

**ОДРЕЂИВАЊЕ САДРЖАЈА ВИТАМИНА Б1, Б2, Б3 И Б6  
У ДИЈЕТЕТСКИМ СУПЛЕМЕНТИМА**

Маргарита С. Додевска,<sup>1</sup> Милан Миленковић,<sup>1</sup> Татјана Недељковић,<sup>1</sup> Биљана Трипковић,<sup>1</sup>  
Зорица Благојевић,<sup>1</sup> Верица Јовановић<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“

**DETERMINATION OF CONTENT OF VITAMINS B1, B2, B3 AND B6  
IN DIETARY SUPPLEMENTS**

Margarita S. Dodevska,<sup>1</sup> Milan Milenković,<sup>1</sup> Tatjana Nedeljković,<sup>1</sup> Biljana Tripković,<sup>1</sup>  
Zorica Blagojević,<sup>1</sup> Verica Jovanović<sup>1</sup>

Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut”

**Сажетак**

Употреба дијететских суплемената је веома распрострањена и стално се повећава. Витамини групе Б су једни од најчешће коришћених дијететских суплемената, јер фактори попут старости, трудноће, успореног рада тироидне жлезде, анорексије, генетских фактора, употребе лекова и алкохола повећавају потребе за витаминима групе Б. С обзиром да горепоменута стања захтевају суплементацију, неопходно је да дијететски суплементи садрже количине које су назначене на паковању. Зато је потребно проверавати њихов квалитет, тј. количине активних састојака витамина групе Б у дијететским суплементима, да би се утврдило да ли добијене вредности одговарају декларисаним. Витамини Б1, Б2, Б3 и Б6 су важне компоненте у групи Б-комплекса. У овом раду садржај витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 је одређиван у узорцима 29 различитих дијететских суплемената који се налазе на тржишту Републике Србије, HPLC-DAD методом уз градијентно елуирање. Добијени резултати су показали да од свих испитаних узорака, 86,2% одговара декларисаним вредностима за сва четири витамина групе Б. Вредности за витамин Б3 биле су у складу са декларисаним код свих анализираних суплемената, а од осталих анализираних витамина витамин Б1 је код 89,7% суплемената испуњавао захтеве декларисања, док је садржај активне супстанце витамина Б2 и Б6 био у декларисаним границама код 93,1% испитаних дијететских суплемената. Студије овог типа је неопходно проширити на већи број узорака јер се провером декларације, тј. одређивањем појединих активних компоненти које се налазе у суплементима, индиректно утиче на превенцију у оним групама популације којима је неопходна суплементација.

**Кључне речи:** витамини Б групе, дијететски суплементи, инстант напици, капсуле, HPLC-DAD

**Abstract**

Use of dietary supplements is very widespread and constantly on the rise. B-group vitamins are among the most frequently used dietary supplements since factors like age, pregnancy, impaired thyroid function, anorexia, genetic factors, use of medication and alcohol increase the needs for B-group vitamins. Given that the abovementioned conditions require supplementation it is necessary that dietary supplements contain the quantities specified on the labelling. It is thus necessary to test their quality i.e., the quantities of active ingredients belonging to B-group vitamins in dietary supplements to determine if the obtained values comply with the declared ones. Vitamins B1, B2, B3 and B6 are important components of the B-complex group. In this study the content of vitamins B1, B2, B3 and B6 was determined in the samples of 29 different dietary supplements present on the market of the Republic of Serbia, using HPLC-DAD method with gradient elution. Obtained results have shown that, of all tested samples, 86.2% comply with the declared values for all four B-group vitamins. Values for vitamin B3 were in accordance with the declared values in all tested supplements. Of other analysed vitamins, B1 fulfilled the declared requirements in 89.7% of samples, while the quantity of active substance of vitamins B2 and B6 was within declared limits in 93.1% of tested dietary supplements. It is necessary to expand this type of studies on a larger number of samples, since controlling the declaration i.e., determining the quantity of specific active components present in supplements indirectly impacts prevention in the population subgroups in need of supplementation.

