i nakon istog vremena kontakta sa zeolitom. Centrifugiranjem i prenošenjem zeolita nakon adsorpcije vitamina iz rastvora pH = 2 u rastvor pH = 7 vršeno je određivanje sadržaja desorbovanih vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> u neutralnom rastvoru.

## Rezultati

Određene su granica detekcije i granica kvantifikacije primenjene analitičke metode za adsorpcija vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>: 0,03  $\mu\text{g/mL}$ , odnosno 0,05  $\mu\text{g/mL}$ . Linearnost odnosa koncentracija i površina odgovarajućih pikova određena je analizom šest standardnih rastvora vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> koncentracija od 0,05  $\mu\text{g/mL}$  do 5,0  $\mu\text{g/mL}$ . Izrađene su standardne krive za vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>, i izračunate jednačine pravih (tabela 1).

Prinos je ispitivan primenom metode na standardni rastvor koncentracije 0,5  $\mu\text{g/mL}$  pri čemu su dobijene vrednosti od: 99,1%, 99,2% i 99,5% za vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>, redom, za kiselu ekstrakciju, i 98,9%, 97,77% i 99,4% i redom, za neutralnu ekstrakciju, nakon 180 minuta.

Određivanje sadržaja vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> vršeno je u model rastvorima koncentracije 1, 2 i 5 mg/L pri pH = 2 i pH = 7, na 37 °C, posle 0, 10, 30, 60 i 180 min kontakta sa zeolitom. U prisustvu zeolita došlo je do značajnog smanjenja koncentracije ispitivanih vitamina iz oba model rastvora u prvih 10 min, bez značajnijeg dodatnog sniženja u toku naredna tri sata. Ovo smanjenje nije zavisilo od početne koncentracije vitamina u rastvoru. Ustanovljeno je da je stepen adsorpcije ispitivanih vitamina na zeolit statistički značajniji u kiselom nego u neutralnom medijumu, pri čemu najveći stepen vezivanja na zeolit poseduje vitamin B<sub>1</sub>, a najmanji vitamin B<sub>6</sub>. Procenti adsorbovanih vitamina na zeolit za sve intervale kontakta i sve koncentracije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> dati su u tabeli 2.

**Tabela 1**  
Karakteristike kalibracionih krivih vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>

Vitamin	$y = a + bx$	R
B <sub>1</sub>	$y = 1035 + 408526x$	0,99992
B <sub>2</sub>	$y = 1023 + 129525x$	0,99994
B <sub>6</sub>	$y = -369 + 359105x$	0,99989

**Tabela 2**

Stepen adsorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit u zavisnosti od koncentracije, pH medijuma i vremena kontakta

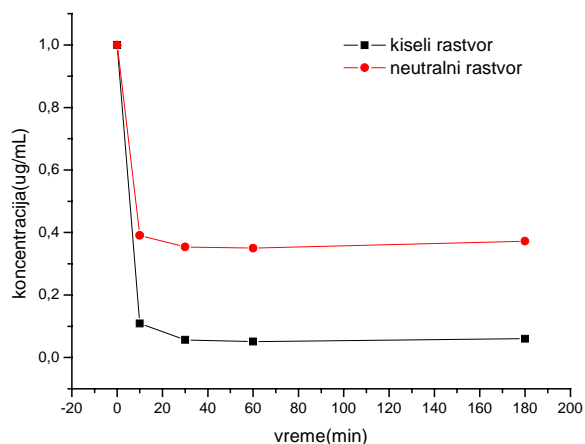
Vreme kontakta sa zeolitom (min)	pH rastvora	Stepen adsorpcije na zeolit u zavisnosti od koncentracije (%)								
		vitamin B <sub>1</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			vitamin B <sub>2</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			vitamin B <sub>6</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		1	2	5	1 <sup>¶</sup>	2 <sup>¶</sup>	5 <sup>¶</sup>	1 <sup>§§</sup>	2 <sup>§§</sup>	5 <sup>§§</sup>
10	2	89,1	88,7	85,2	47,9	47,1	45,8	28,8	28,1	25,9
	7*	60,9	60,2	58,6	30,9	32,5	30,2	18,3	18,1	16,2
30	2	94,3	93,7	89,9	55,4	55,1	53,5	39,2	40,4	37,3
	7*	64,6	63,9	62,2	32,1	33,8	31,4	21,4	21,9	19,5
60	2	94,9	93,9	90,1	55,9	54,9	53,3	41,2	40,2	37,1
	7*	65,0	64,3	62,6	30,7	31,3	31,1	20,1	19,9	17,8
180	2	94,0	93,1	89,3	57,7	56,7	55,1	42,4	41,4	38,5
	7*	62,8	62,1	60,5	34,4	34,2	33,6	22,4	21,8	20,8

