



Određivanje sadržaja vitamina B₂ u jetrenoj pašteti primenom kisele i kiselo-enzimske hidrolize

Vitamin B₂ content determination in liver paste by using acid and acid-enzyme hydrolysis

Zorica Basić*, Vesna Kilibarda†, Ivanka Miletić‡

Vojnomedicinska akademija, *Institut za higijenu, †Centar za kontrolu trovanja, Beograd;
Farmaceutski fakultet, ‡Institut za bromatologiju, Beograd

Apstrakt

Uvod/Cilj. Vitamin B₂ nalazi se u namirnicama u obliku koenzima i u slobodnom stanju. Za određivanje njegovog sadržaja potrebno je primeniti niz analitičkih postupaka (oslobađanje iz kompleksa, ekstrakciju oslobođenog i slobodnog oblika), a zatim detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju. Priprema uzorka je veoma važan deo analitičke metode. Cilj rada bio je upoređivanje efikasnosti dve ekstrakcione metode – kisele i kiselo-enzimske hidrolize u određivanju sadržaja vitamina B₂ u jetrenoj pašteti. **Metode.** Za detekciju vitamina B₂ u jetrenoj pašteti korišćena je tečna hromatografija pod visokim pritiskom uz fluorescentni detektor, specifična i dovoljno osetljiva metoda za namirnice složenog sastava, sa prirodnim sadržajem vitamina. Kisela hidroliza izvedena je primenom 0,1 M hlorovodonične kiseline u autoklavu, na 120 °C, 30 minuta, a enzimska hidroliza primenom 10% takadiastaze, na 45 °C 4 sata. Analizirano je 10 uzoraka jetrenih pašteta iz nabavke za potrebe Vojske Srbije. Separacija analita izvedena je na analitičkoj koloni Nucleosil 50–5 C18 uz mobilnu fazu 450 ml CH₃OH + 620 ml 5 mM CH₃COONH₄, a detekcija na fluorescentnom detektoru sa promenljivim talasnim dužinama. Ispitani su limit detekcije i limit kvantifikacije (zbog moguće interferencije vitamina B₂ sa reagensima), specifičnost metode, linearnost odnosa površine pika i koncentracije za standardne rastvore vitamina B₂

za obe metode u rasponu od 0,05 µg/ml do 2,0 µg/ml, preciznost obe metode za koncentraciju od 0,5 µg/ml vitamina, kao i analitički prinos obe metode. **Rezultati.** Svi prethodno ispitani parametri potvrdili su obe metode kao specifične, precizne i reproduktivne, sa visokim prinosom (98,5% za kiselu i 98,2% za kiselo-enzimsku hidrolizu), linearnošću u opsegu koji je značajno nadmašio očekivani sadržaj u uzorcima ($r = 0,99994$, odnosno $r = 0,99987$). Postupci hidrolize dovode uzorak u stanje pogodno za određivanje vitamina B₂. U ispitivanim uzorcima paštete određene su visoke vrednosti vitamina B₂: 0,830 mg/100 g nakon kisele hidrolize i 0,909 mg/100 g nakon kiselo-enzimske hidrolize. Dobijene su statistički značajno veće vrednosti nakon primene kiselo-enzimske hidrolize ($p < 0,05$). **Zaključak.** Postupkom kiselo-enzimske hidrolize i primenom separacione instrumentalne tehnike za razdvajanje (tečna hromatografija) sa fluorescentnim detektorom kao detekcionim sistemom, određene su statistički značajno veće količine vitamina B₂ nego nakon postupka kisele hidrolize. Određene vrednosti sadržaja vitamina B₂ u deset uzoraka jetrene paštete visoke su (od 0,881 do 0,936 mg/100 g) i ukazuju na to da je ovaj proizvod od mesa dobar izvor vitamina B₂.

Ključne reči:
vitamin b₂, meso, proizvod; hidroliza; hromatografija, tečna, pod vp; evaluaciona studija.

