

LUDWIK CZERWIECKI, GRAŻYNA WILCZYŃSKA

OZNACZANIE WITAMIN B₁ I B₂ W WYBRANYCH PRODUKTACH OWOCOWO-WARZYWNYCH

DETERMINATION OF VITAMINS B₁ AND B₂ IN SELECTED VEGETABLE-FRUIT PRODUCTS

Zakład Analizy Żywności
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
Kierownik: prof. dr hab. B. Szteke

Witaminy B₁ i B₂ w sokach owocowych i owocowo-warzywnych oznaczano techniką wysokosprawną chromatografią cieczową par jonowych w odwróconym układzie faz. Średni odzysk witaminy B₁ wahał się w zakresie od 85 do 104%, a witaminy B₂ od 94 do 106%. Granice wykrywalności i oznaczalności, w mg/ml produktu, wynosiły, odpowiednio: 0,0008 i 0,0024 (witamina B₁) oraz 0,0002 i 0,0007 (witamina B₂).

WSTĘP

Tiamina, czyli witamina B₁ występuje w różnych formach (chlorowodorek, pirofosforan) w zbożach i ich przetworach oraz w mięsie. Warzywa, owoce i ich przetwory są również źródłem tej witaminy chociaż uboższym [7]. Do głównych funkcji tiaminy w organizmie ludzkim należy udział w reakcjach cyklu pentozowego i tworzenie rybozy niezbędnej w syntezie nukleotydów. Witamina ta spełnia również istotną rolę w procesach zachodzących w komórkach układu nerwowego [10].

Druga z grupy witamin B – witamina B₂, czyli ryboflawina, występuje głównie w postaci związanej w mleku i jego przetworach, w mięsie, w wędlinach, w rybach, w produktach zbożowych oraz w roślinach strączkowych [10]. Ponieważ w owocach i warzywach jej zawartości są niewielkie jest ona często dodawana do ich przetworów np. soków oraz nektarów owocowych i warzywnych w celu wzbogacenia ich wartości odżywczej. Ryboflawina wchodzi w skład flawoproteidów biorąc udział w procesach oksydoredukcyjnych zachodzących w żywym organizmie.

Główny problem analityczny podczas oznaczania zawartości witamin B₁ i B₂ w żywności stanowi ich izolacja z połączeń w jakich zazwyczaj występują. Stosowane są różne metody ekstrakcji połączone zazwyczaj z hydrolizą kwasami mineralnymi, bądź hydrolizą enzymatyczną [2, 3, 8, 11]. Jednym z możliwych i prostszych rozwiązań jest również ekstrakcja kwasem nadchlorowym [2, 3]. Zawartość witamin oznacza się metodami biologicznymi, enzymatycznymi [7], spektrofotometrycznie, kolorymetryczne oraz fluorymetrycznie [7]. Stosuje się również technikę przepływowej analizy nastry-

kowej z detekcją w UV [5]. W przypadku witaminy B₁ związek macierzysty przekształca się do tiochromu, którego fluorescencję mierzy się przy 365/436 nm [7]. W metodzie kolorymetrycznej możliwe jest wykorzystanie reakcji barwnej tiaminy z p-aminoacetofenonem [7].

Natomiast witaminę B₂, która pod wpływem światła w środowisku alkalicznym ulega przemianie do lumiflawiny (7,8,10-trimetyloizaoaloksazyna), oznacza się fotometrycznie przy 450 nm lub fluorymetrycznie z emisją przy 513 nm [7].

W analityce obu witamin B wykorzystywana jest również coraz częściej technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w odwróconym układzie faz, również z zastosowaniem par jonowych, z detekcją w UV bądź fluorymetryczną [1, 2, 3, 8, 11].

Celem niniejszej pracy była adaptacja nowoczesnej i możliwie prostej metody oznaczania witamin B₁ i B₂ w przetworach owocowych i warzywnych, takich jak: soki, nektary lub przeciery itp.

