

*Barbara Bobrowska-Korczak, Dorota Skrajnowska, M. Baran,  
Andrzej Tokarz, Regina Olędzka*

## OZNACZANIE WITAMIN Z GRUPY B W MLEKU

Zakład Bromatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Kierownik: dr hab. *A. Tokarz*

*Celem badań była walidacja metody HPLC z detekcją UV oznaczania witamin z grupy B: tiaminy, ryboflawiny, niacyny, pirydoksalu, pirydoksyny, pirydoksaminy w mleku. Poszukiwano metody pozwalającej na szybkie, proste i łączne oznaczanie w/w związków. Na podstawie przeprowadzonej walidacji metody stwierdzono przydatność w/w metody do oznaczania witamin z grupy B. Ze względu na ograniczoną ilość publikacji na temat zawartości witamin w mleku i mieszankach mlecznych dla niemowląt istnieje potrzeba oznaczania witamin z grupy B w powyższych produktach.*

Hasła kluczowe: witaminy B, mleko, walidacja, HPLC  
Key words: vitamins B, milk, validation, HPLC

Witaminy są niezbędnymi składnikami żywności, które obok białek, tłuszczów, węglowodanów i składników mineralnych zapewniają prawidłowe funkcjonowanie naszego organizmu. Mają one wpływ na szereg procesów zachodzących w organizmach żywych, takich jak: rozwój, wzrost czy rozmnażanie (1). Brak lub częściowy niedobór witamin w pożywieniu może stać się przyczyną charakterystycznych stanów niedoborowych i chorób. Wśród objawów chorobowych spowodowanych niedoborem witamin rozpuszczalnych w wodzie są: choroba beri-beri (przy niedoborze B1), zapalenie języka, zajady, łojotok, światłowstręt (niedobór B2), pelagra (niedobór niacyny) (1–3). Ze względu na tak ważną rolę witamin w funkcjonowaniu naszego organizmu, ich zawartość powinna być badana, szczególnie w produktach codziennego spożycia tj. jak mleko (4,5). Celem badań była walidacja metody HPLC z detekcją UV oznaczania witamin z grupy B: tiaminy, ryboflawiny, niacyny, pirydoksalu, pirydoksyny, pirydoksaminy w mleku. Poszukiwano metody pozwalającej na szybkie, proste i łączne oznaczanie w/w związków.

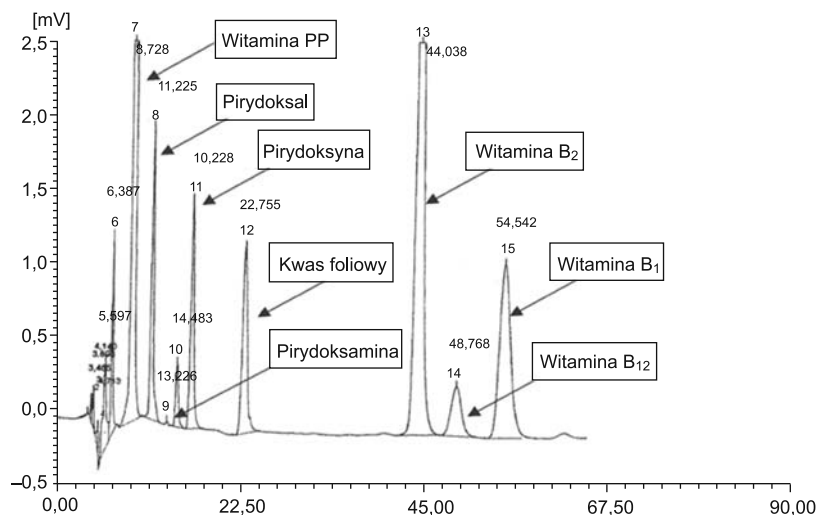
### MATERIAŁ I METODY

Analizę ilością w/w związków przeprowadzono w oparciu o metodykę opracowaną przez *Albala-Hurtado* i wsp. (6) z kilkoma własnymi modyfikacjami. Zawartość poszczególnych witamin oznaczano metodą HPLC z detekcją UV. Rozdział analizy przebiegał na kolumnie: Nucleosil 100-C18/5  $\mu\text{m}$  firmy Macherey-Nagel, Niemcy. Elucja prowadzona była w warunkach izokratycznych, do badań zastosowano fazę ruchomą o  $\text{pH} = 3,6 \pm 0,1$  i następującym składzie: octanosulfonian sodu (1,17 g/l),