Abstract

Background/Aim. Vitamin B₂ is available in foodstuff in the form of coenzyme and in free form. For its content determination a few procedures should be performed (deliberation from a complex, extraction of free and deliberated form) and detection, identification and quantification. There is a particular problem in determination of vitamin B₂ in the meat products. For a determination of total vitamin B₂ content in liver paste two preparation procedures are compared: acid and acid-enzymatic hydrolysis. The aim of this

study thus, was to compare the effectiveness of these two different procedures for vitamin B₂ content determination in liver paste. **Methods.** High pressure liquid chromatography (HPLC) method with fluorescence detector, as specific and adequately sensitive for the foodstuff of a complex composition with a natural vitamin content, was used for determination of vitamin B₂ in liver paste. Acid hydrolysis was performed with the application 0.1 M hydrochloric acid in a pressure cooker, and enzymatic hydrolysis was performed with the 10% takadiastase on 45 °C within four hours. Ten samples of liver paste from the supply of the

Serbian Army were examined. Separation was performed on the analytical column Nucleosil 50–5 C18 with mobile phase 450 ml CH₃OH + 20 ml 5 mM CH₃COONH₄, and detection on the fluorescent detector with the variable wave length. Both methods were validated: examining a detection limit, quantification limit, specificity (because of a possible B₂ vitamin interference with reagents), linearity of a peak area and standard concentration of B₂ vitamin ratio in the range from 0.05 µg/ml to 2 µg/ml, precision for the 0.05 µg/ml concentration and recovery. **Results.** All the previously examined parameters validated both methods as specific, precise and reproducible, with a high recovery (98.5% for acid and 98.2% for acid - enzymatic hydrolysis), as well as linearity in a range that significantly superseded the expected content in the samples ($r = 0.9994$, and $r = 0.99987$). Hydrolysis procedures make a sample suitable for vitamin

B₂ determination. In the liver paste samples a high content of vitamin B₂ was determined: 0.83 mg/100 g after acid hydrolysis, and 0.909 mg/100 g after acid-enzyme hydrolysis. There were statistically significantly higher values determined after the acid-enzyme hydrolysis ($p < 0.05$). **Conclusion.** Using acid-enzyme hydrolysis and separation instrument technique (liquid chromatography) with a fluorescent detector as detection system, statistically significantly greater vitamin B₂ quantities were determined than after using acid hydrolysis procedure. Vitamin B₂ content determined in ten liver paste samples was high (0.881 – 0.936 mg/100g) indicating that this meat product is a good vitamin B₂ source.

Key words:
riboflavin; meat product; hydrolysis; chromatography, high pressure liquid; evaluation studies.

Uvod

Pravilna ishrana i način života osnova su dobrog zdravlja, počev od prenatalnog perioda. Veliki broj publikovanih radova o vitaminima nastao je kao rezultat neiscrpnih pitanja o mehanizmima njihovog dejstva, potrebnim količinama za ljude različite starosti i načina života, kao i da li ih treba unositi hranom ili tabletama¹⁻³. Preventiva ima veliki značaj za dobro zdravlje, što je i zahtev koji se postavlja pred vojnu preventivu. Mnoge razvijene zemlje ustanovile su nutricionere standarde za očuvanje zdrave populacije, bazirane na preporukama Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (SZO). U cilju optimalnog unosa vitamina Nacionalna akademija nauka SAD izdala je *Recommended Dietary Allowances* (RDA) tabele⁴, koje sadrže preporučeni dnevni unos vitamina i minerala i koriste se kao osnova za podatke o potrebama za njima⁵.