**Key words:** B-group vitamins, dietary supplements, instant powders, capsules, HPLC-DAD.

**Увод**

„Додаци исхрани (дијететски суплементи) су храна која допуњује уобичајену исхрану, и која представља концентроване изворе хранљивих састојака или других састојака са хранљивим или физиолошким ефектом, појединачно или у комбинацији, а у промету се налазе у дозираним облицима као што су капсуле, пастиле, таблете и слично, кесице прашка, ампуле течности, бочице са капаљком, и осталим сличним облицима

**Introduction**

“Food supplements (dietary supplements) are foods that supplement regular nutrition and that represent concentrated sources of nutritional ingredients or other ingredients with nutritive or physiological effect, individually or in combination with other ingredients and are marketed in dosage forms such as capsules, pastilles, tablets etc., powder sachets, ampules with liquid, dropper bottles and other similar forms of liquid and powder intended for use in

течности и прашка намењеним за узимање у малим, дозираним количинама" [1].

Употреба дијететских суплемената се из године у годину повећава, јер све више људи тражи начине за одржавање доброг здравља и превенцију болести [2]. Управо су витамини и минерали, као есенцијални нутријенти, препознати као важни за одржавање „доброг здравља“ који су уједно и приступачни, па је и њихова употреба у виду суплемената, на светском и нашем тржишту, у сталном порасту [3]. У групи витаминских суплемената, витамини Б групе, због бројних физиолошких функција у које су укључени као коензими, заузимају значајно место.

За ове витамине је заједничко да су растворљиви у води и најчешће се налазе у истим дијетарним изворима. Неопходни су за нормално функционисање организма, учествују у реакцијама метаболизма угљених хидрата, протеина и масти, те производњи енергије, за одржавање нормалног срчаног рада, нормалне ћелијске деобе, али и нормалне активности нервног система [4, 5].

Витамини Б1, Б2, Б3 и Б6 су важне компоненте у групи Б-комплекса. Тиамин (витамин Б1) у свом активном облику, тиамин-пирофосфат (енгл. *Thiamine-pyrophosphate*, TPP), служи као кофактор неколико кључних ензима повезаних са метаболизмом угљених хидрата и аминокиселина разгранатог ланца. Такође, витамин Б1 је неопходан за бројне друге ћелијске процесе, нпр. синтезу прекурсора нуклеинских киселина, мијелина и неуротрансмитера (нпр. ацетилхолин), као и за антиоксидантну активност [6]. Витамин Б2 (рибофлавин, натријум-рибофлавин-5'-фосфат) је саставна компонента флавопротеина, флавин-моноклеотида (енгл. *Flavin-mononucleotide*, FMN) и флавин-аденин-динуклеотида (енгл. *Flavin-adenine-dinucleotide*, FAD), који су коензими дехидрогеназа у циклусу лимунске киселине и простетичне групе неколико флавопротеинских ензима који катализују оксидоредукционе процесе у ћелији. Витамин Б3 (никотинамид, никотинска киселина) улази у састав коензима никотинамид-аденин-динуклеотида (енгл. *Nicotinamide-adenine-dinucleotide*, NAD) и никотинамид-аденин-динуклеотид фосфата (*Nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate*, NADP), који учествује у метаболизму угљених хидрата, масти и протеина, као и у процесу ћелијског дисања. Витамин Б6 (пиридоксин-хидрохлорид, пиридоксин-5'-фосфат, пиридоксин-дипалмитат) учествује у практично свим реакцијама метаболизма аминокиселина, као и у синтези еритроцита, антитела и одржавању имуног система [4].

small quantities of specific dosage" [1].

Use of dietary supplements increases each year, since an increasing number of people are looking for ways to maintain good health and prevent disease [2]. It is exactly vitamins and minerals, as essential nutrients, which are recognised as important for maintaining "good" health and are affordable at the same time, hence their use as supplements is constantly on the rise on the domestic and global markets [3]. Among vitamin supplements, B-group vitamins have a significant role because of their numerous physiological functions as coenzymes.

