



VITAMIN



VITAMIN LARUT AIR

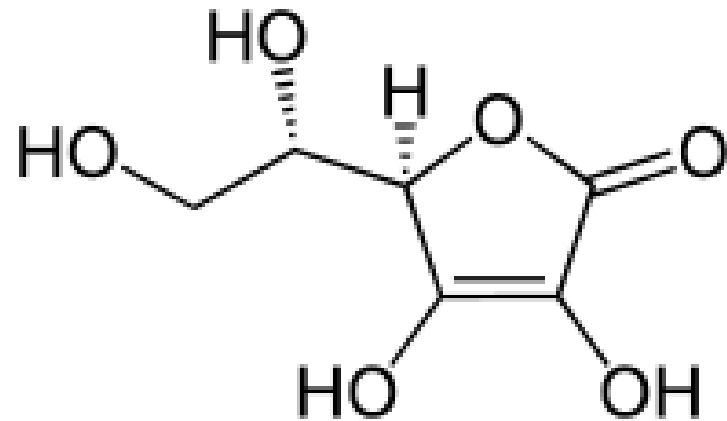
Vitamin C

Asam L-askorbat berupa padatan kristalin putih, tidak berbau, titik lebur 190-192 C, berasa sedikit masam.

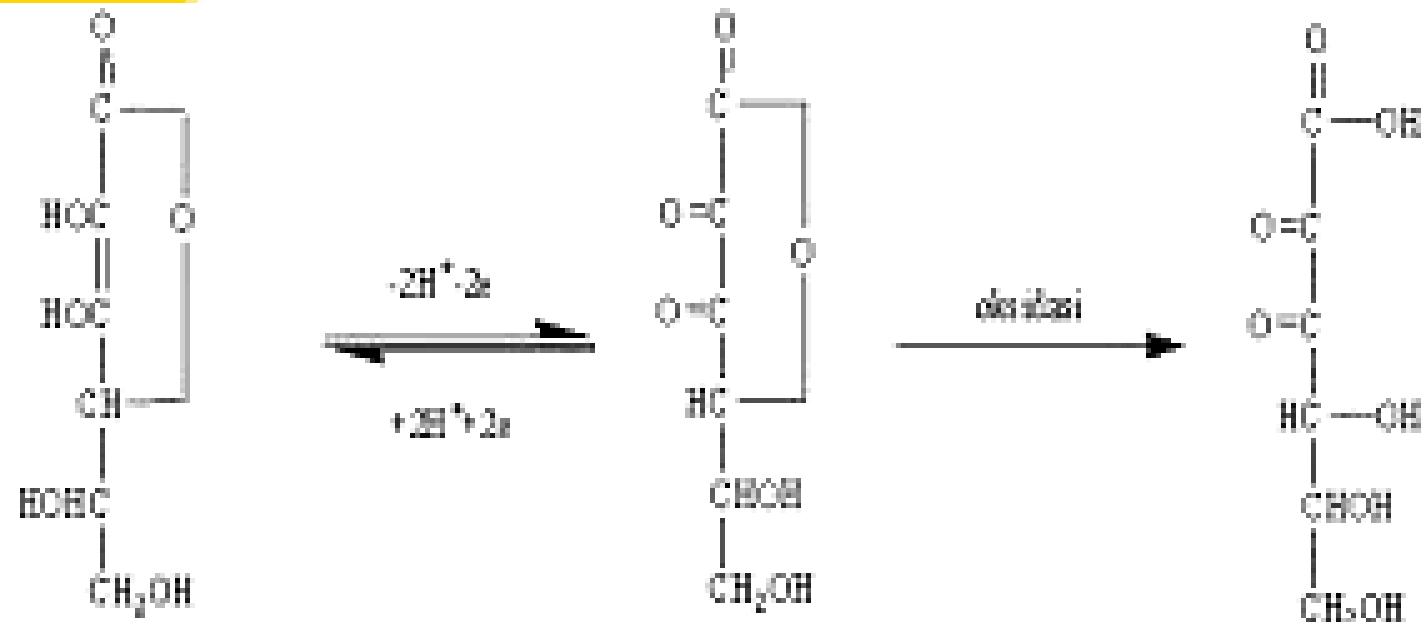
Mudah larut dalam air (=33 gr/100ml, dalam alkohol (2 gr/100ml) dan dalam methanol, tetapi tidak larut dalam pelarut organik umum.

Stabil dalam keadaan padat dan kering tetapi dalam bentuk larutan relatif mudah teroksidasi menjadi dehidroaskorbat.

Fungsi fisiologis sama, namun lebih mudah terhidrolisis.



VITAMIN C



L-ascorbic acid
(bentuk reduksi)
(aktivitas 100%)

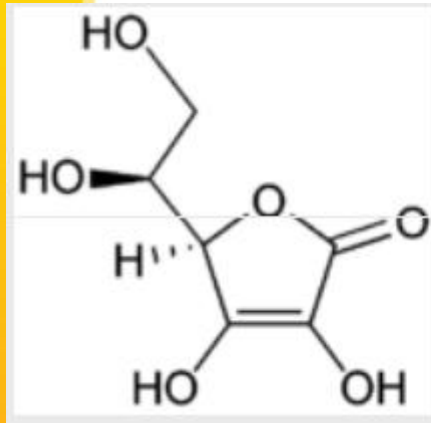
L-dehydroascorbic acid
(bentuk oksidasi)
(aktivitas 100%)

2,3-diketogulonic acid
(aktivitas 0%)

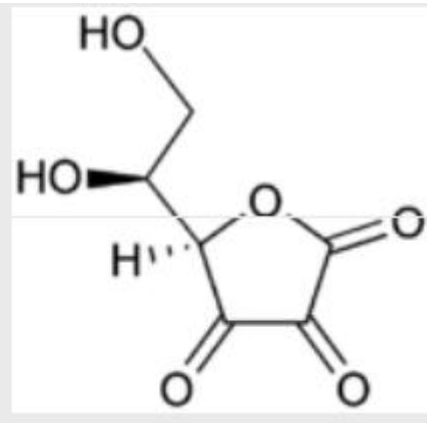
Brown pigment

VITAMIN C

Ascorbic acid



Dehydroascorbic acid



\rightleftharpoons
Reversible

One of the most labile vitamins, therefore often used as an
INDICATOR VITAMIN

Vitamin C = ascorbic acid + dehydroascorbic acid

Vitamin C

Low stability:

- Prone to light oxidation
- Enzymatic oxidation
- Metal-catalysed oxidation
 - ⇒ Enhanced by temperature increase
 - ⇒ Enhanced at alkaline pH

Care must be taken during extraction and analysis to avoid degradation of vitamin C

```
graph LR; Analisa --> TitrasiIodin[Titrasi Iodin]; Analisa --> MetodeZatPewarna[Metode Zat Pewarna]; TitrasiIodin --> Kekurangan[Kekurangan: Harus dilakukan cepat karena senyawa lain seperti glutathion dan sistein akan teroksidasi perlahan-lahan oleh I2. Iodin sehingga menimbulkan error];
```

Analisa

Titrasi Iodin

Kekurangan:

Harus dilakukan cepat karena senyawa lain seperti glutathion dan sistein akan teroksidasi perlahan-lahan oleh I₂. Iodin sehingga menimbulkan error

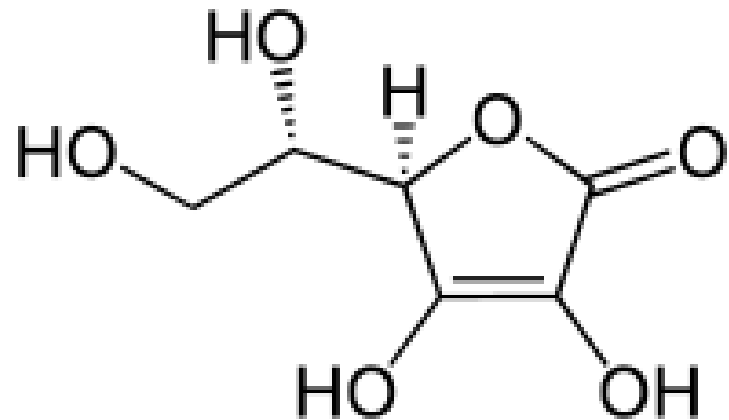
Metode Zat Pewarna

Metode Titration Iodin

PRINSIP:

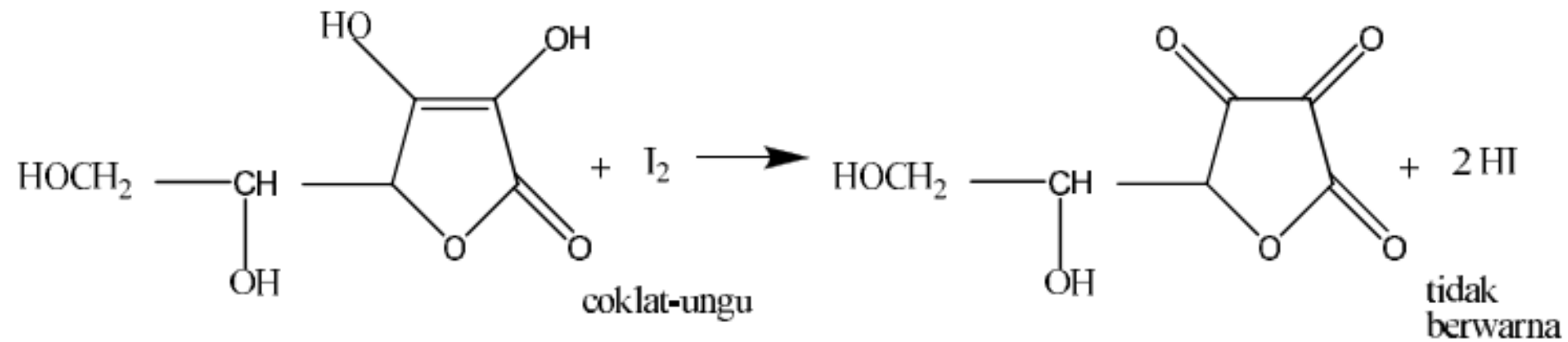
- Oksidasi analat oleh I_2 sehingga I^- tereduksi menjadi ion iodida.

- Iod + C2 dan C3



- Indikator : amilum. Akhir titrasi ditandai dengan warna biru (iod-amilum)

Asam askorbat + larutan Iodium \longrightarrow warna coklat-ungu Iod hilang



PROSEDUR

- 5ml sampel + 25 ml aquades + 2ml lar. Pati 1%
→ titrasi dgn lar. Iodin standar 0.01N
(mengandung 16 gr KI/l)
- Akhir titrasi terbentuk warna biru yang tetap.