Vitamin B₂ (riboflavin) izolovan je 1933. godine iz kvasca. Prirodno se nalazi u biljnom i životinjskom svetu i bakterijama, u slobodnom i vezanom obliku. Vezani oblik su enzimi flavoproteini i to su njegovi aktivni oblici. To su specifični proteini koji kao koenzime sadrže flavin mononukleotid (FMN) i flavin adenin dinukleotid (FAD). Strukturno, dve konjugovane dvogube veze, u drugom i trećem prstenu riboflavina, između dva azotova atoma, lako vezuju dva vodonikova atoma odnosno elektrona i isto tako lako ih otpuštaju. Riboflavin, tako, u oblicima u kojima se nalazi u prirodi predstavlja važan redoks sistem⁶.

Deficit vitamina B₂ moguć je usled neishranjenosti, bolesti, primene nekih lekova, endokrinih abnormalnosti, alkoholizma i dejstva antivitaminata (izoriboflavina)⁷⁻¹⁰. Biološka vrednost namirnica može biti povećana dodavanjem vitamina ili smanjena zbog lošeg kvaliteta sirovina, upotrebe nekih aditiva, kontaminacije tokom prerade sirovina, kao i loše tehnologije¹¹⁻¹³. Izvor B vitamina su cela zrna žitarica, pivarski kvasac i jetra. Preradom sirovina u prehrambenoj industriji ili u domaćinstvu u finalnom proizvodu namenjenom za ishranu može doći do redukcije vitamina¹⁴. Jetrena pašteta sastavni je deo ishrane dece, zaposlenih i starih osoba ali i pripadnika vojske, kako u redovnim, tako i u vanrednim

uslovima. Za pravilnu izradu dijeta neophodno je određivanje sadržaja vitamina u obroku.

Za određivanje ukupnog sadržaja riboflavina u namirnicama potrebno je primeniti niz postupaka. Po oficinalnim *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) metodama¹⁵ za izolovanje riboflavina iz proizvoda od žita treba primeniti samo kiselu hidrolizu na povišenoj temperaturi i pritisku. U daljem postupku, potrebno je primeniti prečišćavanje preko različitih aktivnih smola. Mnogi autori koriste principe AOAC metoda, prilagođavajući ih konkretnim uzorcima, tako što primenjuju različite kiseline, enzime, temperaturu, vreme izlaganja pojedinim reagensima, kao i načine prečišćavanja analita¹⁶⁻²¹. Vitamin B₂ ima osobinu prirodne fluorescencije, zbog čega je fluorimetrija oficinalna detekciona metoda za ovaj vitamin. Kombinacijom separacione instrumentalne tehnike za razdvajanje (tečna hromatografija) sa fluorescentnim detektorom kao detekcionim sistemom postižu se optimalni uslovi za pouzdanu kvantifikaciju uz dovoljnu osetljivost^{7, 18, 19, 22, 23}.

Cilj rada bio je upoređivanje efikasnosti dve ekstrakcione metode kisele i kiselo-enzimske hidrolize, u određivanju sadržaja vitamina B₂ u jetrenoj pašteti.

Metode

Ispitivanje je vršeno na deset uzoraka jetrene paštete, iste serije, iz namenske proizvodnje za potrebe Vojske Srbije. Konzerve su bile hermetički zatvorene, neto mase 150 g i roka upotrebe četiri godine. Uzorci su upakovani u limenke koje odgovaraju kvalitetu propisanom Standardom odbrane, SNO 5884/98, „Sl. vojni list“ br. 19/98. Ovim standardom propisuje se: kvalitet i količinski odnos sirovina i dodataka koji se koriste za proizvodnju konzerve jetrene paštete u limenci od 150 g neto mase, za potrebe Vojske Srbije, kvalitet ambalaže, osnovna obeležja tehnološkog procesa, kvalitet gotovog proizvoda, kvalitativan i kvantitativan prijem i garantni rok, radi obezbeđenja standardnog kvaliteta proizvoda.

Za analizu korišćena je standardna supstancija: Riboflavin (Sigma Co, St Louis, MO, USA), od koje su pripremani rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifi-

kacije (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 2,00 $\mu\text{g/ml}$). Čistoća upotrebljenih organskih rastvarača bila je potvrđena metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) (Merck, Darmstadt, Germany), kao i čistoća vode (sistemska dobijena demineralizovana voda prečišćena na komercijalnom „Millipore Milli-Q“ sistemu), takadiastaze (Fluka), a ostale hemikalije imale su čistoću za analizu (p.a.).