\* $p < 0,05$  u odnosu na pH = 2 za sva tri vitamina u odgovarajućem vremenskom intervalu

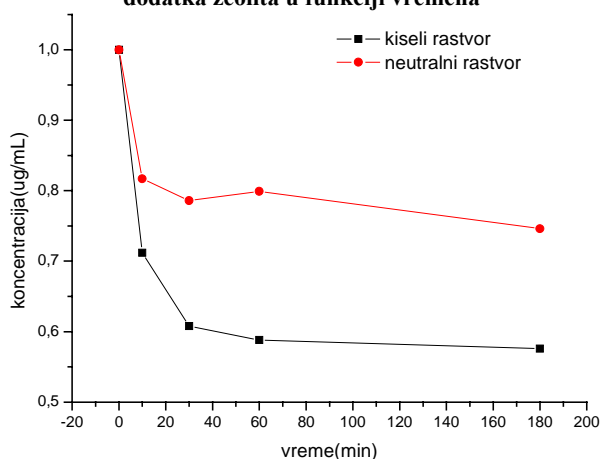
<sup>¶</sup> $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuće koncentracije vitamina B<sub>1</sub>

<sup>§§</sup> $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuće koncentracije vitamina B<sub>2</sub>

Na slikama 1–3 prikazano je smanjenje koncentracije pojedinih vitamina (samo za najnižu koncentraciju, 1 mg/L) u kiselom i neutralnom rastvoru u funkciji vremena posle dodatka zeolita.

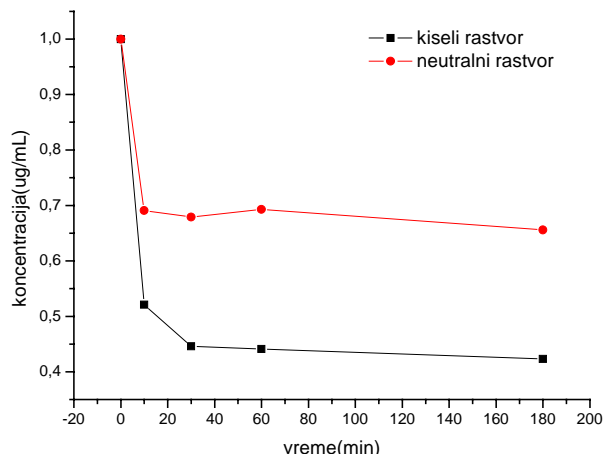


**Sl. 1 – Smanjenje koncentracije vitamina B<sub>1</sub> (1 µg/mL) u kiselom (pH = 2) i neutralnom (pH = 7) rastvoru posle dodatka zeolita u funkciji vremena**



**Sl. 2 – Smanjenje koncentracije vitamina B<sub>2</sub> (1 µg/mL) u kiselom (pH=2) i neutralnom (pH=7) rastvoru posle dodatka zeolita u funkciji vremena**

Nakon adsorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> koncentracije 1 mg/L na zeolit u rastvoru pH = 2, zeolit je prenet u rastvor pH = 7 u kome je vršena desorpcija vezanih vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> u toku 30 min na 37 °C, posle čega je određen njihov sadržaj.



**Sl. 3 – Smanjenje koncentracije vitamina B<sub>6</sub> (1 µg/mL) u kiselom (pH=2) i neutralnom (pH=7) rastvoru posle dodatka zeolita u funkciji vremena**

Rezultati desorpcije prikazani u tabeli 3 pokazuju da prelaskom iz kiselog u neutralan medijum dolazi do značajne desorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> sa zeolita.