Na podstawie przeglądu literatury i własnych badań wstępnych, za najodpowiedniejszą uznano metodę oznaczania obu witamin B techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem par jonowych w odwróconym układzie faz, po ekstrakcji kwasem nadchlorowym z detekcją w UV [2, 3]. Ponieważ metody oryginalne odnosiły się do tkanek zwierzęcych [9] oraz do preparatów odżywczych dla niemowląt na bazie soi i mleka, niezbędne były modyfikacje umożliwiające ich zastosowanie do innej grupy produktów, do których należą wymienione wcześniej przetwory owocowo-warzywne.

MATERIAŁY I METODYKA

Wyposażenie

Wykorzystano chromatograf cieczowy firmy Milton-Roy/LDC Analytical zestawiony z następujących elementów: pompy izokratycznej Constametric III, detektora UV Spectro-Monitor 3100, zaworu dozującego Rheodyne 731 z pętlą o pojemności 20 µl, kolumny chromatograficznej Nova Pak RP-C18, Waters z przedkolumną o analogicznych właściwościach. Pracę zestawu kontrolowano za pomocą komputera z programem sterującym i integracyjnym Axiom727. Do rejestracji chromatogramów wykorzystano drukarkę Epson LX-400.

Stosowano ponadto: systemy oczyszczania wody ElixTM i RiOSTM, Milipore, generator ultradźwięków Büchler, pH-metr mikrokomputerowy CP-135 Elmerton z elektrodą zespoloną ERH-11 i czujnikiem temperatury MT-100 AM, wagę analityczną WA34, wytrząsarkę laboratoryjną Lab-line Instruments Inc, mikrostrzykawkę Hamilton poj. 100 µl, saszki Schotta G-2 z zestawem do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem oraz typowe szkło laboratoryjne takie jak: kolby miarowe, pipety, cylindry miarowe, kolby Erlenmeyera, lejki szklane.

Odczynniki i materiały pomocnicze

1. Woda do HPLC uzyskana z wody wodociągowej po oczyszczeniu za pomocą systemów ElixTM i RiOSTM Milipore 2. kwas solny 67% cz.d.a., Analar BDH do przygotowania roztworu 0,1 molowego, 3. wodorotlenek potasowy cz.d.a., PPH Standard, Lublin (do przygotowania 6 molowego roztworu), 4. kwas nadchlorowy 70%, Aristar BDH, 5. kwas heksanosulfonowy 99%, Lancaster, 6. amoniak 25% cz.d.a., Analar BDH, 7. acetonitryl do HPLC, Promochem GmbH, 8. kwas o-fosforowy 85% cz.d.a., PPH POCh, Gliwice, 9. tiamina 99%, Lancaster do przygotowania roztworu wzorcowego podstawowego o stężeniu 0,1 mg/ml w 0,1 molowym roztworze kwasu solnego, 10. ryboflawina 98%, Lancaster do przygotowania roztworu wzorcowego podstawowego o stężeniu 0,02 mg/ml w 0,1 molowym roztworze kwasu solnego, 11. standard wewnętrzny jako kwas 3-hydroksybenzoesowy (m-HBA) 97%, Lancaster do przygotowania

roztworu o stężeniu 0,55 mg/ml cieczy elucyjnej roboczej, 12. bufor o pH 4, Eurosensor, Gliwice, 13. bufor o pH 7, Eurosensor, Gliwice.

Zasada metody

Zasada metody polega na ekstrakcji witamin z próbki przy użyciu kwasu nadchlorowego, usunięciu jego nadmiaru za pomocą 6 molowego roztworu wodorotlenku potasowego i doprowadzeniu analizowanego roztworu do wartości pH 3,0–3,6 [2, 3]. Witaminy B₁ i B₂ rozdzielano i oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem par jonowych na kolumnie RP-C18 z detektorem UV przy długości fali λ 254 nm.

Obróbka wstępna badanego materiału

Soki i soki przecierowe: bezpośrednio po otwarciu opakowania pobierano 20 ml soku do kolby *Erlenmayera* poj. 100 ml. Próbkę rozcieńczano 30 ml wody i zakwaszono 2 ml kwasu nadchlorowego.