Pored uobičajene laboratorijske opreme, primenjen je HPLC sistem, kao i uslovi merenja:

Pumpa:	Waters M600 E, izokratsko eluiranje
Injektor:	Rheodyne 7125, petlja 20 μl
Analitička kolona:	Nucleosil 50–5 C18
Detektor:	RF-535 Shimadzu, Fluorescence HPLC monitor
Mobilna faza:	450 ml CH_3OH + 620 ml 5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$
Protok:	0,8 ml/min
Temperatura kolone:	$\sim 20^\circ\text{C}$
Talasne dužine:	$\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$
Aktivacija/obrada podataka:	Shimadzu C-R4A CHROMATOPAC

Određivanje sadržaja vitamina B₂ u jetrenoj pašteti vršeno je metodom standardne krive.

Dijagrami zavisnosti površine pikova od koncentracije riboflavina određivani su za koncentracije: 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 i 2,00 $\mu\text{g/ml}$, nakon što su podvrgnuti celokupnom postupku kisele, odnosno kiselo-enzimske hidrolize. Vrednost površine pika za svaku koncentraciju je predstavljala srednju vrednost četiri uzastopna merenja. Preciznost HPLC metode za određivanje vitamina B₂, za oba postupka hidrolize ispitivana 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 B₂ za koncentraciju 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Za oba postupka pripreme uzoraka mereno je po 5 g homogenizovanog uzorka (jedne serije), preneto u erlenmajer-tikvicu od 100 ml, preliveno sa 50 ml 0,1 M HCl, a zatim autoklavirano 30 minuta na 120 $^\circ\text{C}$. Tako tretirani uzorak je zatim ohlađen, a pH vrednost sadržaja podešavana rastvorom CH_3COONa na 4,5. Tu se završavala kiselna hidroliza i ekstrakcija vitamina u polovini uzoraka. Enzimski hidroliza sprovedena je na drugoj polovini uzoraka, nakon sprovedene kisele hidrolize. U tikvicu je dodavano 5 ml vodenog rastvora takadiastaze, dobro promućkano, a zatim inkubirano četiri sata na temperaturi od 45 $^\circ\text{C}$. Enzimski hidroliza je prekidana dodavanjem rastvora CCl_3COOH , uz zagrevanje u vodenom kupatilu. Sadržaj je ohlađen i rastvorom CH_3COONa pH ponovo podešavana na 4,5. Nakon kisele, odnosno enzimske hidrolize, sadržaj je prenošen u odmernu tikvicu od 100 ml. Sud je dopunjavao vodom do oznake, a zatim filtriran kroz membranski filter posle čega je bio spreman za analizu sadržaja vitamina B₂. Svako merenje bilo je četvorostruko. Poređenjem sadržaja vitamina B₂ u jetrenoj pašteti dobijenih primenom kisele i kiselo-enzimske

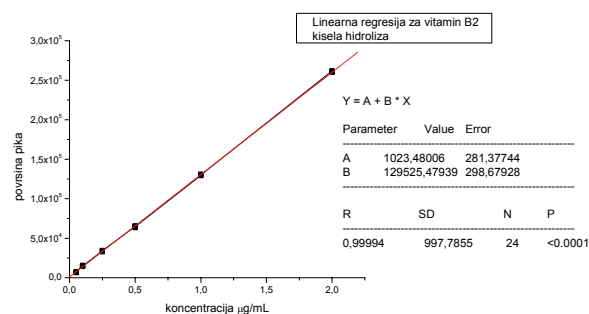
hidrolize, može se odrediti koja metoda pripreme ima veći prinos, a statističkom obradom rezultata da li je ta razlika značajna.