- Titrasi harus dikerjakan cepat
- Senyawa lain spt glutathion dan sistein akan teroksidasi perlahan-lahan oleh larutan iodin
→ error

Perhitungan

- 1ml 0.01N iodin ekuivalen dengan 0.88 mg asam askorbat

Kadar Vit C = ml lart. Iodin \times 0.88 mg askorbat/ml iodin

Metode Zat Warna

Dye method 2,6-DBP

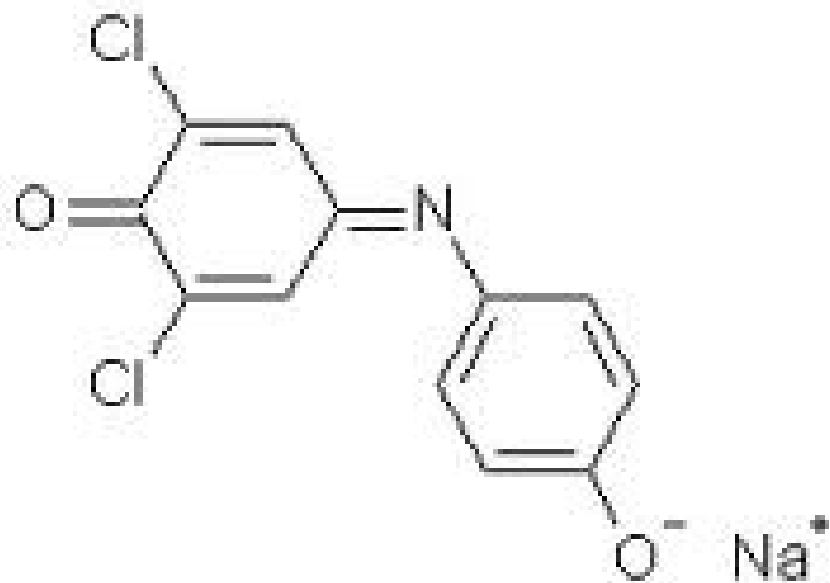
Kadar vitamin C ditetapkan berdasarkan titrasi dengan 2,6-diklorofenol indofenol dimana terjadi reaksi reduksi 2,6- diklorofenol indofenol dengan adanya vitamin C dalam larutan asam (Hashmi 1986).

Larutan 2,6-diklorofenol indofenol dalam suasana netral atau basa akan berwarna biru sedang dalam suasana asam akan berwarna merah muda.

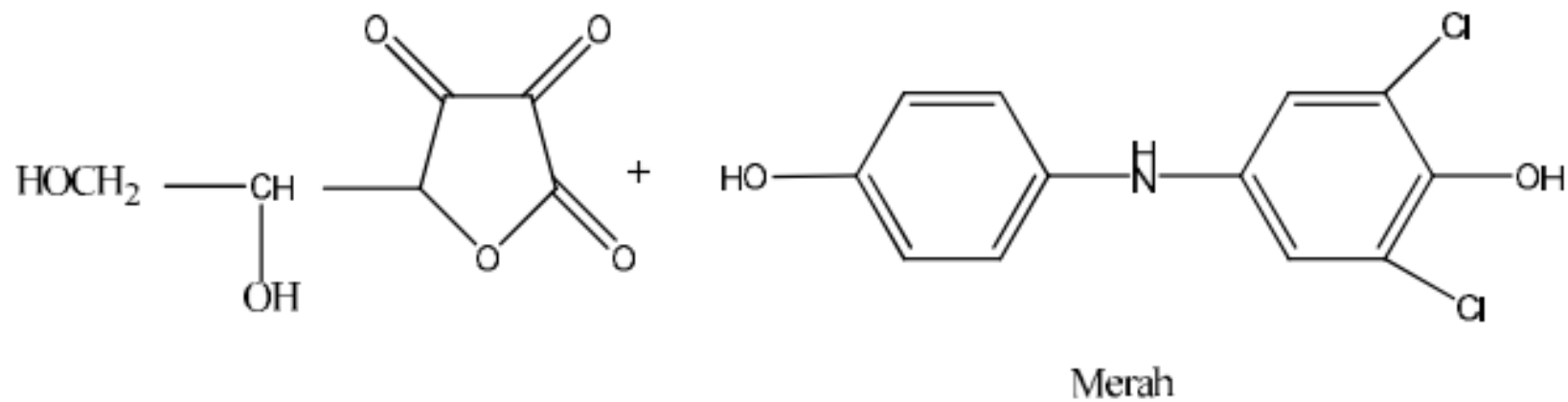
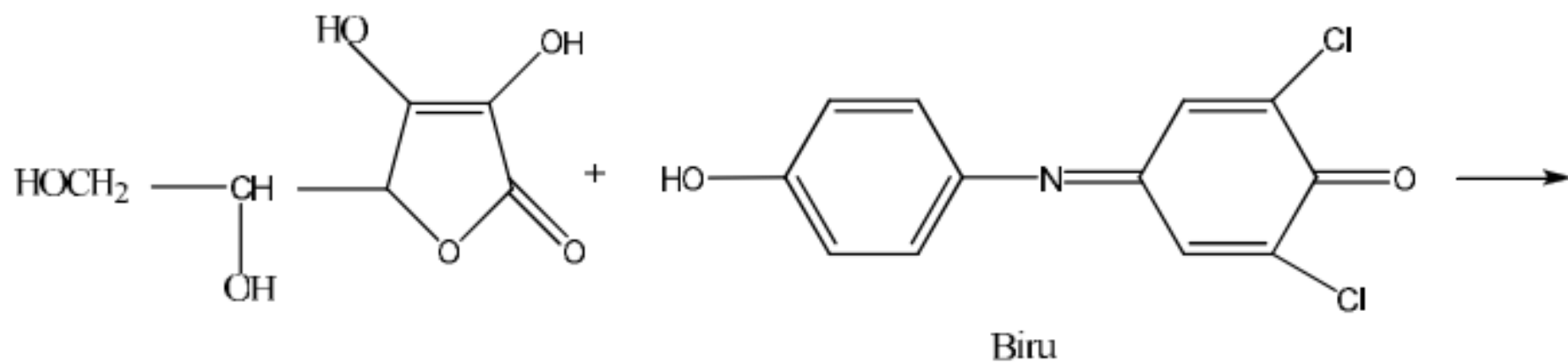
Apabila 2,6-diklorofenol indofenol direduksi oleh asam askorbat maka akan menjadi tidak berwarna, dan bila semua asam askorbat sudah mereduksi 2,6-diklorofenol indofenol maka kelebihan larutan 2,6-diklorofenol indofenol sedikit saja sudah akan terlihat dengan terjadinya pewarnaan. Untuk perhitungan maka perlu dilakukan standarisasi larutan dengan vitamin C standar (Sudarmadji 1989)

PRINSIP

- asam askorbat dioksidasi oleh diklorofenol-indofenol menjadi senyawa dehidro askorbat.
- Akhir titrasi ditandai dengan terbentuknya warna merah dari kelebihan diklorofenol-indofenol.



2,6-diklorobenzenon-indofenol



Prosedur



1. Buat larutan pewarna
2. Uji kekuatan pewarna
3. Penentuan kadar Vit. C

PROSEDUR



Pembuatan larutan dye

- Timbang 125 mg Na-2,6-DBP → larutkan dalam sedikit air hangat dan disaring
- Filtrat dijadikan 250ml dengan buffer fosfat pH 7.2

Tentukan kekuatan larutan dye ini

- Titrasi 25 ml lart. Dye dengan lart. Vit. C 0.01 N yang disiapkan dengan melarutkan 176 mg vit. C dalam aquadest sampai volume 100 ml
- **Kekuatan dye = ml vit C x kadar vit C**



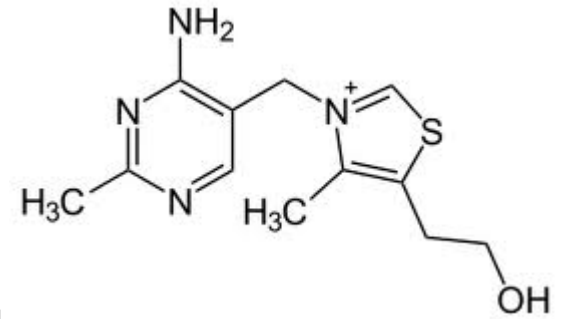
Penentuan kadar vit. C

- Dipipet 5ml lart. Dye ke dalam labu 125 ml → ditambah aquades 20 ml
- Titrasi dengan sampel yang sudah disiapkan dengan semimikroburet
- 5 ml lart.dye biasanya setara dengan 1.06 mg vit. C → faktor = $5\text{ml}/1.06\text{ mg vit C} = 4.7169$
- Kadar Vit. C sampel = faktor / ml sampel
= (mg vit C/ml sampel)

Kekurangan

- Kadar vitamin C hanya sebagian yang dianalisa
- Tidak ada perbedaan antara asam askorbat dan asam dehidroaskorbat

Vitamin B1 (Thiamin)



- Berbentuk kristal putih bersifat higroskopis
- Berbau ragi, titik leleh 246-250 C
- BM 337.26
- Mudah larut dalam air
- Membantu sel tubuh mengubah karbohidrat menjadi energi
- Berperan penting bagi organ jantung, otot dan sistem saraf agar berfungsi dengan baik

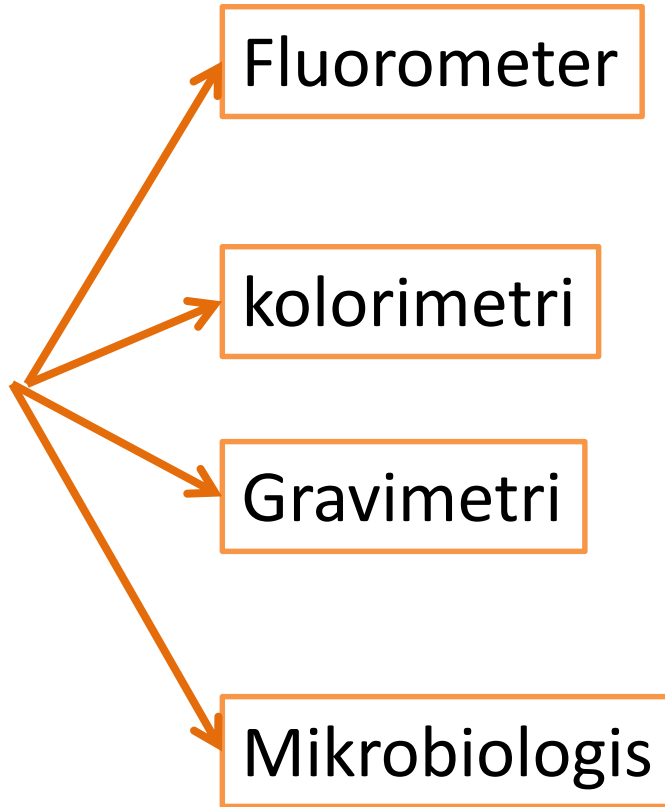
Penentuan Thiamin (Vit. B1)

Fluorometer

kolorimetri

Gravimetri

Mikrobiologis



Penentuan thiamin dengan fluorometer

PRINSIP :

- oksidasi thiamin menjadi thiokrom (turunan thiamin yang dapat berpendar dengan sinar UV)
- Bila senyawa yg dapat berfluoresen lain dapat dipisahkan, maka tingkat fluoresensi thiamin akan proporsional dng kadarnya
- **REAGENSIA** : kalium ferrisianida 1% baru

Penentuan thiamin dengan Kolorimetri

PRINSIP :

Thiamin + garam reinecke → endapan

Endapan + aseton → larut → diukur kadarnya
pada λ 525 nm

*diperlukan standar thiamin

Penentuan thiamin dengan gravimetri

PRINSIP :

Thiamin + garam reinecke → endapan → dikeringkan → ditimbang

- *hanya dapat dilakukan jika sampel mgd byk thiamin (>50 mg)
- *jika kurang, lebih baik menggunakan fluorometer atau kolorimeter