trietyloamina 0,5%, kwas octowy 2,4%, metanol 12%. Analizę chromatograficzną wykonano przy przepływie 0,6 ml/min. i temperaturze kolumny 30°C. Długość fali  $\lambda_{max}$  dla poszczególnych witamin zmieniała się w czasie i wynosiła: dla witaminy PP 261 nm, pirydoksalu 287 nm, pirydoksaminy i pirydoksyny 290 nm, witaminy B2 268 nm, witaminy B1 246 nm. Przykładowy chromatogram rozdzielania witamin przedstawiono na rycinie 1. Zgodnie z metodyką opracowaną przez *Albala-Hurtado* i wsp. (6) w celu wyizolowania witamin z ich połączeń z matrycą zastosowano hydrolizę kwaśną. Poziom fortyfikacji poszczególnych witamin wynosił: dla pirydoksalu 0,01 mg/10 ml, pirydoksaminy 0,01 mg/10 ml, pirydoksyny 0,01 mg/10ml, witaminy PP 0,037 mg/10 ml, witaminy B2 0,08 mg/10 ml, witaminy B1 0,027 mg/10 ml. Zwalidowaną metodę wykorzystano do oznaczenia zawartości witamin z grupy B w wybranych rodzajach mleka zakupionych w sklepach na terenie Warszawy.

### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Oznaczenie zawartości witamin z grupy B dokonano przy użyciu techniki wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV. W celu sprawdzenia powyższej metody wykonano jej walidację na roztworach wzorcowych wybranych witamin z grupy B. Przeprowadzono oznaczanie poszczególnych parametrów walidacji: precyzji (powtarzalności, odtwarzalności), liniowości, granicy wykrywalności i oznaczalności.



Ryc. 1. Przykładowy chromatogram rozdzielania witamin z grupy B w roztworze wodnym.

Fig. 1. Chromatogram of separation of B-vitamins diluted in water.

Po przeprowadzeniu oceny liniowości dla wzorców witamin z grupy B stwierdzono, że uzyskane funkcje mają przebieg prostoliniowy i są rosnące w wybranym zakresie stężeń. Stężenia witamin wybrane do oznaczania liniowości są wprost proporcjonalne do uzyskanych wartości sygnału. Wyniki wartości współczynników ko-

relacji ( $R^2$ ) przedstawiono w tabeli Ia. Współczynniki zmienności powtarzalności metody mieściły się w przedziale 0,57–1,24% (tabela Ia). Współczynniki zmienności odtwarzalności metody zawierały się w przedziale 0,19–3,32% (tabela Ia). Względne odchylenia standardowe (współczynniki zmienności) dla precyzji metody są zadowalające i wynoszą poniżej 10% (7). Określono granice wykrywalności i oznaczalności metody. Granica wykrywalności dla badanych witamin z grupy B wynosiła: 0,025 mg/l dla pirydoksalu, pirydoksyny, 0,05 mg/ml dla pirydoksaminy, niacyny, tiaminy i ryboflawiny (tabela Ia). W celu sprawdzenia przydatności metody do oznaczania witamin z grupy B wykonano odzysk z roztworów wzorcowych witamin. Odzysk fortyfikacji mieścił się w granicach 80–98% dla poszczególnych witamin (tabela Ia). Najniższy wynik uzyskano dla niacyny (80%), a najwyższy dla pirydoksyny i pirydoksaminy (98%). Odzysk metody dla poszczególnych próbek mleka był w zakresie 61–91% (tabela Ib).

Dane dotyczące oznaczeń poszczególnych witamin w wybranych rodzajach mleka przedstawiono w tabeli Ic. Zawartość witamin jest porównywalna z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (8,9,10). *Ganowiak* i wsp. (8), badając zawartość witaminy B2 w mleku pasteryzowanym zawierającym 2% tłuszczu, uzyskali wartość 0,147 mg/100g produktu. Zgodnie z danymi przedstawionymi przez *Wszolek* (9) zawartość poszczególnych witamin z grupy B w mleku wynosiła: witaminy B1 0,04 mg/100g, witaminy B2 0,16 mg/100g, witaminy B6 0,04 mg/100g.

Tabela I. Parametry walidacji metody HPLC UV oznaczania witamin z grupy B

Table I. Validation parameters of the HPLC UV method for determination of B-vitamins

a) Wyznaczenie poszczególnych parametrów walidacji metody na roztworach wzorcowych witamin z grupy B.