U cilju procene ujednačenosti kvaliteta proizvoda izvršeno je određivanje sadržaja vitamina B₂ u deset različitih serija jetrene paštete istog proizvođača.

Rezultati

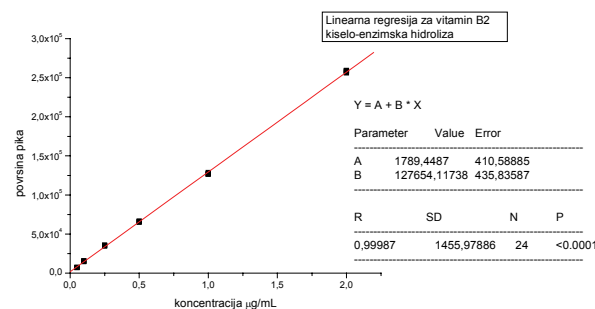
Određeni su limit detekcije i limit kvantifikacije, koji iznose 0,03 $\mu\text{g/ml}$ odnosno 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Linearnost odnosa koncentracija i površina odgovarajućih pikova određena je analizom šest standardnih rastvora vitamina B₂ koncentracija 0,05–2,0 $\mu\text{g/ml}$, koji su podvrgnuti postupcima kisele i kiselo-enzimske hidrolize. Tačke za kalibracionu krivu dobijene su kao rezultati četiri injiciranja za svaku koncentraciju.

Prikazane su standardne krive za vitamin B₂, kao i jednačine pravih za oba postupka hidrolize (slike 1 i 2).



n – broj injiciranja; SD – standardna devijacija

Sl. 1 – Kalibraciona kriva vitamina B₂ nakon kisele hidrolize

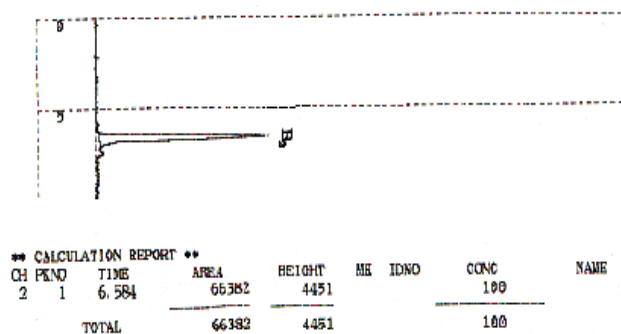


n – broj injiciranja; SD – standardna devijacija

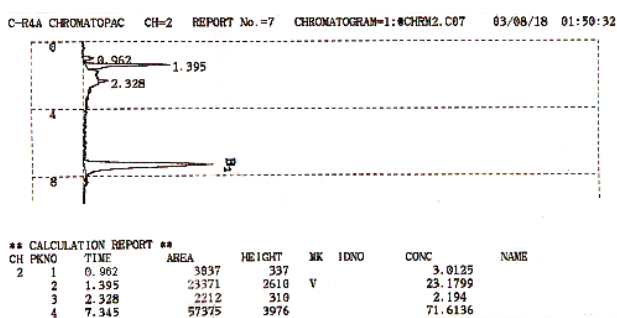
Sl. 2 – Kalibraciona kriva vitamina B₂ nakon kiselo-enzimske hidrolize

Reproduktivnost je ispitana primenom obe metode hidrolize na uzorak jetrene paštete nastao homogenizacijom deset uzoraka paštete iste serije. Hromatogram standarda vitamina B₂ nakon kiselo-enzimske hidrolize i hromatogram vitamina B₂ nakon kiselo-enzimske hidrolize jetrene paštete prikazani su na slikama 3 i 4. Izvršeno je po deset određivanja postupkom kisele, odnosno kiselo-enzimske hidrolize i izračunate srednje vrednosti koncentracija vitamina u rastvorima pripre-