Kolbę zamykano korkiem szlifowym i zabezpieczano folią aluminiową przed dostępem światła. Zawartość kolby wytrząsano przez 1 godzinę na wytrząsarce mechanicznej, następnie przenoszono do zlewki pojemności 150 ml i doprowadzano do pH 3,0–3,6 dodając kroplami 6 molarowy roztwór wodorotlenku potasowego. Próbkę przenoszono następnie ilościowo do kolby miarowej pojemności 100 ml uzupełniając jej objętość do kreski cieczą elucyjną roboczą¹. Tak przygotowaną próbkę przechowywano przez 24 godziny w lodówce w celu sklarowania. W przypadku niecałkowitego sklarowania zawartość kolby sączono przez sączek z bibuły. Przed wykonaniem analizy HPLC pobierano 5 ml klarownego roztworu do kolbki miarowej poj. 10 ml, do której uprzednio dodano 100 μ l roztworu wzorca wewnętrznego (m-HBA). Zawartość kolbki uzupełniano do kreski roztworem cieczy elucyjnej roboczej i mieszano w łaźni ultradźwiękowej 15–20 sek. Równoległe, w podobny sposób przygotowywano roztwór bez dodatku wzorca wewnętrznego.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Do kolby *Erlenmayera* poj. 100 ml zabezpieczonej folią aluminiową przed dostępem światła odmierzano 2 ml roztworu podstawowego witaminy B₁, 10 ml roztworu podstawowego witaminy B₂, 40 ml wody i 2 ml kwasu nadchlorowego. Dalej postępowano jak z próbkami soków.

Bezpośrednio przed wykonaniem analizy HPLC do 3 kolbek miarowych poj. 10 ml zawierających 100 μ l wzorca wewnętrznego pobierano po 2,5; 5,0 i 7,5 ml uprzednio przygotowanego roztworu wzorcowego witamin B₁ i B₂. Zawartość kolbek uzupełniano do kreski roztworem cieczy elucyjnej roboczej i mieszano w łaźni ultradźwiękowej w czasie 15–20 sek. W tak przygotowanych roztworach wzorcowych stężenie witamin B₁ i B₂ wynosiło odpowiednio: 0,0005, 0,0010 i 0,0015 mg/ml, a stężenie wzorca wewnętrznego (m-HBA) – 0,0055 mg/ml.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Analizę chromatograficzną próbek wykonywano w temperaturze otoczenia (20–25°C). Fazę rozwijającą (roztwór stężony) przygotowywano rozpuszczając 0,95 g kwasu heksanosulfonowego w mieszaninie o składzie: woda : acetonitryl : amoniak (904,5 : 95 : 0,5). Roztwór ten zobojętniono do pH 3,6 kwasem o-fosforowym. W celu przygotowania cieczy elucyjnej roboczej, do 950 ml cieczy podstawowej dodawano 50 ml wody.

Optymalna prędkość przepływu cieczy elucyjnej wynosiła 1 ml/min. Pomiaru absorbancji w UV dokonywano przy długości fali λ 254 nm.

W analogicznych warunkach chromatografowano roztwory wzorcowe witamin B₁ i B₂. Zawartość witamin B w mg/ml próbki obliczano z krzywej wzorcowej za pomocą programu komputerowego wykorzystującego następujące wzory:

¹ patrz: Wysokosprawna chromatografia cieczowa

dla metody standardu wewnętrznego:

$$C = \frac{R_F \cdot P \cdot C_{stwp} \cdot V_k}{P_{stwp} \cdot V}, \text{ gdzie}$$

$$R_F = \frac{C_{st} \cdot P_{stwst}}{P_{st} \cdot C_{stwt}} - \text{współczynnik odpowiedzi oznaczanej witaminy}$$

- P – powierzchnia piku oznaczanej witaminy w próbce badanej
 C_{stwp} – stężenie wzorca wewnętrznego w próbce badanej (mg/ml)
 P_{stwp} – powierzchnia piku wzorca wewnętrznego w próbce badanej
 C_{st} – stężenie witaminy B₁ i B₂ w roztworze wzorcowym (mg/ml)
 P_{stwst} – powierzchnia piku wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym witaminy B₁ i B₂
 P_{st} – powierzchnia piku witaminy B₁ i B₂ w roztworze wzorcowym
 C_{stwt} – stężenie wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym witaminy B₁ i B₂ (mg/ml)
 V_k – końcowa objętość próbki po rozcieńczeniu ml
 V – objętość próbki pobrana do analizy ml.