Rodzaj witaminy	Parametry walidacji metody				
	współczynnik korelacji	powtarzalność metody (CV%)	odtwarzalność metody (CV%)	granica wykrywalności (QL) [mg/l]	odzysk fortyfikacji (%)
Wit. PP	1	0,57	0,55	0,05	80
B6-al	1	1,05	1,52	0,025	98
B6amina	0,9999	0,93	0,19	0,05	
B6yna	0,9997	1,24	0,98	0,025	
Wit. B2	0,9998	0,65	1,52	0,05	92
Wit. B1	0,9999	1,15	3,32	0,05	94

b) Wartość odzysku metody wobec mleka z dodatkiem roztworów wzorcowych witamin z grupy B.

Rodzaj witaminy	Wartość odzysku [%]			
	mleko spożywcze pasteryzowane 2% tłuszczu	mleko UHT 2% tłuszczu	mleko UHT 3,2% tłuszczu	mleko pobrane bezpośrednio z gospodarstwa wiejskiego
Wit. PP	70	79	74	65
B6-al	70	90	91	72
B6amina	70	-	88	69
B6yna		86	83	-
Wit. B2	88	-	-	61
Wit. B1	76	72	79	67

c) Zawartość witamin z grupy B w wybranych rodzajach mleka zakupionych w sklepach w Warszawie.

Rodzaj witaminy	Zawartość witamin [mg/100g]			
	mleko spożywcze pasteryzowane 2% tłuszczu (n=5)	mleko UHT 2% tłuszczu (n=5)	mleko UHT 3,2% tłuszczu (n=5)	mleko pobrane bezpośrednio z gospodarstwa wiejskiego (n=5)
Wit. PP	0,117±0,01	0,054±0,005	0,022±0,002	0,131±0,01
B6-al	0,176±0,002	0,124±0,003	0,093±0,002	0,082±0,003
B6amina	0,056±0,004	–	0,009±0,003	0,027±0,0007
B6yna		0,005±0,0004	0,004±0,0002	
Wit. B2	0,144±0,002	–	–	0,247±0,006
Wit. B1	0,011±0,0004	0,018±0,0008	0,024±0,003	0,033±0,023

## WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonej walidacji metody stwierdzono przydatność metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV do oznaczania witamin z grupy B: tiaminy, ryboflawiny, pirydoksalu, pirydoksyny, pirydoksaminy i witaminy PP.
2. Zawartości w mleku witamin oznaczanych metodą HPLC z detekcją UV są porównywalne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

B. Bobrowska-Korczak, D. Skrajnowska, M. Baran, A. Tokarz, R. Olędzka

## DETERMINATION OF B-VITAMINS IN MILK

### Summary

The aim of the study was to validate a simple, fast UV-HPLC method for the determination of thiamine, riboflavin, pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine, nicotinamide in milk. The method offers satisfactory specificity, precision and accuracy. The limited available publications suggest that more data are needed regarding the determination of B-vitamins in milk and milk products.

### PIŚMIENNICTWO

1. *Moszczyński P., Pyć R.*: Biochemia witamin, witaminy i koenzymy. Część I, Warszawa, 1999. – 2. *Gertig H., Przysławski J.*: Bromatologia Zarys nauki o żywności i żywieniu. PZWL, Warszawa, 2006. – 3. *Tokarz A.*: Skrypt do ćwiczeń z bromatologii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego WUM. Warszawa, 2011. – 4. *Jarosz M., Bulhak-Jachymczyk B.*: Normy żywienia człowieka, PZWL, Warszawa, 2008. – 5. *Wądołowska L.*: Mleko w żywieniu ludzi dorosłych w świetle współczesnych zaleceń żywieniowych. *Prz. Mlecz.*, 2000; 8; 244–246. – 6. *Albala-Hurtado S., Veciana-Nogues T., Izquierdo-Pulido M., Marine Fond A.*: Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1997; 778: 247–253. – 7. *Konieczka P., Namieśnik J.*: Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. WNT, Warszawa, 2007. – 8. *Ganowniak Z., Gajewska R., Wituszyńska B., Nabrzyński M.*: Ocena higieniczna i skład chemiczny mleka spożywczego i utrwalonego metodą UHT (Ultra High Temperature). *Brom. Chem. Toksykol.*, 1995; 28: 301–305. – 9. *Wszolek M.*: Wartość odżywcza, właściwości fizykochemiczne i biologiczne składników mleka koziego. *Nowa Med.*, 1997; 9: 41–48. – 10. *Asadullah, Khair-un-nisa, Tarar O.M., Ali S.A., Jamil K., Begum A.*: Study to evaluate the impact of heat treatment on water soluble vitamins in milk. *J. Pak. Med. Assoc.*, 2010, 60(11), 909-912.

Adres: ul. Banacha 1, 01-091 Warszawa