mljenih uzoraka ($\bar{x} \pm SD$): $0,4149 \pm 0,00978 \mu\text{g/ml}$, odnosno $0,4544 \pm 0,00955 \mu\text{g/ml}$. Nađene vrednosti pripadaju srednjem delu kalibracione krive, što znači da je opseg krive bio pogodan za analizu. Izračunate su vrednosti sadržaja riboflavina u jetrenoj pašteti i statistički obrađene Studentovim t -testom. Sadržaj vitamina B₂ nakon određivanja postupkom kisele hidrolize bio je $0,830 \text{ mg/100 g}$, odnosno $0,909 \text{ mg/100 g}$ nakon kiselo-enzimske hidrolize jetrene paštete jedne serije. Svi rezultati i statistički parametri prikazani su u tabeli 1.



Sl. 3 – Hromatogram standarda vitamina B₂ nakon kiselo-enzimske hidrolize



Sl. 4 – Hromatogram vitamina B₂ nakon kiselo-enzimske hidrolize jetrene paštete

Tabela 1

Sadržaj vitamina B₂ određen nakon kisele i kiselo-enzimske hidrolize jetrene paštete

Uzorak (n = 10)	Nakon kisele hidrolize	Nakon kiselo-enzimske hidrolize
Prosečan sadržaj (mg/100 g)	0,830	0,909
SD	0,01956	0,0191
p	< 0,05	

Diskusija

Pretpostavka da je primena i kisele i enzimske hidrolize teoretski opravdana, proveravana je određivanjem prinosa metode analizom standardnih dodataka vitamina. U nekim studijama se izveštava samo o prinosu metode primenjene na standardne rastvore^{16–19,23}. Međutim, ne može se izvršiti ap-

roksimacija rezultata dobijenih analizom standardnih dodataka i prirodnog sadržaja vitamina. Poseban aspekt je neosporna razlika između žive ćelije i tkiva nastalog nakon tehnološkog postupka prerade u konkretnu namirnicu.

Primenom potvrđenih metoda na ispitivanu namirnicu i poređenjem prinosa metoda možemo vršiti procenu pogodnosti metode za određivanje ukupnog sadržaja vitamina.

Vitamin B₂ prisutan je u različitom obliku u namirnicama biljnog i životinjskog porekla. Metode se prilagođavaju konkretnim uzorcima, uz eksperimentisanje različitim parametrima (uticaj različitih kiselina, različitih temperatura, različitih enzima), dužinom izlaganja pojedinim parametrima, kao i postupcima prečišćavanja^{16–21}. Sa razvojem separacionih tehnika najčešće se pominje tečna hromatografija sa različitim detekcionim sistemima: ultravioletni (UV) detektor za obogaćene namirnice i farmaceutske preparate^{24–26}, a fluorescentni detektor za pojedinačne vitamine^{7, 17–19, 22} uz upotrebu različitih mobilnih faza i separacionih kolona.

Za određivanje vitamina B₂ u jetrenoj pašteti primenjena je reverzno-fazna HPLC metoda sa fluorescentnom detekcijom, nakon kisele i kiselo-enzimske hidrolize uzorka radi utvrđivanja opravdanosti postupka enzimske hidrolize.

Neophodno je bilo prethodno izvršiti validaciju obe metode ekstrakcije. Ispitivanjem limita detekcije i limita kvantifikacije određene su koncentracije koje su bile nekoliko puta manje od očekivanih koncentracija vitamina u uzorcima jetrene paštete nakon hidrolize, a to je preduslov za dobru osetljivost metode. Obe metode su specifične, jer na hromatogramima ne postoje interferencije vitamina sa reagensima. Postoji linearnost odnosa površine pika i koncentracije za standardne rastvore vitamina B₂ za obe metode u rasponu od $0,05$ – $2,0 \mu\text{g/ml}$, a to je opseg koji značajno nadmašuje potrebe određivanja sadržaja vitamina u uzorcima jetrene paštete. Jednačine pravih mogu se primeniti za određivanje koncentracije vitamina, nakon očitavanja površine pika ($r = 0,99994$, odnosno $r = 0,99987$). Preciznost obe metode ispitivana je za koncentraciju od $0,5 \mu\text{g/ml}$ vitamina. Mala vrednost relativne SD pokazuje dobru preciznost obe metode. Takođe, ne postoji statistički značajna razlika između dva načina ekstrakcije ($p > 0,05$).