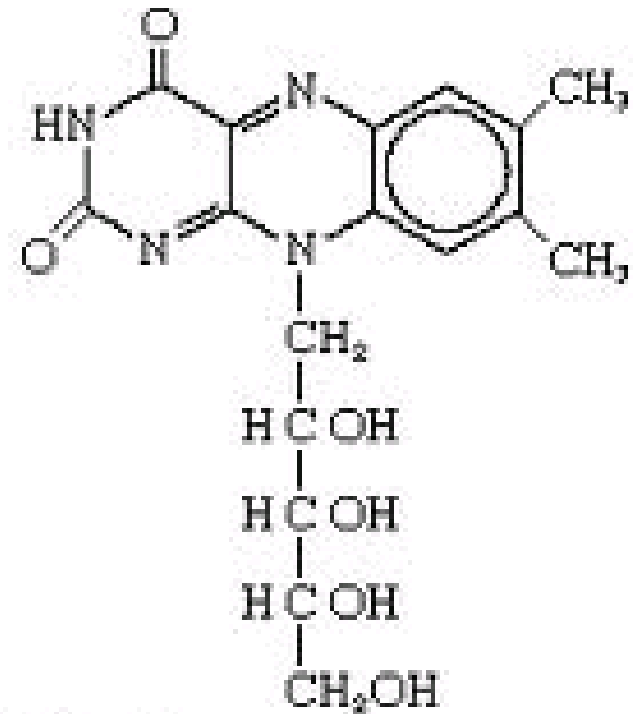
Penentuan thiamin secara mikrobiologis

PRINSIP :

- Menggunakan mikrobia yang sangat peka thd vit. B1
- Tingkat pertumbuhan sebanding dengan tingkat kekeruhan
- Diperlukan larutan thiamin standar sebagai pembanding
 - *Ochrodomonas danica* (ketelitian 1×10^{-10} gr)
 - *Lactobacillus fermenti*
 - *Kloeckera brevis*

VITAMIN B₂ (RIBOFLAVIN)

- Bentuk kristal jarum oranye-kuning
- Kurang larut dalam air (11 mg/100 ml)
- Dalam bentuk kristal bersifat stabil
- Dalam bentuk larutan, mudah rusak, terutama dalam suasana alkalis dan oleh cahaya nampak maupun sinar UV → analisa dilakukan di ruang gelap
- Riboflavin relatif stabil terhadap panas



Vitamin B₂ (riboflavin)

- STABIL thd pemanasan kering
- TIDAK STABIL thd lart alkali, sinar tampak, uv
- Larutannya dlm air berwarna kuning-kehijauan dan menunjukkan fluoresensi kuning-hijau intensif yg maximal pd pH 6.7-6.8 , dan yg akan rusak oleh asam dan basa.

[Riboflavin]_{lart. Alkali} + sinar → lumiflavin

[Riboflavin]_{lart. Asam} → lumichrome (fluoresensi biru)

[Riboflavin]_{netral} → fluoresensi kuning kehijauan

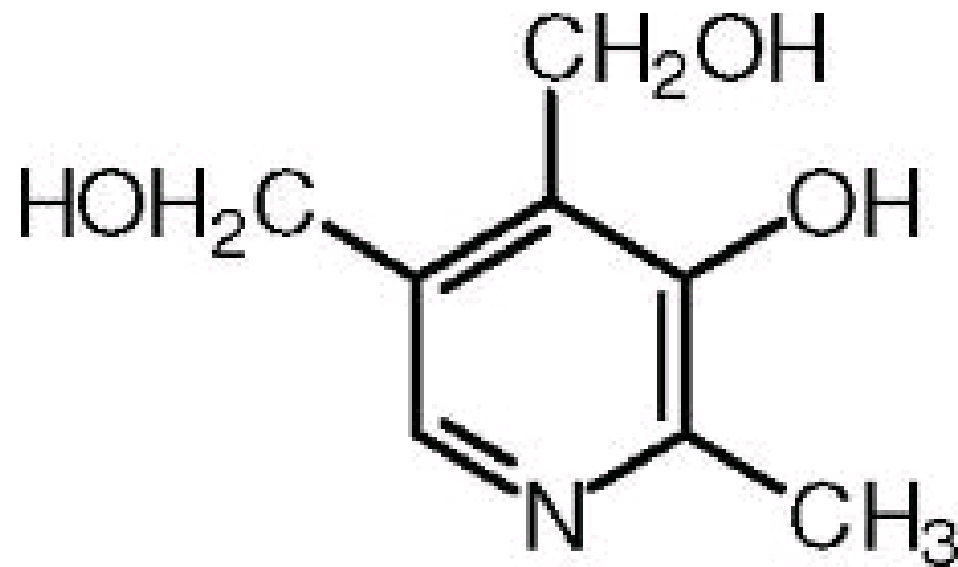
Metode spektrofluoro-metri

- Riboflavin dapat diperoleh dng penyerapan menggunakan fuller's earth dari ekstrak hati segar atau ekstrak lain yg mengandung laktoflavin dlm larutan netral atau asam kuat.
- Adsorpsi umumnya selesai dalam 10 menit.
- Selanjutnya dilakukan elusi dng lart dietilamina 10-15% atau lart NaOH 0.2% .
- Kadar vit. B2 dapat dianalisis secara fluorimetrik.

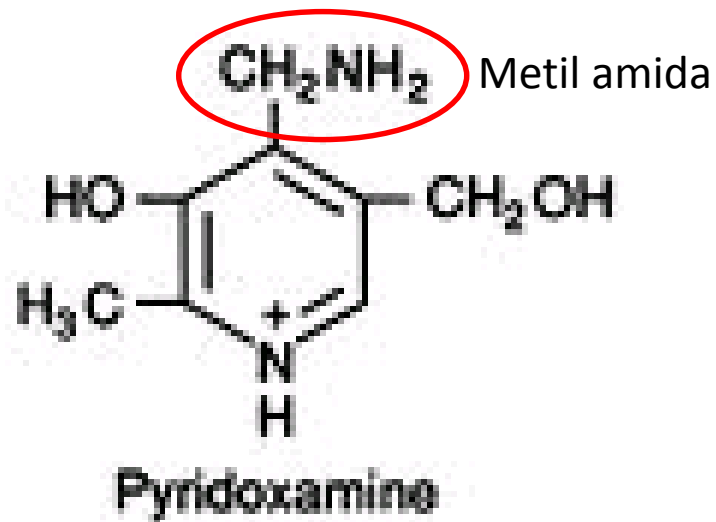
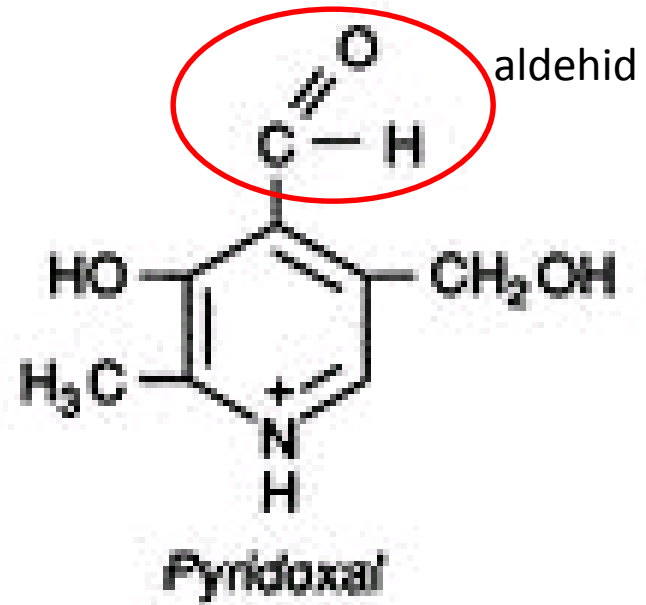
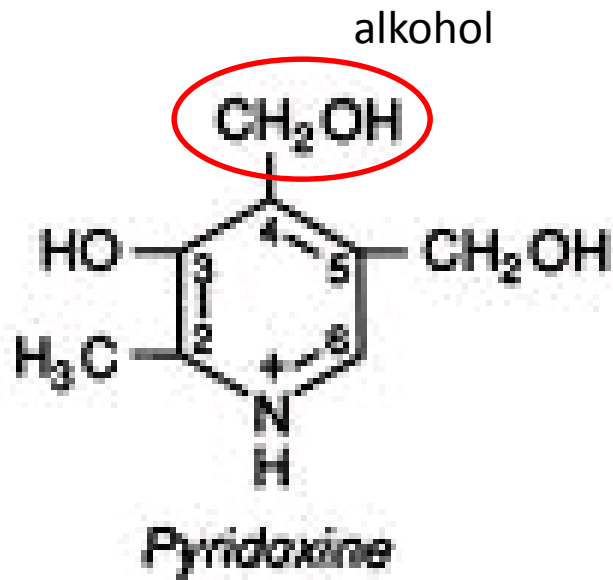
Metoda Cepat Analisis Riboflavin dalam Susu

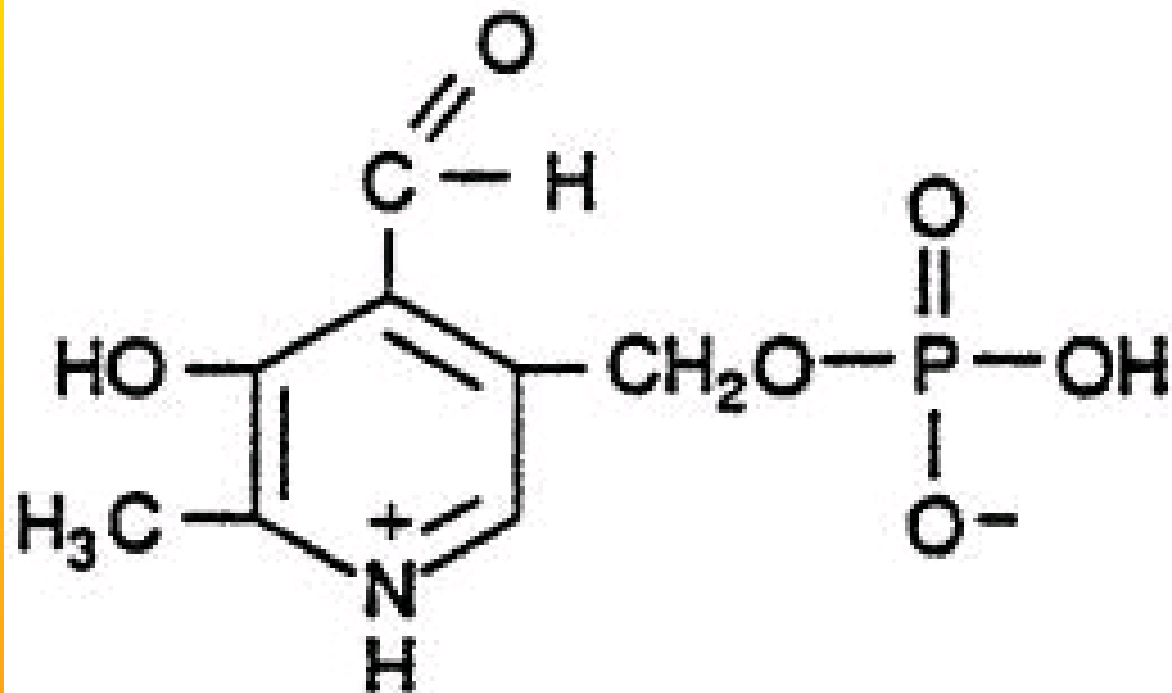
- 10ml susu dlm 125ml erlenmeyer ditambah 25ml 0.1N HCl. Gojog dan panaskan dlm autoclave 120°C selama 30 menit
- Dinginkan dan atur pH dng 1N NaOH menjadi pH 6.0 (jangan lebih karena akan tidak stabil)
- Asamkan kembali dng 1N HCl sampai pH 4.5 kmd pindahkan kedlm labu ukur 100ml, encerkan sampai tanda dng aquades, dan saring dng kertas Whatman no.42
- Ambil filtrat jernihnya, baca transmitannya pada 440-400nm (riboflavin berfluoresensi pd λ tsb)
- Buat kurva standar transmitansi lart standar riboflavin murni dng kadar 0.1 – 0.5 $\mu\text{g/ml}$ dg perlakuan sama dng di atas.