A common characteristic of these vitamins is their water solubility as well as the fact that they are found in the same dietary sources. Necessary for normal functioning of the body, they are involved in metabolism of carbohydrates, proteins and fats, as well as energy production, maintaining normal cardiac function, regular cell division and also normal activity of the nervous system [4, 5].

Vitamins B1, B2, B3 and B6 are important components of the B-complex group. Thiamine (vitamin B1) in its active form thiamine-pyrophosphate (TPP) serves as a cofactor in several key enzymes related to the metabolism of carbohydrates and branched-chain amino acids. Vitamin B1 is also necessary for numerous other cell processes, such as synthesis of precursors of nucleic acids, myelin and neurotransmitters (e.g. acetylcholine) as well as for antioxidant activity [6]. Vitamin B2 (riboflavin, sodium-riboflavin-5'-phosphate) is a component of flavoprotein, flavin-mononucleotide (FMN) and flavin-adenine-dinucleotide (FAD), which are dehydrogenase coenzymes in the citric acid cycle and prosthetic groups in several flavoprotein enzymes catalysing redox processes in the cell. Vitamin B3 (nicotinamide, nicotinic acid) is a part of the coenzyme nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD) and nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate (NADP) which take part in metabolism of carbohydrates, fats and proteins as well as in cell respiration. Vitamin B6 (pyridoxine-hydrochloride, pyridoxine-5'-phosphate, pyridoxine-dipalmitate) is involved in virtually all reactions of amino acid metabolism as well as in synthesis of erythrocytes, antibodies and maintaining the function of the immune system [4].

In adults, nutrient reference value (NRV) for vitamin B1 is 1.1 mg, for vitamins B2 and B6 are 1.4 mg each and for nicotinamide 16 mg [7]. Long-term inadequate intake of vitamin B can result in illnesses such as beriberi (vitamin B1 deficit) [8], cheilosis and glossitis (vitamin B2 deficit), [9] pellagra (vitamin B3 deficit) [10], while anaemia and neuropathy can occur as a consequence of vitamin B6 deficit. Daily needs for these four B-group vitamins are mostly

Код одраслих особа, нутритивна референтна вредност (НРВ) за витамин Б1 је 1,1 мг, за витамине Б2 и Б6 по 1,4 мг, а за никотинамид 16 мг [7]. Дугорочни неадекватан унос витамина Б за последицу може имати настанак обољења као што су болест Берибери (дефицир витамина Б1) [8], *cheilosis* и *glossitis* (дефицир витамина Б2), [9], пелагра (дефицир витамина Б3) [10], док анемија и неуропатија могу настати као последица дефицита витамина Б6.

Дневне потребе за ова четири витамина групе Б се углавном задовољавају балансираном исхраном, а главни извори поред житарица су намирнице анималног порекла (месо, млеко, јаја) [8–10]. Међутим, фактори попут старости, трудноће, поремећаја функције тироидне жлезде, анорексије, генетских фактора, употребе лекова и алкохола могу повећавати потребе за витаминима групе Б [9, 10]. У овим околностима може бити потребан додатни унос витамина Б, што се постиже применом фортификаваних намирница или додатака исхрани (дијететски суплементи). На нашем тржишту се налази велики број додатака исхрани који као активне компоненте садрже један или више витамина Б комплекса. На паковању ових производа се морају декларисати количине сваког витамина понаособ, као и њихови хемијски извори.

### **Здравствене изјаве за витамине Б1, Б2, Б3 и Б6**

У циљу означавања намене додатака исхрани, из групе Б, могу се користити здравствене изјаве које се налазе на Листи одобрених здравствених изјава (табела 1) [11].