W metodzie standardu zewnętrznego stosowano wzór:

$$C = \frac{C_{st} \cdot P \cdot V_k}{P_{st} \cdot V}, \text{ gdzie:}$$

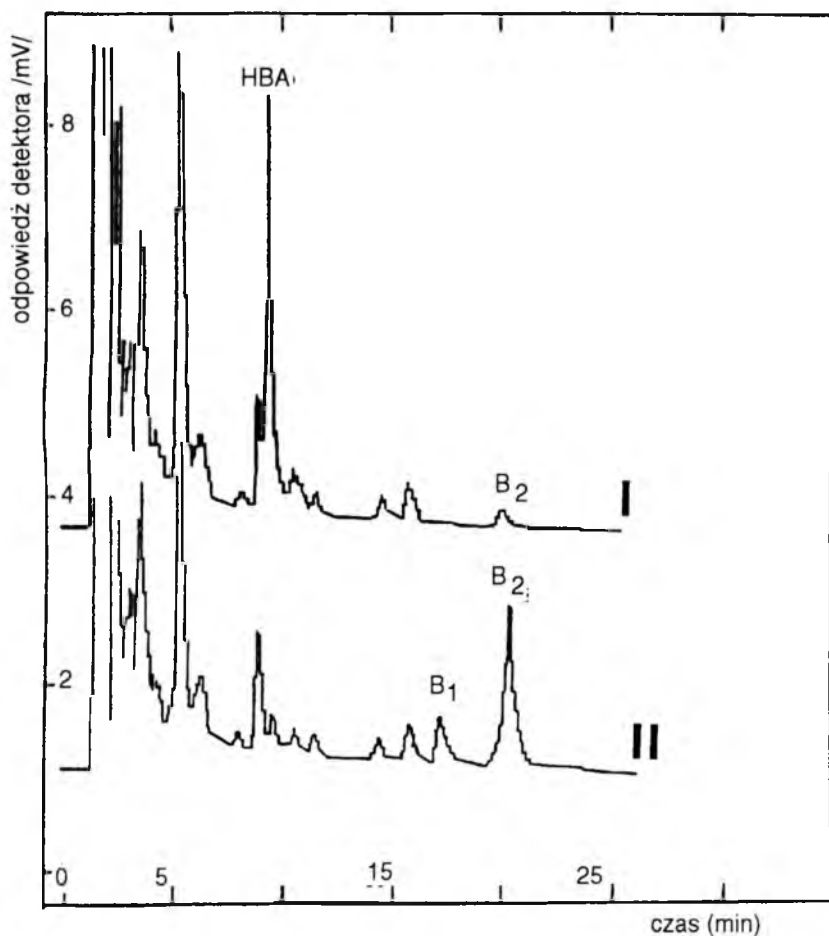
- C_{st} – stężenie witamin B w roztworze wzorcowym (mg/ml)
 P – powierzchnia piku witaminy B₁ i B₂ w próbce badanej
 P_{st} – powierzchnia piku witaminy B₁ i B₂ w roztworze wzorcowym
 V_k – końcowa objętość próbki po rozcieńczeniu ml
 V – objętość próbki pobrana do analizy ml.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W badaniach wstępnych na roztworach wzorcowych witamin sprawdzono optymalne długości fali absorpcji w UV. Stwierdzono, że przy 254 nm można oznaczać zarówno witaminę B₁ jak i B₂ (pomimo ich różnych maksimów absorpcji; odpowiednio: 246, 266 nm). Ustalono ponadto, że roboczy zakres liniowości detektora przy tej długości fali obejmował stężenia od 0,0005 do 0,0015 mg/ml każdej z oznaczanych witamin. Wykazano również pozytywny wpływ (lepszy rozdział obu substancji na chromatogramach przy nieznacznie dłuższych czasach retencji) rozcieńczenia 950 ml cieczy elucyjnej 50 ml wody.