Određen je sadržaj vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> nakon 30 minuta od suspendovanja smeše za ishranu brojlera u rastvor pH = 2, na 37 °C (1,07 mg/L, 2,65 mg/L i 1,05 mg/L, redom), kao i suspendovanjem smeše u rastvor pH = 7, na 37 °C (1,02 mg/L, 2,47 mg/L i 1,08 mg/L redom). U istom eksperimentu, ali u prisustvu zeolita (1%), došlo je do značajne adsorpcije svih ispitivanih vitamina ekstrahovanih iz hrane za brojlere u kiselom rastvoru (21,87%, 20,15% i 4,53%, redom), dok u neutralnom rastvoru nema značajne adsorpcije (1,9%, 2,2% i 1,8%, redom) (tabela 4). Nakon adsorpcije vitamina iz hrane na zeolit u kiselom sredini i njegovim naknadnim prenošenjem u rastvor pH = 7, posle 30 minuta ekstrakcije na 37 °C, dolazi do značajnog otpuštanja vitamina sa zeolita u rastvor (tabela 4).

**Tabela 3**

**Desorpcija vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> sa zeolita u neutralni rastvor nakon njihove adsorpcije na zeolit u kiselom rastvoru**

Vitamin* (1 µg/mL)	Adsorpcija posle 30 min. na zeolit (%)	Desorbovano posle 30 min. sa zeolita (%)
	pH = 2	pH = 7
B <sub>1</sub>	94,7	28,9
B <sub>2</sub>	54,1	20,8
B <sub>6</sub>	38,2	19,1

\*Vitamini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> u pojedinačnim koncentracijama od 1 µg/mL istovremeno prisutni u rastvoru pH = 2

**Tabela 4**

**Adsorpcija vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> iz hrane na zeolit i desorpcija sa zeolita posle 30 minuta kontakta**

Vitamin	Sadržaj u rastvoru (µg/mL)		Sadržaj u rastvoru sa zeolitom (µg/mL)		Adsorpcija vitamina iz hrane na zeolit (%)		Desorbovano* sa zeolita (%)
	pH = 2	pH = 7	pH = 2	pH = 7	pH = 2	pH = 7	pH = 7
B <sub>1</sub>	1,07	1,02	0,83	1,00	21,8	1,9	19,7
B <sub>2</sub>	2,65	2,47	2,12	2,41	20,15	2,2	17,8
B <sub>6</sub>	1,05	1,08	0,99	1,06	4,53	1,8	2,1

\*desorpcija vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> sa zeolita u neutralni rastvor, nakon adsorpcije iz hrane u kiselom rastvoru, preračunato na početnu koncentraciju vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>

## Diskusija

Kristalni zeoliti su adsorberi, pa ih karakteriše velika slobodna zapremina kanala u kojima mogu da grade hidratacione sfere oko izmenjivih katjona. Vitamini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> su podložni hidrolitičkom oksidativnom i reduktivnom dejstvu, pa postoji mogućnost da zeoliti adsorbuju i ove mikroelemente hrane<sup>20</sup>. U ovom radu vršena su ispitivanja kapaciteta i kinetike adsorpcije ovih vitamina na zeolit (90% klinoptilolita) i zavisnost ovih reakcija od pH sredine za koncentracije vitamina 1, 2 i 5 mg/L, što je u skladu sa njihovom supstitucijom u ishrani životinja komercijalnim proizvodima.

U prisustvu zeolita, u kiselom rastvoru došlo je do smanjenja koncentracija vitamina (preko 80% za vitamin B<sub>1</sub>, preko 45% za vitamin B<sub>2</sub> i preko 25% za vitamin B<sub>6</sub>) već u prvih 10 min, za sve tri ispitivane koncentracije, što znači da kapacitet njihove adsorpcije na zeolit nadmašuje moguću supstituciju vitamina. Posle 30 min od dodavanja zeolita koncentracija vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> ne menja se značajnije u toku narednih 180 min što ukazuje na saturabilnost i ireverzibilnost procesa adsorpcije u tom periodu. U literaturi je pokazano da je *in vitro* adsorpcija vitamina B<sub>6</sub> na mineralnim adsorbentima na bazi zeolita i bentonita u kiselom rastvoru, nakon dva sata kontakta, značajna i da iznosi od 5 do 98%<sup>11</sup>.