ANALISIS VITAMIN B₆ (PIRIDOKSIN)



vitamin B₆





Pyridoxal phosphate

- Piridoksin berupa bubuk tak berwarna dan berasa pahit
- Piridoksin mudah larut dalam air, alkohol, dan aseton; bersifat stabil dalam asam, basa, dan panas, namun terpengaruh oleh cahaya
- Dengan asam-asam mineral (misal HCl) akan membentuk garam
- Piridoksin-HCl berbentuk bubuk putih, bersifat larut dalam air dan alkohol, serta berasa asin

- Pyridoxin dapat diestimasi dng metoda kimiawi, mikrobiologi dan bioassay.
- Pyridoxin memiliki gugus fungsional fenolat, sehingga dapat membentuk reaksi warna yang dapat dimanfaatkan dalam tehnik analisis.

Prinsip analisa piridoksin (metoda Hochberg, Melnick, and Oser)

- Piridoksin yang terikat dibebaskan melalui hidrolisis dengan HCl dan pemanasan
- Setelah diasamkan (pH 3,0), piridoksin bebas diserap oleh **absorben Lloyd**
- Setelah pencucian dengan HCl, dilakukan elusi terhadap piridoksin yang terserap dalam absorben, dengan larutan NaOH
- Eluat dijernihkan dengan isopropil alkohol

- Supernatan diambil 3 kali dan diperlakukan sebagai berikut :
 - a. Supernatan saja
 - b. Supernatan + larutan standar piridoksin (sebagai standar internal)
 - c. Supernatan + asam borat (asam borat mengubah piridoksin menjadi **INAKTIF**)
- Setiap tabung ditambah reagen Gibb (mengan-dung 2,6-dikhloro quinon khloroimida)
- Piridoksin + 2,6-dikhloro-quinon-khloro-imida → terbentuk kompleks berwarna biru

Prosedur analisa

a. Reagen Gibb (larutan A)

100mg 2,6-dikhloroquinonkhloroimida dilarutkan dalam 250ml isopropanol, dimasukkan dalam botol gelap & disimpan di almari pendingin. Bila selama penyimpanan timbul warna pink → reagen harus dibuang (tdk murni)

b. Larutan ammonia-HCl (larutan B)

160g NH_4Cl + 700ml aquades + 160ml NH_4OH jenuh, kemudian diencerkan sampai 1000ml

c. Larutan piridoksin-HCl (larutan C)

100mg kristal piridoksin dilarutkan dalam 1 L HCl 0,1N dan disimpan di almari pendingin (stabil hingga 3 bulan) → merupakan stock solution (larutan induk) untuk membuat larutan standar (larutan standar dipersiapkan setiap hari)

d. Larutan buffer

73g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 167g asam sitrat + aquades sampai 1000ml → pH = 3.0

e. Preparasi ekstrak uji

- 3g sampel (mengandung 30-200 μg piridoksin, lebih baik $\pm 100\mu\text{g}$) + 10ml HCl 4N, dipanaskan dalam waterbath mendidih selama 1 jam
- Larutan didinginkan dan pH-nya dibuat 3.0 dengan HCl 1N dan NaOH 1N
- Ditambah 3ml larutan buffer + 2,5g reagen **absorben Lloyd**, gojog selama 5 menit dalam kondisi tertutup
- Setrifugasi dan supernatan dibuang
- Residu dicuci dengan 5ml HCl 0,001N : sentrifugasi & supernatan dibuang

- Ditambah 5ml NaOH 2N, diencerkan sampai 20ml, digojog 3 menit, lalu disentrifugasi (= **elu-si piridoksin**)
- Diambil 10ml eluat, ditambah 50ml isopropil alkohol, dan disentrifugasi
- Supernatan (= **ekstrak uji**) yang jernih dipindah dan pH-nya diatur menjadi 5,0 – 7,0 dengan HCl 12N

f. Pengembangan warna

- Disiapkan 3 tabung reaksi dan diisi dengan :
 - (1) 6ml ekstrak + 2ml larutan B + 1ml asam borat jenuh (= **blanko**)
 - (2) 6ml ekstrak + 2ml larutan B + 1ml air
 - (3) 6ml ekstrak + 2ml larutan B + 1ml larutan standar (= 10 μ g piridoksin)

- Ditambah 1ml larutan A (reagen Gibb) dan setelah 60 detik, transmisinya dibaca pada 620nm

- **PERHITUNGAN** → $\mu\text{g piridoksin/g} = \{L_2 / (L_3 - L_2)\} \times (10/6\text{ml}) \times \{(60/10) \times 18,5\} \times (1/W)$

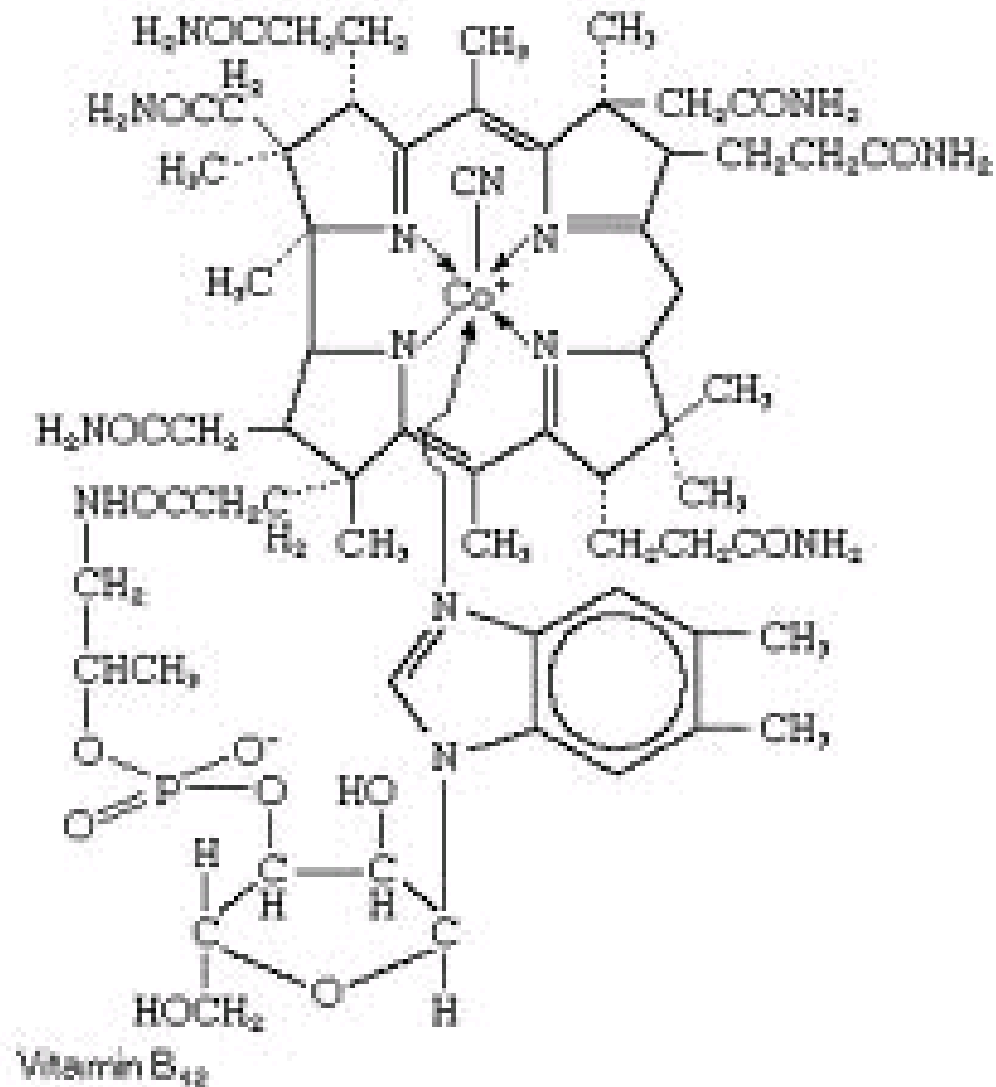
L_2 = densitas fotometrik (2-log G); G = % transmisi tab.2

$L_3 - L_2$ = peningkatan densitas fotometrik karena penambahan 10 μg piridoksin

W = bobot sampel, g

$(60/10) \times \mathbf{18,5}$ = faktor pengenceran (koreksi dilakukan untuk volume 1,5ml diserap oleh 2,5g adsorben dalam volume total 20ml)