W pierwszej fazie badań prześledzono również (na roztworach wzorcowych) dwa sposoby obliczania wyniku: metodą standardu wewnętrznego oraz metodą standardu zewnętrznego. Uznano, że wyniki otrzymane w obu przypadkach były porównywalne. Jednak w późniejszej fazie badań na rzeczywistych próbkach, okazało się, że w opisanych warunkach metoda standardu wewnętrznego z m-HBA nie może być stosowana do soków, np. do soku jabłkowego, soku przecierowego z marchwi oraz soku z jabłek i brzoskwiń ze względu na obecność w nich niezidentyfikowanej substancji o czasie retencji zbliżonym do stosowanego standardu wewnętrznego (ryc. 1).

Zastosowanie więc wzorca wewnętrznego może być celowe jedynie w przypadku, gdy w badanej próbce nie występuje substancja o podobnym czasie retencji do użytego wzorca, a wykonywane czynności w sposób istotny mogą rzutować na poprawność



Ryc. 1. Chromatogramy próbki soku jabłkowego z dodatkiem HBA (I) oraz próbki fortyfikowanej witaminami B₁ i B₂ bez dodatku HBA (II)

Chromatograms of apple juice samples with HBA (I) and fortified by vitamins B₁ and B₂ without HBA (II)

wyniku oznaczenia. W przedstawionych badaniach nie stwierdzono istotnego wpływu zabiegów związanych z izolowaniem witamin z próbki na wynik oznaczenia.

Przydatność opisaney procedury analitycznej do oznaczania witamin B₁ i B₂ w poszczególnych rodzajach produktów sprawdzono fortyfikując próbki soków i soków przecierowych określonymi poziomami obu witamin. Metoda ekstrakcji witamin B kwasem nadchlorowym stosowana do tkanek zwierzęcych [9] oraz preparatów sojowych i przetworów mlecznych, okazała się przydatna również do produktów takich jak soki owocowe i warzywne. W przypadku próbek zawierających te witaminy, odzysk metody określano w stosunku do teoretycznie obliczonej ich zawartości stanowiącej sumę oznaczonego stężenia i poziomu fortyfikacji, przyjmując tę wartość za 100%. Do obliczania zawartości witaminy B₁ i B₂ stosowano metodę standardu zewnętrznego. W tabelach I – III zebrano m.in. wartości średniego odzysku obu witamin.

Tabela I. Odzyskiwalność i precyzja metody (n = 6 powtórzeń)
 Recovery and precision of the method (n = 6 parallel determinations)

Próbka	Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ przed fortyfikacją mg/ml	Poziom fortyfikacji wit. B ₁ /B ₂	Poziom fortyfikacji wit. B ₁ /B ₂
		0,01/0,005 mg/ml	0,02/0,01 mg/ml
		Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ mg/ml	Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ mg/ml
Sok multiwitaminowy Donald (1)	0,0069/0,0093	0,0167/0,0146	–
Średni odzysk %	–	98,8/102,1	–
SD	0,00073/0,00089	0,00092/0,00061	–
RSD %	10,6/9,6	5,5/4,2	–
Sok multiwitaminowy Donald (2)	0,0073/0,0079	–	0,0285/0,0189
Średni odzysk %	–	–	104,4/105,6
SD	0,00045/0,00018	–	0,00095/0,0004
RSD %	6,2/2,3	–	3,3/2,1

SD – odchylenie standardowe, RSD % – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)

Tabela II. Odzyskiwalność i precyzja metody (n = 6 powtórzeń)
 Recovery and precision of the method (n = 6 parallel determinations)