Да би се активан састојак додатака исхрани уписао на Листу одобрених здравствених изјава, неопходно је да је присутан у количини која има доказан хранљиви или физиолошки ефекат за здравље потрошача [11].

met by balanced diet with animal food products (meat, milk, eggs) being the main source apart from grains [8-10]. However, factors such as age, pregnancy, impaired thyroid function, anorexia, genetic factors, use of medicines and alcohol can increase the requirements for B-group vitamins [9, 10]. In these circumstances additional intake of B vitamins may be necessary, which is achieved by using fortified foods or dietary supplements. A large number of dietary supplements containing one or more vitamins of B-complex are present on the domestic market. For these products, quantities of each vitamin individually as well as their chemical sources have to be declared on the package.

### **Health Claims for Vitamins B1, B2, B3 and B6**

To denote the intended use of dietary supplements of B-group, health claims from the List of approved health claims may be used (Table 1) [11].

For the active ingredient to be introduced onto the List of approved health claims it has to be found in the amount that has proven nutritive or physiological effect for consumer's health [11].

Табела 1. Здравствене изјаве за Б1, Б2, Б3 и Б6 витаминe [11] Table 1. Health Claims for Vitamins B1, B2, B3 and B6 [11]

Ознака витамина <i>Vitamin Name</i>	Здравствена изјава <i>Health Claim</i>
Тиамин <i>Thiamine</i>	Тиамин доприноси нормалној психолошкој функцији. <i>Thiamine contributes to normal psychological function.</i>
	Тиамин доприноси нормалном функционисању нервног система. <i>Thiamine contributes to normal functioning of the nervous system.</i>
	Тиамин доприноси нормалној функцији срца. <i>Thiamine contributes to the normal function of the heart.</i>
Рибофлавин <i>Riboflavin</i>	Тиамин доприноси одржавању нормалног енергетског метаболизма. <i>Thiamine contributes to normal energy-yielding metabolism.</i>
	Рибофлавин доприноси нормалном метаболизму гвожђа. <i>Riboflavin contributes to the normal metabolism of iron.</i>
	Рибофлавин доприноси одржавању нормалног енергетског метаболизма. <i>Riboflavin contributes to normal energy-yielding metabolism.</i>
	Рибофлавин доприноси одржавању нормалних црвених крвних зрнаца. <i>Riboflavin contributes to the maintenance of normal red blood cells.</i>
	Рибофлавин доприноси нормалном функционисању нервног система. <i>Riboflavin contributes to normal functioning of the nervous system.</i>
	Рибофлавин доприноси одржавању нормалне коже. <i>Riboflavin contributes to the maintenance of normal skin.</i>
	Рибофлавин доприноси одржавању нормалне слузокоже. <i>Riboflavin contributes to the maintenance of normal mucous membranes.</i>
	Рибофлавин доприноси одржавању нормалног вида. <i>Riboflavin contributes to the maintenance of normal vision.</i>
Ниацин <i>Niacin</i>	Рибофлавин доприноси смањењу умора и исцрпљености. <i>Riboflavin contributes to the reduction of tiredness and fatigue.</i>
	Рибофлавин доприноси заштити ћелија од оксидативног стреса. <i>Riboflavin contributes to the protection of cells from oxidative stress.</i>
	Ниацин доприноси нормалној психолошкој функцији. <i>Niacin contributes to normal psychological function.</i>
	Ниацин доприноси одржавању нормалног енергетског метаболизма. <i>Niacin contributes to normal energy-yielding metabolism.</i>
	Ниацин доприноси нормалној функцији нервног система. <i>Niacin contributes to normal functioning of the nervous system.</i>
Витамин Б6 <i>Vitamin B6</i>	Ниацин доприноси одржавању нормалне коже. <i>Niacin contributes to the maintenance of normal skin.</i>
	Ниацин доприноси одржавању нормалне слузокоже ( <i>mucous</i> мембране). <i>Niacin contributes to the maintenance of normal mucous membranes.</i>
	Ниацин доприноси смањењу умора и исцрпљености. <i>Niacin contributes to the reduction of tiredness and fatigue.</i>
	Витамин Б6 доприноси нормалној психолошкој функцији. <i>Vitamin B6 contributes to normal psychological function.</i>
	Витамин Б6 доприноси нормалној синтези цистеина. <i>Vitamin B6 contributes to normal cysteine synthesis.</i>
	Витамин Б6 доприноси нормалном метаболизму хомоцистеина. <i>Vitamin B6 contributes to normal homocysteine metabolism.</i>
	Витамин Б6 доприноси одржавању нормалног енергетског метаболизма. <i>Vitamin B6 contributes to normal energy-yielding metabolism.</i>
	Витамин Б6 доприноси нормалној функцији имуног система. <i>Vitamin B6 contributes to the normal function of the immune system.</i>
	Витамин Б6 доприноси нормалном функционисању нервног система. <i>Vitamin B6 contributes to normal functioning of the nervous system.</i>
	Витамин Б6 доприноси нормалном метаболизму протеина и гликогена. <i>Vitamin B6 contributes to normal protein and glycogen metabolism.</i>
Витамин Б6 доприноси регулацији хормонске активности. <i>Vitamin B6 contributes to the regulation of hormonal activity.</i>	
Витамин Б6 доприноси смањењу умора и исцрпљености. <i>Vitamin B6 contributes to the reduction of tiredness and fatigue.</i>	
Витамин Б6 доприноси нормалном стварању црвених крвних зрнаца. <i>Vitamin B6 contributes to normal red blood cell formation.</i>	