ANALISIS VITAMIN B₁₂



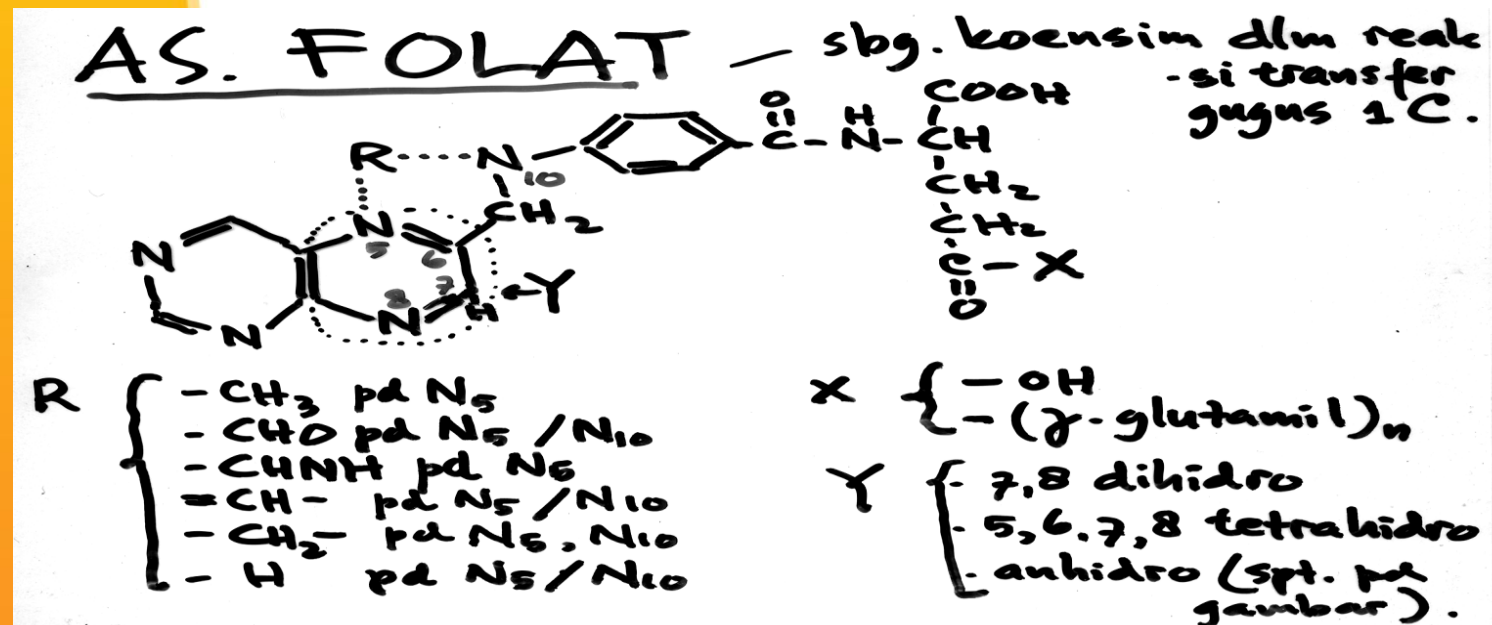
ANALISIS VITAMIN B₁₂ (KOBALAMIN) SECARA MIKROBIOLOGIS

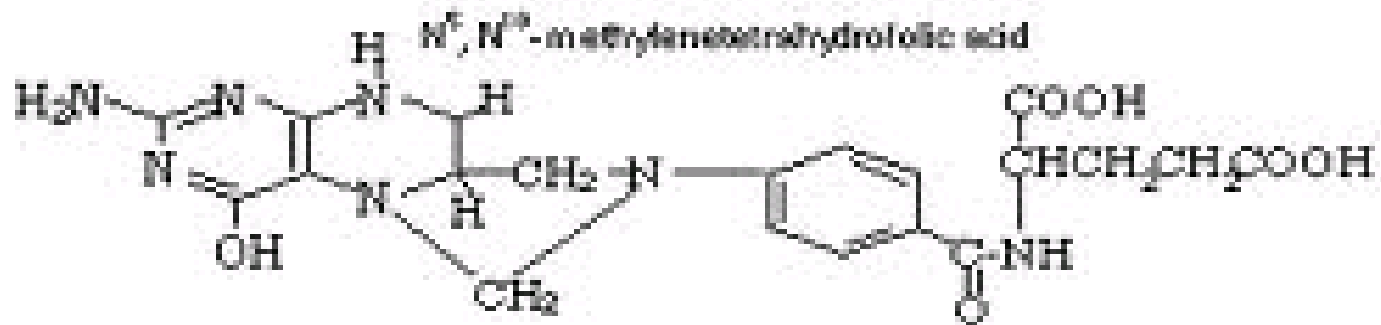
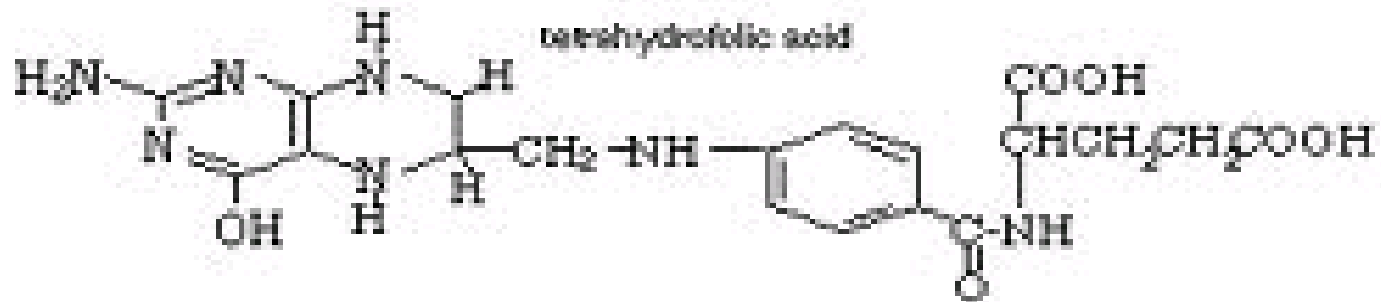
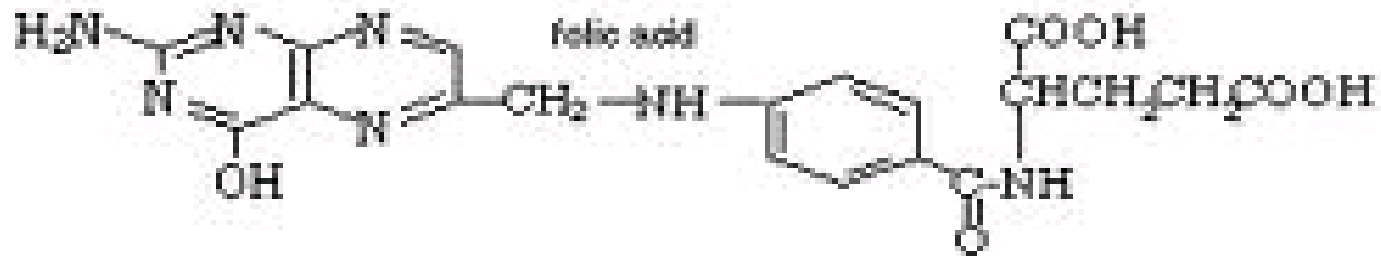
Prinsip analisa (Apriyantono, 1989)

- Vitamin B₁₂ dipisahkan dari makanan memakai larutan buffer asetat pH 4,5
- Kobalamin (tidak stabil) ditambah Na-sianida → terbentuk sianokobalamin yang stabil
- Kadar vitamin ditetapkan dengan menumbuhkan *Lactobacillus leichmanii* (bakteri tersebut membutuhkan vitamin B₁₂ untuk pertumbuhannya sehingga pada kondisi terkontrol pertumbuhannya spesifik)

ANALISIS FOLAT (Vit B9)

- Asam folat merupakan sekelompok senyawa yg bersumber pada dedaunan hijau, memiliki karakter seperti vitamin, yg memiliki aktivitas antianemia





Varian folat : folic acid, tetrahydrofolic acid,
 methylenetetrahydrofolic acid

ANALISIS FOLAT

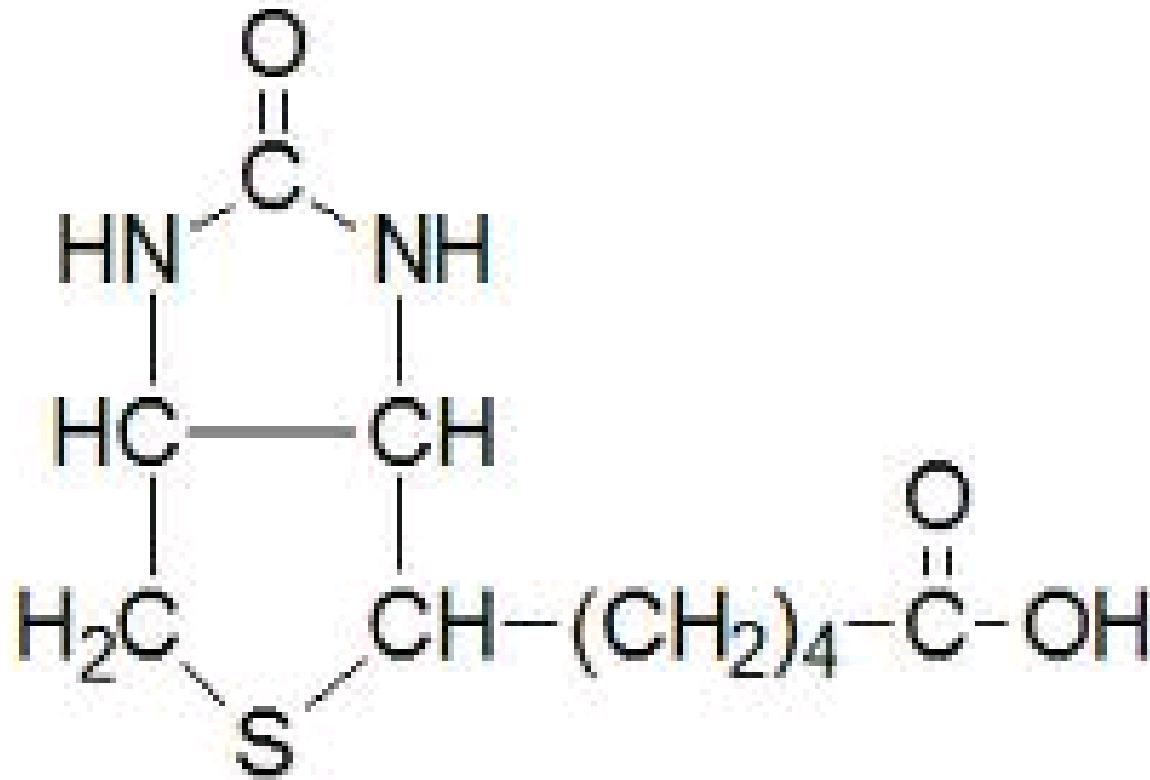
SECARA MIKROBIOLOGIS

- Folat merupakan nama umum, termasuk asam folat. Folat bersifat labil terhadap oksidasi, sinar, panas, dan *leaching* saat makanan diolah
- Analisa dilakukan secara mikrobiologis
- Prinsip analisa
 - Folat sampel diekstrak dalam buffer pada 100°C
 - Ekstrak diperlakukan dengan α -amilase, protease, dan conjugase
 - Respons pertumbuhan *L. rhamnosus* diukur dengan % transmitansi

Critical Point

- Perlu kehati-hatian tingkat tinggi untuk mencegah folat teroksidasi dan mengalami degradasi fotokimia.
- Agen pereduksi (asam askorbat, β -mercapto ethanol, and dithiothreitol) efektif untuk mencegah oksidasi.

ANALISIS BIOTIN (vitamin H / B7)



Biotin is a coenzyme in the synthesis of fatty acids, isoleucine, and valine, and it plays a role in gluconeogenesis

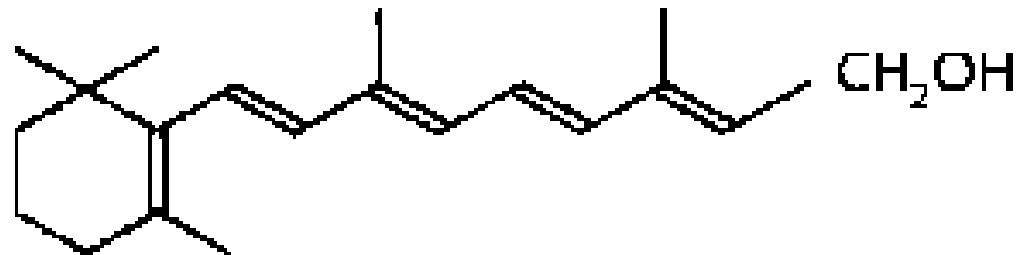
- Biotin dianggap sebagai kelompok vitamin B kompleks
- Merupakan kristal yang larut dalam air dan alkohol
- Bersifat stabil dalam suasana asam, alkalis, oleh cahaya dan suhu normal
- Tidak stabil pada suhu tinggi maupun oleh senyawa oksidator
- Analisa kadar biotin : metoda mikrobiologis dan bioassay