Próbka	Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ przed fortyfikacją mg/ml	Poziom fortyfikacji wit. B ₁ /B ₂ 0,01/0,005 mg/ml	Poziom fortyfikacji wit. B ₁ /B ₂ 0,02/0,01 mg/ml
		Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ mg/ml	Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ mg/ml
Sok z owoców egzotycznych (przecierowy)	0,0025/nw.	0,0119/0,0048	0,214/0,0103
Średni odzysk %	–	95,2/96,0	95,1/103,0
SD	0,0022	0,00053/0,00006	0,00070/0,00035
RSD %	8,8	4,5/1,3	3,3/3,4
Sok multiwitaminowy Donald (2)	nw./0,0010	0,0095/0,0058	0,0203/0,0106
Średni odzysk %	–	95,0/96,7	101,5/96,4
SD	0,00010	0,00042/0,00012	0,0001/0,00017
RSD %	10,0	4,4/2,1	1,5/1,6

SD – odchylenie standardowe, RSD % – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności), nw. – nie wykryto

Tabela III. Odzyskiwalność i precyzja metody (n = 6 powtórzeń)
 Recovery and precision of the method (n = 6 parallel determinations)

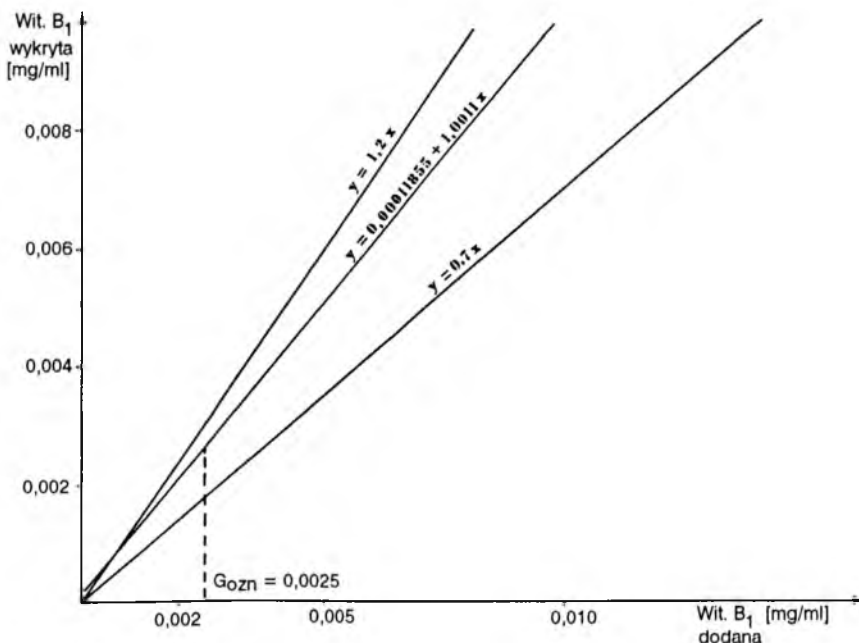
Próbka	Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ przed fortyfikacją mg/ml	Poziom fortyfikacji wit. B ₁ /B ₂ 0,01/0,005 mg/ml	Poziom fortyfikacji wit. B ₁ /B ₂ 0,02/0,01 mg/ml
		Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ mg/ml	Średnia zawartość wit. B ₁ /B ₂ mg/ml
Sok pomidorowy (przecierowy)	nw./nw.	0,0085/0,0048	0,0198/0,0095
Średni odzysk %	-	85,0/96,0	99,0/95,0
SD	-	0,00041/0,00014	0,00059/0,00026
RSD %	-	4,8/2,9	2,9/2,7
Sok multiwitaminowy Donald (2)	nw./nw.	0,0101/0,0047	0,0196/0,0104
Średni odzysk %	-	101,0/94,0	98,0/104,0
SD	-	0,00050/0,00032	0,00073/0,00024
RSD %	-	4,9/6,8	3,7/2,3