Analitički prinos metode veoma je važan parametar koji govori o mogućim gubicima ispitivane supstancije u toku pripreme uzoraka za određivanje. Vrednosti površina pikova analiziranih vitamina nakon sprovedena oba postupka hidrolize upoređene su sa vrednostima koje potiču od standardnih rastvora vitamina. Visok procenat za reproduktivnost potvrđuje visok analitički prinos obe metode. Reproductivnost je određena na standardnim rastvorima, a ne na standardnim dodacima, jer su u oba slučaja na proveru standardne supstance, a ne vitamini u svom biološki aktivnom obliku.

Svi prethodno ispitani parametri potvrđuju obe metode kao specifične, precizne i reproduktivne za standardne supstance i između njih ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Kao takve primenjene su za određivanje sadržaja vitamina B₂ u jetrenoj pašteti. Oba postupka hidrolize dovođe uzorak u stanje pogodno za određivanje vitamina B₂, bez interferirajućih jedinjenja na hromatogramu. Fluorometrijski uslovi za određivanje vitamina B₂ su tako specifični da su

hromatogrami skoro identični hromatogramima standardnih rastvora (slike 3 i 4). Razlika između određenih koncentracija vitamina nakon kisele i kiselo-enzimske hidrolize jetrene paštete postoji i ona je statistički značajna ($p < 0,05$). Određen je značajno veći sadržaj vitamina B₂ nakon primene kiselo-enzimske hidrolize, što potvrđuje da se i nakon primenjene visoke temperature, hemijskih i mehaničkih postupaka u proizvodnji jetrene paštete jedan deo riboflavina nalazi u obliku koenzima (FMN i FAD) i da je za njihovo oslobađanje i detekciju potrebno primeniti i enzimsku hidrolizu.

Primenom kiselo-enzimske metode ekstrakcije određen je sadržaj vitamina B₂ u deset serija uzoraka jetrene paštete. Dobijene vrednosti vrlo su bliske i govore da je ovaj proizvod od mesa dobar izvor vitamina B₂, da je kvalitet sirovina ujednačen i da se proizvodnja odvija po standardnoj proceduri.

Zaključak

Na osnovu izvršene validacije kisele i kiselo-enzimske ekstrakcije vitamina B₂ u jetrenoj pašteti zaključeno je da su obe metode ekstrakcije specifične, precizne i reproduktivne za standardne supstancije. Oba postupka hidrolize dovode uzorak u stanje pogodno za određivanje sadržaja vitamina B₂.

Postupkom kiselo-enzimske hidrolize i kombinacijom separacione instrumentalne tehnike za razdvajanje (tečna hromatografija) sa fluorescentnim detektorom kao detekcionim sistemom, određen je statistički značajno viši sadržaj vitamina B₂ u jetrenoj pašteti nego postupkom kisele hidrolize, što znači da se njenom primenom dobija realnija informacija o sadržaju vitamina u ovom proizvodu od mesa.