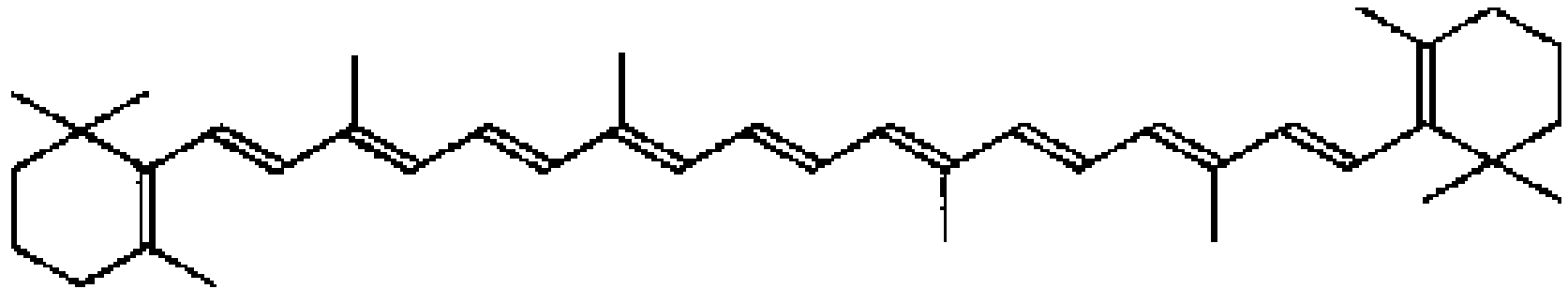
VITAMIN LARUT LEMAK

VITAMIN A

- Vitamin A biasa dianggap sebagai hasil oksidasi dari setengah molekul karoten, berupa alkohol tak jenuh ber-BM tinggi
- Karoten merupakan hidrokarbon tak jenuh dng rumus $C_{40}H_{56}$
- Selain α - dan β -karoten, κ - dan γ -karoten, kriptoxantin, mixoxantin, echinenon, aphanin, dan aphanicin, dianggap sebagai prekursor vitamin A
- Preparat vitamin A berupa kristal kuning pucat dengan titik lebur $63-64^{\circ}\text{C}$

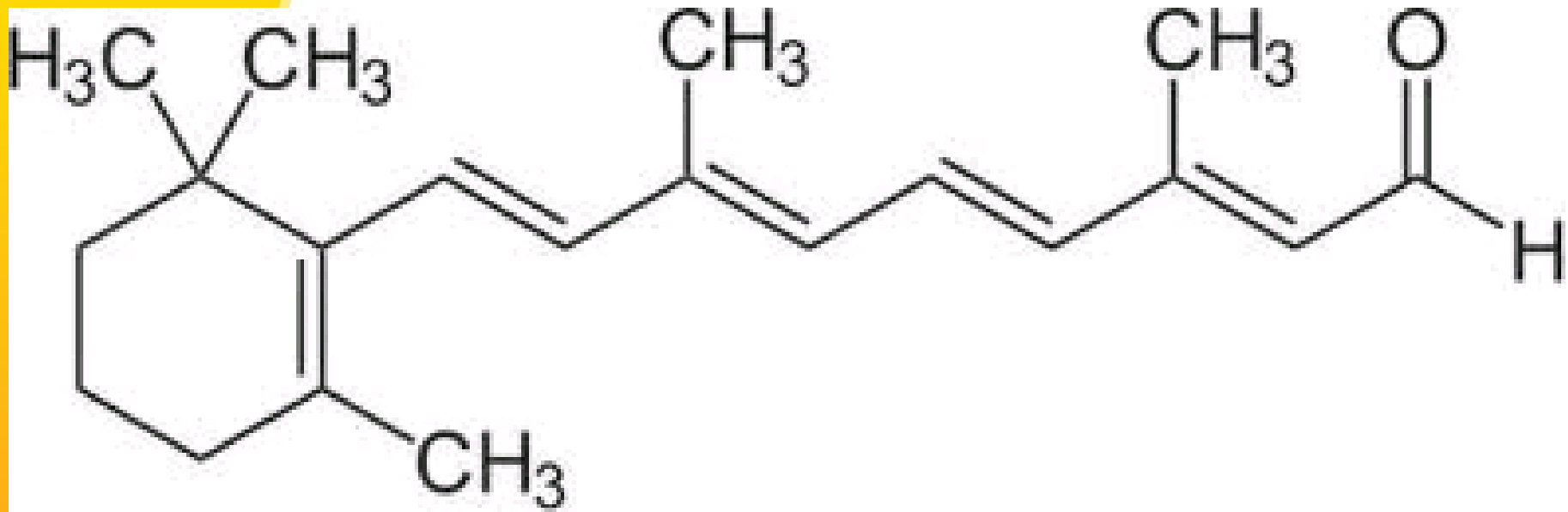


Vitamin A alcohol

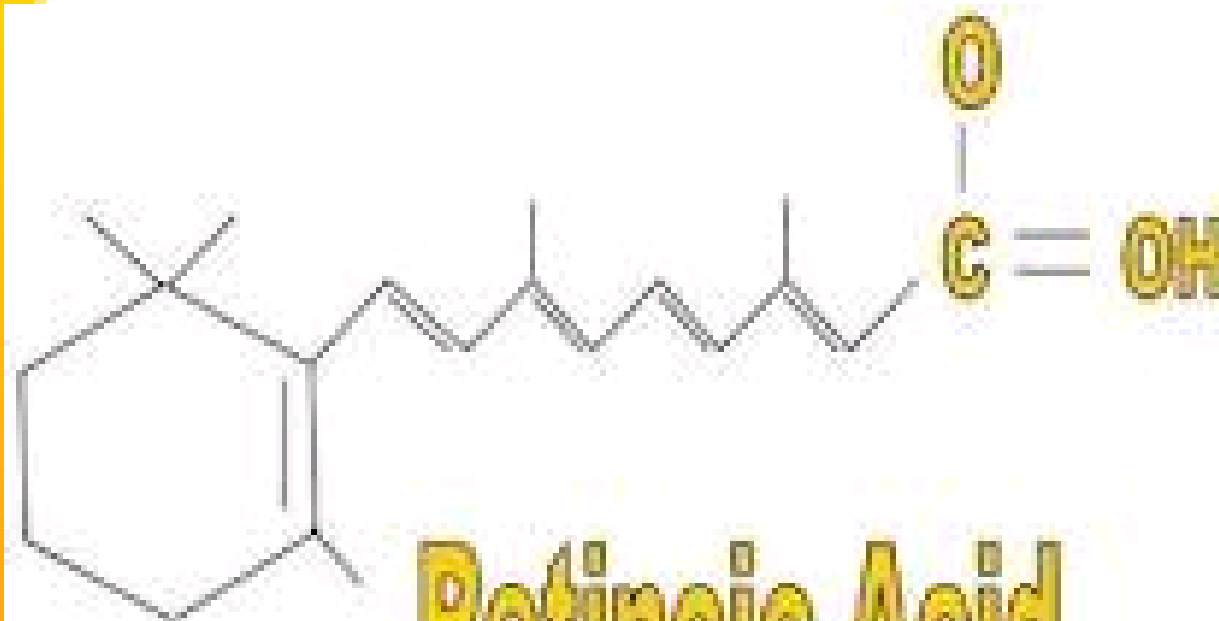


β -Carotene

Struktur vitamin A alkohol (retinol) & β -karoten
(cincin 6-C merupakan komponen kritis untuk aktivitas vitamin A)



Structure of retinal (bentuk aldehid)



Retinoic Acid

- Vitamin A larut dalam kebanyakan solven organik dan dlm lemak, tidak larut dalam air
- Absorbansi maximum vitamin A adalah pada 325-328 nm
- Hasil reaksi vitamin A dengan antimoni-khlorida (SbCl_3) memiliki absorbansi maximum pada 620 nm

Analisa

Analisa Vitamin A

(1) kolorimetri (metoda Carr-Price / antimonitrihlorida)

(2) kromatografi (HPLC)

1. Metoda Carr-Price (metoda antimoni-trikhlorida)

- Minyak hati ikan cod memberikan warna **biru-ungu** dengan agensia dehidrator semi-sal asam sulfat
- **Rosenheim dan Drummond** menemukan bahwa AsCl_3 memberikan warna biru intensif yang tidak cepat hilang
- Antimon-trikhlorida (SbCl_3) meski memberi warna kurang intensif tetapi lebih stabil, dengan serapan maximum pada 620nm

Garis besar prosedur analisa (Apriyantono et. al., 1989)

- Untuk sampel dengan kadar vitamin A **rendah** → dilakukan **saponifikasi** sbb.:
 - 10 + 0,1 g sampel ditambah 75ml alkohol 95% dan 25 ml KOH 50% dan dididihkan dengan memakai pendingin balik
 - Campuran dipindah ke labu pemisah dan dilakukan ekstraksi dengan ditambah dietil eter
 - Ekstrak eter dicuci dengan H_2O , kemudian ditambah Na-sulfat anhidrat (untuk membebaskan air)
 - Eter diuapkan dengan penangas air, kemudian gas N_2 → diperoleh ekstrak kering
 - Ekstrak kering dilarutkan dalam khloroform

- Untuk sampel yang kaya vitamin A : dilarutkan sampel dalam khloroform (konsentrasi akhir = 20% w/v)
- 4ml reagen Carr-Price ditambah 1ml khloroform (sebagai blanko)
- 0,5ml larutan sampel dalam khloroform ditambah 2ml reagen Carr-Price, dicampur merata
- Absorbansi campuran ditera pada 620 nm
- Dibuat kurva standar (kisaran konsentrasi vitamin A = 0 – 15 IU/ml)

Vitamin A

HPLC Analysis Procedure

- *Steps of analysis need to be taken to avoid any changes in the vitamin A → using nitrogen, and/or vacuum, avoiding high temperature*
- *Principles :*
 - *the sample is saponified*
 - *the vitamin A (retinol) extracted into organic solvent & concentrated*
 - *all-trans-retinol and 13-cis-retinol levels are determined by HPLC on silica column*

- ***Sample preparation*** (Nielsen, p. 182)
 - *Transfer 40ml of ready-to-feed formula or fluid milk into a 100-ml digestion flask*
 - *Add 10ml of ethanolic pyrogallol solution*
 - *Saponify with ethanolic KOH (at room temperature, 18 hr or 70°C using the reflux vessel)*

- ***Extraction of digest***

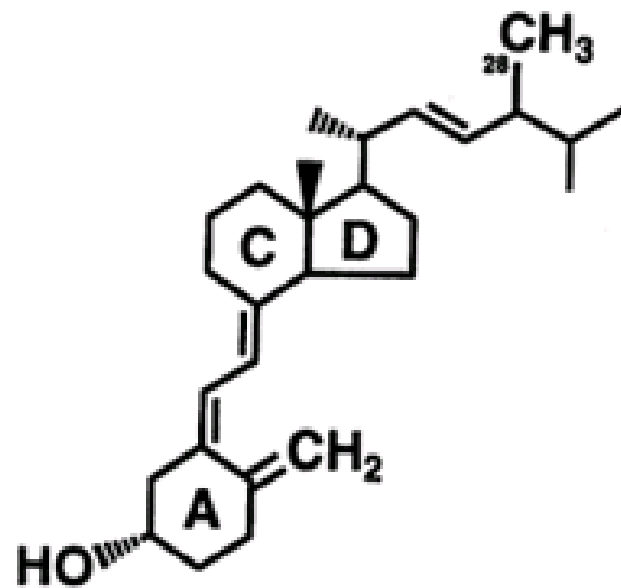
- *Pipet 3ml digest into 15-ml centrifuge tube & add 2ml of water*
- *Extract with 7ml hexane-diethylether (85+15)*
- *Repeat extraction 2x*
- *Pool extract, add 1ml hexadecane solution, and dilute to 25ml with hexane*
- *Pipet 15ml diluted extract and evaporate under nitrogen*
- *Dissolve residue in 0.5ml of heptane*