SD – odchylenie standardowe, RSD % – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności), nw. – nie wykryto

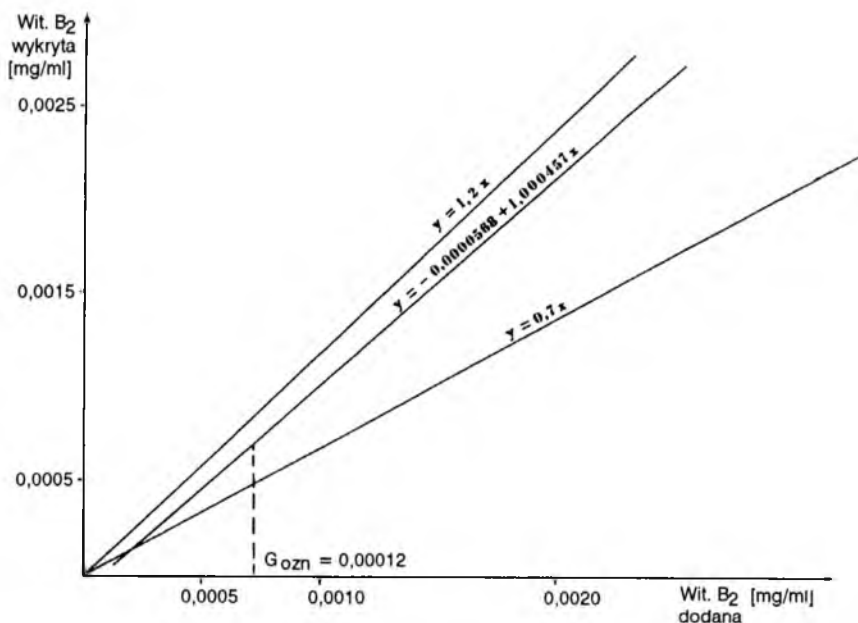
Jak wynika z przedstawionych danych zawartych w tabelach, średni odzysk witaminy B₁ wahał się w granicach od 85 do 104% w zależności od rodzaju próbki i poziomu wzmocnienia. Względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności) wynosiło 1,5 do 10,6%.

W przypadku witaminy B₂ w tych samych produktach, przy tym samym poziomie fortyfikacji, wartości te wynosiły odpowiednio: 94–106% i 1,6–10,0%.

W celu obiektywnego wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności metody zastosowano postępowanie wg Hädricha i wsp. [6]. Dla witaminy B₁ wykonano zatem po 3 równoległe wzmocnienia soku z czarnej porzeczki (nie zawierającej tiaminy) na poziomie: 0,020; 0,010 i 0,002 mg/ml soku określając dla każdego poziomu odpowiedź detektora. Podobnie postępowano w przypadku witaminy B₂ wykonując po 3 równoległe pomiary w soku pomidorowym (nie zawierającym ryboflawiny) fortyfikowanym poziomami: 0,0050; 0,0025 i 0,0005 mg/ml soku. W ten sposób wyznaczono równanie regresji opisujące zależność pomiędzy stężeniem dodanych witamin a wielkością sygnału detektora. Następnie korzystając dalej z tego sposobu, który zastosowano również z powodzeniem we wcześniejszej pracy własnej dotyczącej oznaczania witaminy C [4], wyznaczono m.in.: równania regresji opisujące zależność pomiędzy stężeniem roztworów wzorcowych witamin a sygnałem detektora oraz wykreślono krzywe odzysku, czyli zależności pomiędzy stężeniami dodanych do próbek witamin B a stężeniami obliczonymi z równań regresji krzywych kalibracyjnych roztworów wzorcowych. Wyrażają to równania: $y = 0,00011855 + 1,0011 x$ (dla witaminy B₁) oraz $y = -0,0000568 + 1,00457 x$ (dla witaminy B₂) (ryc. 2 i 3). Obliczono także granice wykrywalności oraz oznaczalności dla obu witamin.