U neutralnom rastvoru adsorpcija vitamina se odvijala po istom principu, ali u značajno manjem stepenu, što se objašnjava manjom oksidativnoreduktivnom sposobnosti vitamina u tim uslovima<sup>19</sup>. Statističkom obradom podataka ustanovljeno je da nema značajnih razlika u procentu adsorpcije, zavisno od različitih koncentracije vitamina, u određenim vremenskim intervalima u istim rastvorima elektrolita. Međutim, postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između adsorbovane količine istog vitamina, za isto vreme kontakta sa zeolitom, u zavisnosti od pH rastvora. Adsorpcija je značajno veća u kiselom rastvoru (pH = 2) u odnosu na neutralni rastvor (pH = 7).

Nije nađena statistički značajna razlika u adsorpciji vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit kada su analizirani pojedinačno ili kao smeša vitamina, što ukazuje na nepostojanje konkurentnosti među njima u odnosu na zeolit, kada su prisutni u realnim koncentracijama.

Rezultati ispitivanja desorpcije vitamina u uslovima promene pH rastvora pokazuju da nakon adsorpcije u kiselom rastvoru postoji značajno otpuštanje adsorbovanih vitamina sa zeolita u rastvor pH = 7 i da je taj procenat u skladu sa razlikom u adsorpciji vitamina na zeolit u kiselom i neut-

ralnom rastvoru. Kako resorpcija vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> u organizmu počinje nakon napuštanja kisele sredine želudačnog soka<sup>20</sup>, to je ova desorpcija analiziranih vitamina u neutralnom rastvoru od značaja za njihovu bioiskoristljivost.

Kako se zeolit veoma često koristi kao dodatak hrani životinja u tovu u cilju adsorpcije toksičnih materija, ispitali smo uticaj konkurentnih jona iz hrane na adsorpciju vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>. U do sada objavljenim radovima pokazano je zaštitno dejstvo zeolita, odnosno njegova adsorpciona sposobnost prema različitim toksinima, kao i uticaj na resorpciju liposolubilnih vitamina<sup>6-10</sup>. U našem eksperimentu vršeno je suspendovanje hrane za brojlere u rastvore pH = 2 i pH = 7 (slične digestivnim sokovima živine)<sup>21, 22</sup>. Poređenjem koncentracije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> u kiselom rastvoru nakon 30 min ekstrakcije iz hrane za brojlere i nakon istog vremena kontakta sa zeolitom, nađeno je značajno smanjenje koncentracije vitamina u ovom model-rastvoru. Ono je, međutim, bilo značajno manje nego u prethodnom ispitivanju, kada nisu bili prisutni konkurentni joni. U neutralnom rastvoru nije došlo do značajne promene koncentracije ispitivanih vitamina nakon 30 minuta ekstrakcije iz hrane u prisustvu zeolita, pa se može zaključiti da u neutralnom rastvoru konkurentni joni iz hrane imaju veći afinitet razmene sa konstitucionim jonima zeolita, nego vitamini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>. Ekstrahovanjem zeolita nakon adsorpcije vitamina iz kiselog rastvora hrane neutralnim rastvorom, tokom 30 minuta na 37 °C, došlo je do značajnog otpuštanja vitamina. Ovi rezultati sugerišu da u *in vivo* uslovima, ukoliko se u hranu za piliće doda zeolit, možemo očekivati da će zeolit nakon prelaska iz kisele u neutralnu sredinu digestivnog trakta otpustiti značajnu količinu vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>, te da neće uticati na bioiskoristljivost ovih vitamina. Ovu pretpostavku trebalo bi potvrditi *in vivo* ispitivanjima.

## Zaključak

Vitamini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> u kiselom i neutralnom rastvoru značajno adsorbuju na zeolit već nakon 10 minuta kontakta, bez značajnih promena u adsorpciji u naredna tri sata što ukazuje na saturabilnost i ireverzibilnost procesa adsorpcije. Prelaskom iz kiselog u neutralni medijum dolazi do značajne desorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> adsorbovanih na zeolit u kiselom medijumu. U prisustvu drugih komponenti iz hrane smanjuje se stepen adsorpcije ovih vitamina na zeolit u kiselom medijumu, dok u neutralnom u potpunosti izostaje, što ukazuje na značajnu ulogu konkurentnih jona u procesu adsorpcije vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> na zeolit.