- ***Chromatography Parameters***

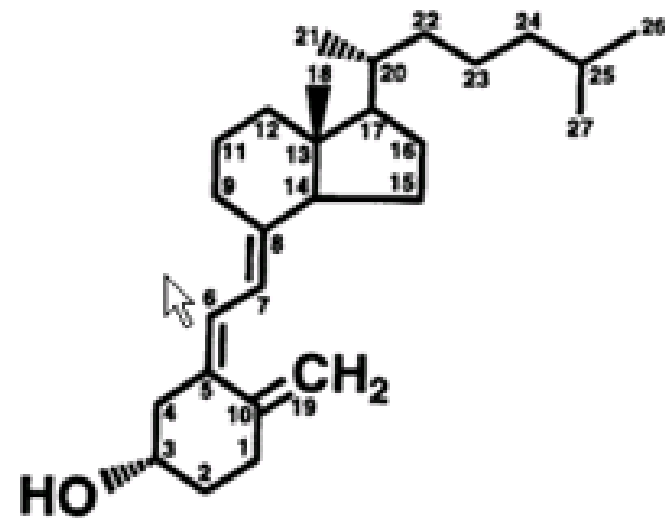
- *Column : 15cm x 4.5cm packed with 3 mm silica (Apex 3 μ m silica)*
- *Mobile phase : isocratic, heptane, and isopropanol (1-5%)*
- *Detection : UV, 340 nm*
- *Flow rate : 1-2 ml/min*
- ***Retention time*** : *4.5 min. for cis-retinol and 5.5 min. for all-trans-retinol*
- *The sample used in the procedure : milk and milk-based infant formula*

VITAMIN D

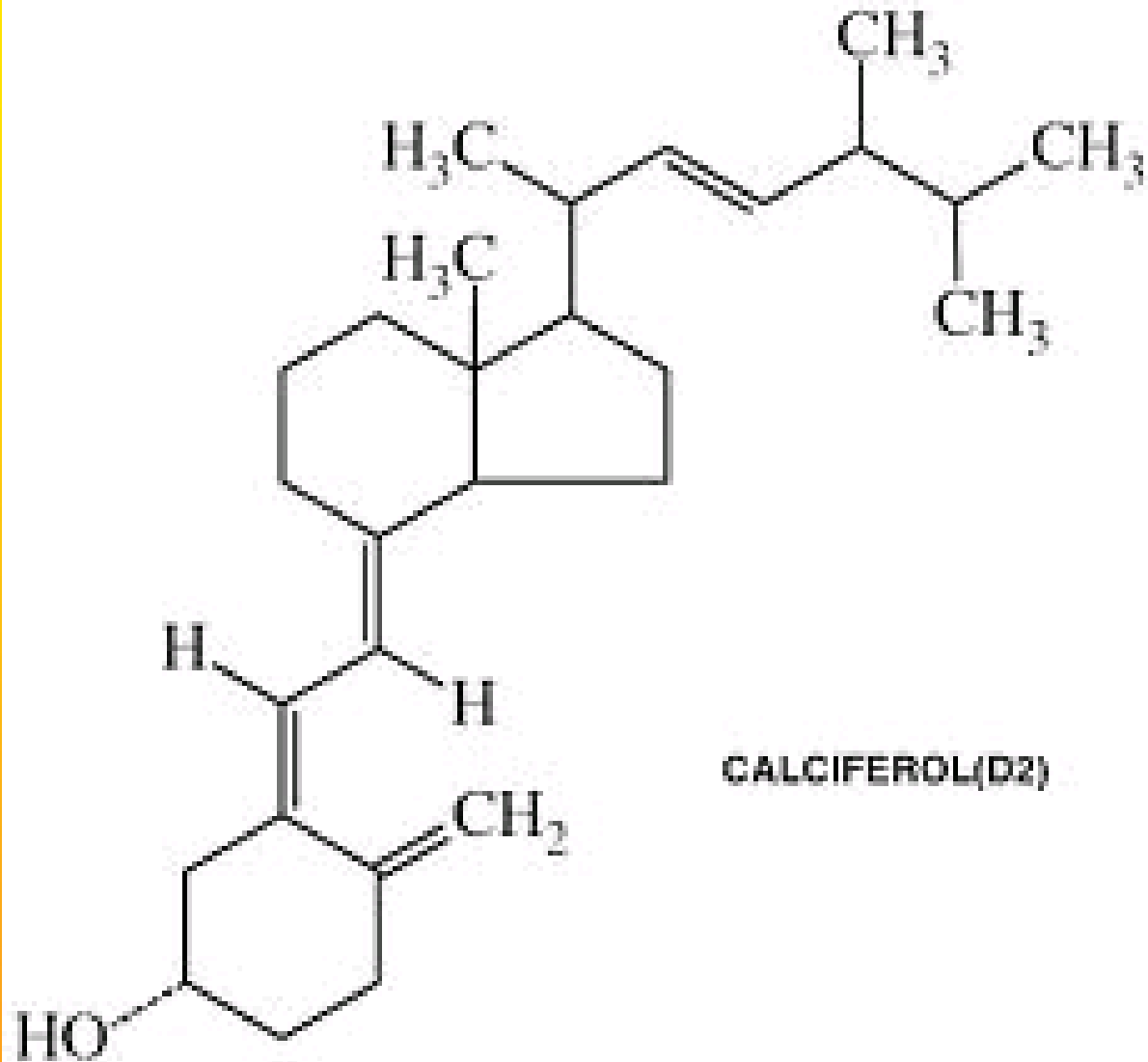
- Ada 8 bentuk vit.D (Bills, 1939) dan setidaknya ada 2 bentuk terdapat dalam minyak ikan
- Vit. D₂ (ergosterol teraktivasi) disebut juga *viosterol* atau *calciferol*, berupa padatan kristal tak berbau, dengan titik lebur 115-117°C, dan rotasi spesifik +82.6° dalam aseton



Vitamin D₂
(Ergocalciferol)



Vitamin D₃
(Cholecalciferol)



Struktur ergocalciferol (D2)

- Vitamin D dapat larut dalam minyak & lemak, alkohol, dan propilen-glikol
- Vitamin D tidak larut dlm air
- Vitamin D relatif stabil dalam larutan minyak tetapi akan mudah teroksidasi bila ada produk irradiasi vitamin D dan provitamin D
- Vitamin D dapat dipengaruhi oleh cahaya serta bersifat thermolabil

- Vitamin D₃ (7-dehidrokholesterol teraktivasi) berupa padatan kristalin putih, tidak berbau; dengan titik lebur 82-83°C; dan memiliki rotasi spesifik +83.5° dalam aseton
- Vitamin D memiliki spektrum serapan karakteristik maximum pada **265 nm**
- Metoda utama analisis kadar vitamin D adalah secara **bioassay**
 - karena ada perbedaan nilai antirachitis vitamin D dari berbagai sumbernya

1. Analisa vitamin D dengan antimoni triklorida

- Vit D_2 + D_3 dengan antimoni-triklorida dlm khloroform akan berwarna **orange-kuning** yang segera mencapai intensitas serapan maximum pada 500 nm
- *Tachysterol* memiliki sifat serupa, namun sterol lain serta vit. A tidak memiliki sifat seperti itu .

Garis besar prosedur analisa

- Dimasukkan 2 ml larutan yang diuji dalam tabung spektrometer dan ditambah 4 ml larutan jenuh Antimoni-trikhlorida dalam khloroform bebas air
- Ditunggu 10-15 menit dan serapannya dibaca pada 500 nm
- Kadar vitamin D dapat dihitung dengan persamaan kurva standar .

2. Analisa vitamin D dengan metoda Tzoni

- Bila vitamin D direaksikan dng **pyrogallol** dan AlCl_3 akan memberikan warna **merah-ungu**
- Vitamin D murni yang dilarutkan dalam alkohol absolut, benzen, petroleum ether, khloroform dapat ditera langsung
- Namun bila vitamin ini terlarut dalam minyak/lemak, harus dilakukan pemisahan lebih dahulu

3. Analisa vitamin D dengan pereaksi gliserol diklorohidrin

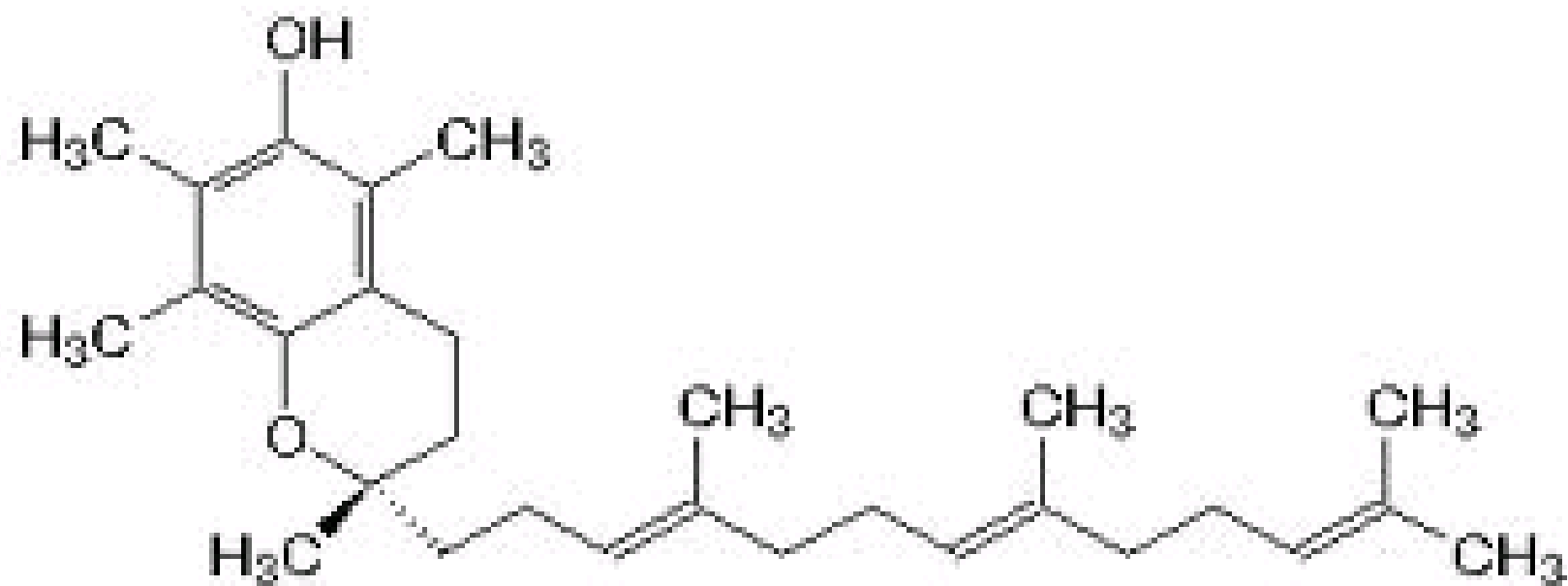
- Vitamin $D_2 + D_3$ bereaksi dengan gliserol diklorohidrin, dengan adanya asetil-khlorida atau halida-asam lainnya
- Vitamin D_2 dengan cepat membentuk warna kuning, yang kemudian berubah hijau dlm 1 menit dan mencapai maximum dalam 15 menit, serta akan stabil selama beberapa jam dengan serapan maximum pada 625 nm

- Dengan **ergosterol** segera muncul warna **pink pucat** yang berubah menjadi **orange/jingga** dalam 15-20 menit dan kemudian menjadi **hijau-fluoresen**
- Dengan **7-dehidrokholesterol** tidak nampak warna pd beberapa menit pertama kmd muncul **warna pink pucat** yang akan makin intensif dalam 24 jam
- Dengan kholesterol tidak muncul warna
- Reaksi tersebut dapat membedakan antara vitamin D₂ dari **ergosterol** dan **7-dehidro-kholesterol**; dan juga membedakan antara **ergosterol** dengan **7-dehidrokholesterol**