L I T E R A T U R A

1. *Cashman KD*. Homocysteine and osteoporotic fracture risk: a potential role for B vitamins. *Nutr Rev* 2005; 63(1): 29–36.
2. *de Bree A, Mennen LI, Herberg S, Galan P*. Evidence for a protective (synergistic?) effect of B-vitamins and omega-3 fatty acids on cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58(5): 732–44.
3. *Krapels IP, van Rooij LA, Ocke MC, van Cleef BA, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP*. Maternal dietary B vitamin intake, other than folate, and the association with orofacial cleft in the offspring. *Eur J Nutr* 2004; 43(1): 7–14.
4. National Research Council. Committee on Dietary Allowances. Recommended Dietary Allowances. 10th Edition. Food and Nutrition Board, Washington: National Academy of Sciences; 1989.
5. *Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes*. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin and Choline. Washington: National Academy Press; 2000.
6. *Wilhelm F*. Vitamins. Berlin: Walter de Gruyter; 1988.
7. *Ball GF*. Vitamins in Foods Analysis, bioavailability, and stability. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis; 2006.
8. *Tamura T, Turnlund JR*. Effect of long-term, high-copper intake on the concentrations of plasma homocysteine and B vitamins in young men. *Nutrition* 2004; 20(9): 757–9.
9. *Erstigneev MP, Erstigneev VP, Santiago AA, Davies DB*. Effect of a mixture of caffeine and nicotinamide on the solubility of vitamin (B₂) in aqueous solution. *Eur J Pharm Sci* 2006; 28(1–2): 59–66.
10. *Roth HJ, Eger K, Troschütz R*. Drug Analysis. In: *Roth HJ, Troschütz R, editors*. Pharmaceutical Chemistry. New York: Ellis Horwood; 1991.
11. *Troeger K*. Standardisierung von Bedingungen und Prozessen bei der Fleischgewinnung und –verarbeitung mit Relevanz für die Qualität und Sicherheit der Produkte. *Tehnologija mesa* 2003. 44(3–4): 105–16.
12. *Montenegro MA, Nunes IL, Mercadante AZ, Borsarelli CD*. Photoprotection of vitamins in skimmed milk by an aqueous soluble lycopene-gum Arabic microcapsule. *J Agric Food Chem* 2007; 55(2): 323–9.
13. *Radovanović R*. Analysis of differences and the critical control point (HACCP): possibilities or obligations in foodstuff production procedures. *Hrana i ishrana* 2002; 44(3–4): 105–16. (Serbian)
14. *Lombardi-Boccia G, Lanzì S, Lucarini M, Di Lullo G*. Meat and meat products consumption in Italy: contribution to trace elements, heme iron and selected B vitamins supply. *Int J Vitam Nutr Res* 2004; 74(4): 247–51.
15. *AOAC*. Official Methodes of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington: AOAC International; 1995.
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. *Ndaw S, Bergaentzle M, Aoude WD, Hasselmann C*. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. *Food Chemistry* 2000; 71(1): 129–38.
18. *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 A* 2003; 1007(1–2): 77–84.
19. *Albala-Hurtado S, Veciana-Nogues MT, Izquierdo-Pulido M, Marine-Font A*. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1997; 778(1–2): 247–53.
20. *Basić Z, Maksimović M, Jakonljević Lj, Obradović G*. The thiamin, riboflavin and pyridoxine contents in Yugoslav wines. In: *Lasztity R, Pfannhauser W, Simon-Sarkadi Z, Tomoskozi S, editors*. Proceedings of Euro Food Chem X, FECS-Event No. 234; 22–24 September 1999; Budapest: Publishing Company TUB; p. 917–21.
21. *Basić Z, Ražić S*. Water-soluble vitamins determination in biscuits containing dried fruit using HPLC method. *Arhiv za farmaciju* 2002; 4: 742–3. (Serbian)
22. *Konings EJ; Committee on Food Nutrition*. Water-soluble vitamins. *J AOAC Int* 2006; 89(1): 285–8.
23. *Midttun O, Hustad S, Solheim E, Schneede J, Ueland PM*. Multi-analyte quantification of vitamin B₆ and B₂ species in the nanomolar range in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51(7): 1206–16.
24. *Chen P, Wolf WR*. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(7): 2441–8.
25. *Markopoulou CK, Kagkadis KA, Koundourellis JE*. An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B₁, B₆, B₁₂ in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30(4): 1403–10.
26. *Holler U, Brodbag C, Knobel A, Hofmann P, Spitzger V*. Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversed-phase (RP-18) HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31(1): 151–8.

Rad je primljen 24. IV 2007.