## L I T E R A T U R A

1. *Dumić M, Vukićević O.* Mikozel (Minazel) adsorberent and inactivator of mycotoxins. Beograd: Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina; 1992. p. 1–21. (Serbian)
2. *Kurtoglu AE, Atun G.* Determination of kinetics and equilibrium of Pb/Na exchange on clinoptilolite. Sep Purif Technol 2006; 50(1): 62–70.
3. *Untea I, Tudorache E, Brasoveanu D, Lazaroiu C.* Oxidative degradation of phenol in the waste water by Fenton processes. Rev Chim 2000; 51(5): 396–402.
4. *Syamsiah S, Hadi IS.* Adsorption cycles and effect of microbial population on phenol removal using natural zeolit. Sep Purif Technol 2004; 34(1–3): 125–33.
5. *Mohamed MM, Zidan FI, Fodail MH.* Synthesis of ZSM-5 zeolite of improved bulk and surface properties via mixed templates. J Mater Sci 2007; 42(11): 4066–75.
6. *Papaioannou DS, Kyriakis SC, Papasteriadis A, Roumbies N, Yannakopoulos A, Lexopoulos C.* Effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on certain vitamin, macro and

- trace element concentrations in the blood, liver and kidney tissues of sows. *Res Vet Sci* 2002; 72(1): 61–8.
7. *Thilising-Hansen T, Jorgensen RJ, Enemark JM, Larsen T*. The effect of zeolite A supplementation in the dry period on periparturient calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis. *J Dairy Sci* 2002; 85(7): 1855–62.
  8. *Cabuk M, Alicek A, Bozkurt M, Akkan S*. Effect of yucca schidigera and natural zeolite on broiler performance. *Int J Poultry Sci* 2004; 3: 651–4.
  9. *Momčilović B*. Megamin, vjera, nada i placebo - znanstveni osvrt. *Arh Hig Rada Toksikol* 1999; 50: 67–78. (Serbian)
  10. *Katsoulos PD, Panousis N, Roubies N, Christaki E, Karatzias H*. Effects on blood concentrations of certain serum fat-soluble vitamins of long-term feeding of dairy cows on a diet supplemented with clinoptilolite. *J Vet Med* 2005; 52(4): 157–61.
  11. *Tomašević-Čanović M, Daković A, Marković V, Radosavljević-Mibajlović A, Vukićević J*. Adsorption effects of mineral adsorbents. Part III. Adsorption behaviour in the presence of vitamin B6 and mikroelements Belgrade: Acta Vet 2000; 50(1): 23–9.
  12. *Recommended Dietary Allowances*. 10<sup>th</sup> ed. Food and Nutrition Board. Washington, DC: National Research Council; 1989.
  13. *AOAC*. Official Methodes of Analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists; 2004.
  14. *Ndaw S, Bergaentzle M, Aoude-Werner D, Hasselmann C*. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and viamin B6 in foodstuffs. *Food Chem* 2000; 71(1): 129–38.
  15. *Ražić S, Basić Z, Todorović M, Holclajtner Antunović I*. Trace elements and vitamins in baby biscuits – analytical aspect. Euroanalysis XI, European Conference of Analytical chemistry, 2000 September 3-9; Portugal, Lisboa: Book of Abstracts; 2000. p. 247.
  16. *Consiglieri C, Amendola F*. HPLC determination of vitamins B1, B2, B6 and PP in Parma ham. *Industrie Alimentari Italy*, 2003; 42(426): 602–4.
  17. *Vinas P, Lopez-Erroz C, Balsalobre N, Hernandez-Cordoba M*. Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *J Chromatogr* 2003; 1007(1–2): 77–84.
  18. *Basić Z*. Evaluation of acid-enzyme hydrolysis method for determination vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> total content in liver paste [Master thesis]. Belgrade: Military Medical Academy; 2004. (Serbian)
  19. *Friedrich W*. Vitamins. Berlin, New York: Walter de Gruyter; 1988.
  20. *George FM*. Vitamins in foods analysis, bioavailability, and stability. London: Taylor & Francis; 2006.
  21. *Chang M H, Chent T C*. Reduction of *Campylobacter jejuni* in a simulated chicken digestive tract by *Lactobacilli* cultures. *J Food Prot* 2000; 63(11): 1594–97.
  22. *Duke GE*. Alimentary canal: secretion and digestion, special digestive functions, and absorption. In: *Sturkie PD*, editor. *Avian Physiology*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 1986. p. 289–302.

Primljen 7. VIII 2009.  
Revidiran 25. XI 2009.  
Prihvaćen 5. XII 2009.