VITAMIN E

- Kelompok vitamin E terdiri dari α -, β -, γ -, dan δ - tokoferol dan beberapa esternya, semisal ester asetat dan allofanat
- Sumber alami vitamin E meliputi lembaga gandum, lembaga beras, (pada produk bekatul) dan minyak lettuce
- Untuk penggunaan bidang obat/kesehatan lebih disenangi produk sintetisnya, yaitu campuran rasemat ester *d*-tokoferol-asetat

-



Tocotrienol Structure

- Tokoferol berwujud minyak yg larut dlm pelarut lipida dan tidak larut dalam air. Tokoferol resistan terhadap asam, alkali, panas, dan cahaya nampak, namun mudah teroksidasi dan terpengaruh oleh cahaya UV
- Metoda analisis tokoferol didasarkan pada reduksi kuantitatif ion ferri oleh tokoferol, kemudian ion ferro akan membentuk reaksi warna dengan α, α' -dipiridil
- Kadar tokoferol diperbandingkan dengan kurva standar tokoferol murni
- Karoten dan lemak akan mengganggu pengukuran tersebut

Vitamin E HPLC Analysis Procedure

- ***Sample Preparation***

- a. General food products***

- *Add 10ml of 6% (w/v) pyrogallol in ethanol to sample, mix, and flush with N₂*
- *Heat (70°C, 10 min.) with sonication*
- *Add 2ml 60% KOH solution, mix, and flush with N₂ and digest for 30 min. 70°C*
- *Sonicate 5 min.*
- *Cool to room temperature & add NaCl and H₂O*

- *Extract with hexane (0.1% BHT) three times and combine hexane extracts*
- *Add 0.5g of MgSO_4 and mix*
- *Filter through a millipore filtration apparatus ($0.45\mu\text{m}$); dilute to volume with hexane*
- *Inject $20\mu\text{L}$ to HPLC*

b. Margarine and vegetable oil spreads

- *Add 40ml of hexane (0.1% BHT) to a 10-g sample and mix*
- *Add 3g of MgSO_4 , mix, let stand $\geq 2\text{hr}$*
- *Filter and dilute combined filtrate to volume with hexane (0.1% BHT). Inject $20\mu\text{L}$*

- **Chromatography Parameter**

Column - Hibar RT, Lichrosorb Si60 5 μm ,
25.0 cm x 4.6cm

Mobile phase – 0.9% isopropanol in hexane

Flow – 1 mL/min

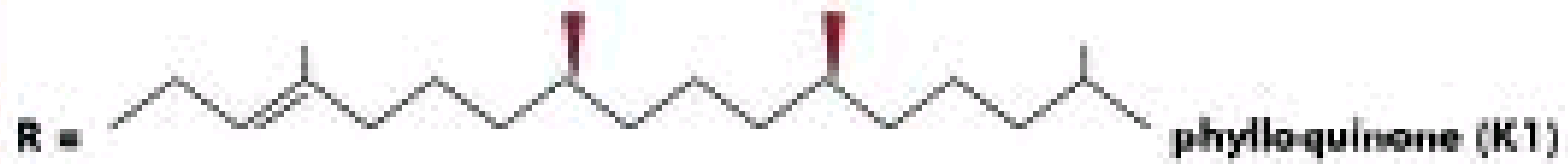
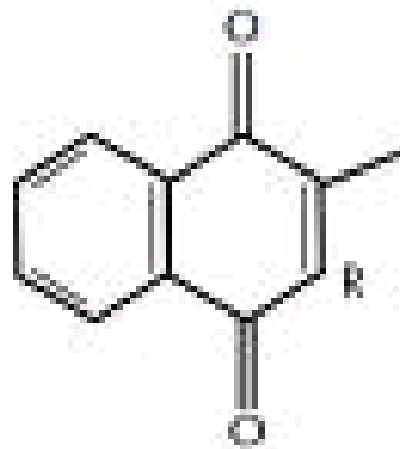
Detector – Fluorescence, $E_x\lambda = 290\text{nm}$ and $E_m\lambda = 330\text{nm}$

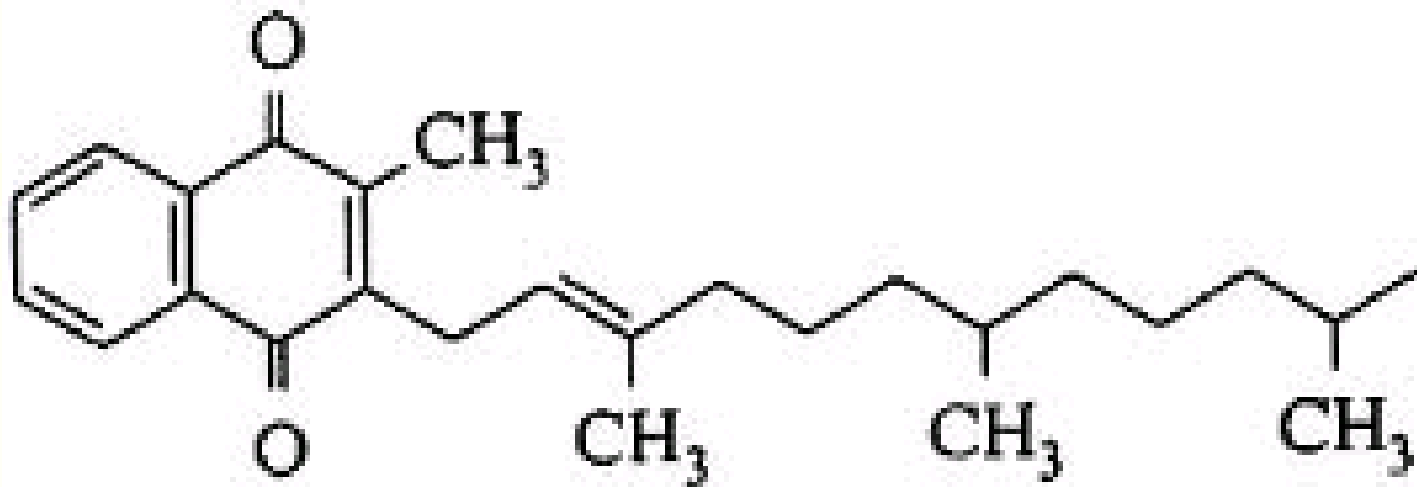


In fluorometer, there is a need for 2 wavelength selector : one for excitation beam & one for emission beam

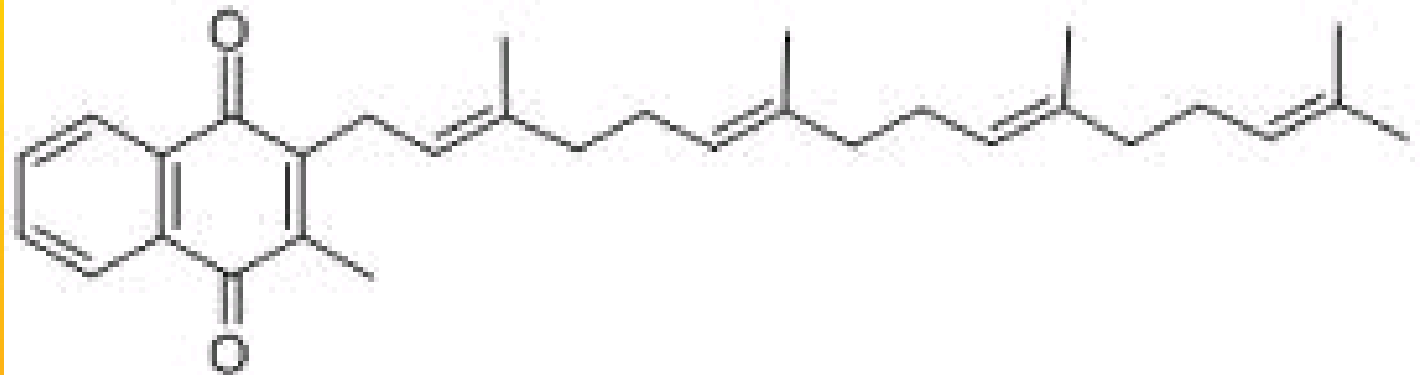
VITAMIN K

- Kelompok Vitamin K meliputi vit.K₁ dan K₂, serta banyak lagi senyawaan yg memiliki aktivitas sama
- Yang paling sederhana adalah 2-metil-1,4-naftoquinon atau menadion

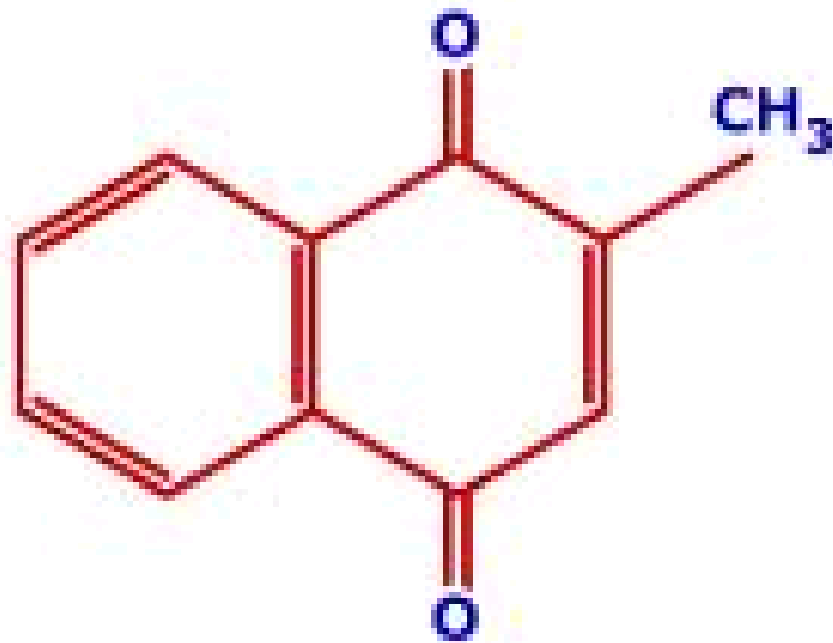




Vitamin K1



Struktur vitamin K2



Menadione

- Menadion berupa kristal kuning, dng titik lebur 106°C ; sedikit berbau tetapi khas
- Menadion sedikit larut dalam air; larut dalam alkohol dan solven organik umumnya
- Derivat menadion, yaitu Na-2,3-naftohidro-quinon-difosfat dan Na-2-metil-1,4-naftohidro-quinon-disulfat lebih larut dalam air
- Meskipun potensinya lebih rendah namun menadion lebih mudah diserap tubuh.

- Metoda analisis kuantitatif berdasar pada interaksi **2,4-dinitro-fenilhidrazin** dng **2-metil-1,4-naftoquinon** dng adanya ammonia alkoholis yang membentuk warna **biru** s/d **biru-hijau** .
- Metoda lainnya didasarkan pada reduksi katalitik larutan quinon dlm butil alkohol dng indikator *fenolsafranin*. Hasil hidroquinon kemudian ditambah larutan **Na-2,6-dikhloro-benzeneon-indofenol** dalam butil alkohol berlebihan, yang bebas udara. Menurunnya intensitas warna proporsional dng quinon awal yang ada.