Ryc. 2. Krzywa odzysku witaminy B₁ z soku z czarnej porzeczki
Recovery curves of vitamin B₁ for black-currant juice



Ryc. 3. Krzywa odzysku witaminy B₂ z soku pomidorowego.

Objaśnienia: G_{ozn} – graficzne odwzorowanie granicy oznaczalności metody
Recovery curves of vit. B₂ for tomato juice

Dla witaminy B₁ granica wykrywalności dla odzysku pomiędzy 70 a 120% (równania: $y = 0,7x$ i $y = 1,2x$) wynosiła 0,0008 mg/ml produktu, natomiast granica oznaczalności 0,0024 mg/ml. W przypadku witaminy B₂ wartości te wynosiły, dla warunku jak poprzednio, odpowiednio: 0,0002 i 0,0007 mg/ml analizowanego produktu (ryc. 2, 3).

WNIOSKI

1. Opisana metoda oznaczenia witamin B₁ i B₂ w sokach owocowych i owocowo-warzywnych jest stosunkowo prosta i charakteryzuje się dobrymi parametrami średniego odzysku i powtarzalności, a także wykrywalności i oznaczalności. Może więc być stosowana w badaniach rutynowych. Jej ewentualne zastosowanie do innych produktów spożywczych wymaga jednak sprawdzenia.

L. Czerwiecki, G. Wilczyńska

DETERMINATION OF VITAMINS B₁ AND B₂ IN SELECTED VEGETABLE-FRUIT PRODUCTS

Summary

A simple method was described to determine vitamins B₁ and B₂ in fruit and vegetable-fruit juices. Vitamins were extracted with perchloric acid and for their determination an ion pairing RP-HPLC technique with UV detection by 254 nm was applied.

The average recovery for vitamin B₁ was 85–104% and 94–105% for vitamin B₂. The statistically estimated limits of identification and detection were respectively, for both vitamins: for B₁: 0,008 and 0,0024, and for B₂ 0,0002 and 0,0007 mg/ml of product.

PIŚMIENNICTWO

1. *Albada-Hurtado S., Veciana-Nogues M.T., Izquierdo-Pulido M.* i wsp.: Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A.* 1997, 778, 247–253.
2. *Chase G.W. Jr, Landen W.O. Jr, Eiteniller R.R.* i wsp.: Liquid chromatographic determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in infant formula. *J. AOAC Int.* 1992, 75, 561–565.
3. *Chase G.W. Jr, Landen W.O. Jr, Saliman E.G.* i wsp.: Method modification for liquid chromatographic determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in medical foods. *J. AOAC Int.* 1993, 76, 1276–80.
4. *Czerwiecki L., Wilczyńska G.*: Oznaczanie witaminy C w wybranych produktach owocowo-warzywnych. *Roczn. PZH* 1999, 50, 77–87.
5. *Danet A.F., Calatayud J.M.*: FIA-spectrophotometric determination of thiamine after UV-irradiation. *Talanta* 1994, 41, 2147–2157.
6. *Hädrich J., Vogelgesang J.*: Konzept 96 zur Ermittlung von Nachweis-Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. *Deutsch. Lebensm. Rdsch.* 1996, 92, 341–350.
7. *Moszyński P., Pyć R.*: *Biochemia witamin. Cz. I. Witaminy grupy B i koenzymy.* PWN, Warszawa 1998, 24–76.
8. *Ötles S.*: Vergleichende Vitamin B₁ und B₂ Bestimmungen in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Forsch.* 1991, 193, 347–350.
9. *Pierotti J.A., Dickson A.G., Palmer J.K.* i in.: Liquid chromatographic separation and quantitation of B6 vitamers in selected rat tissues. *J. Chrom.* 1984, 306, 377–382.
10. *Secomska B.*: *Tiamina. W: Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności,* ed. U. Rutkowska, PZWŁ, Warszawa 1981, 253–258.
11. *Vidal-Valverde C., Reche A.*: Reliable system for the analysis of riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography and UV detection. *J. Liq. Chrom.* 1990, 10, 2089–2101.

Otrzymano: 1999.05.10.