Важан аспект контроле квалитета додатака исхрани, а тиме и осигурања безбедне примене ових производа, јесте и аналитичка провера декларисаног садржаја активних компонената. За проверу декларисаних активних компоненти неопходно је да постоје и да се развијају брзе и поуздане методе, које ће омогућити да се осигура безбедна примена ових производа код особа којима су намењени. Циљ овог рада је био да се аналитички провери декларисани садржај витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 у додацима исхрани присутним на тржишту Републике Србије и да се утврди да ли добијене вредности одговарају декларисаним.

## Материјал и методе

### Стандарди и хемикалије

Стандарди витамина Б1 (*Thiamine-hydrochloride*, 99,6%, *Supelco Analytical*), Б2 (*Riboflavin*, 97,9%, *Supelco Analytical*), Б3 (*Nicotinamide*), 99,9%, *Supelco Analytical*) и Б6 (*Pyridoxine-hydrochloride*, 99,9%, *Supelco Analytical*) набављени су у чврстом стању (*Sigma Aldrich*).

За анализу су коришћени и ацетонитрил (*J. T. Baker*), трифлуоросирћетна киселина (*Sigma Aldrich*), сумпорна киселина (Зорка Шабац), натријум ацетат (*J. T. Baker*), ултра чиста дејонизована вода добијена у лабораторији (*Thermo GenPure UV*), и рН индикаторска хартија (*Merck, Darmstadt*).

### Узорци

За анализу је одабрано и набављено у апотекама и веледрогеријама на територији града Београда 29 различитих дијететских суплемената. У облику таблета или капсула било је 16 узорака, док је 13 било у облику прашка, запаковано у појединачним дозним кесицама или у већим паковањима са упутством о количини појединачних доза које се користе. Сви узорци су садржали упутство о начину употребе, као и припреме тамо где је то било потребно.

### Инструмент и услови методе

Сви узорци су анализирани на HPLC инструменту *Agilent 1200* серије (*Agilent Technologies, Santa Clara, USA*) који се састоји од бинарне пумпе, дегазера мобилне фазе, инјектора, термостатске коморе за колону и DAD (*Diode Array Detector*) детектора. Колона која је коришћена за анализе била је *Zorbax Eclipse XDB-C18*, димензије 4,6 x 150 mm и величине честица од 5 µm (*Agilent Technologies, Santa Clara, USA*). Састав мобилне фазе био је вода (А) и ацетонитрил (Б) са додатком 0,1% трифлуоросирћетне киселине (ТФА), а метод елуирања градијентна метода: 0 min. – 0% В, 5 min. 3% В, 6 min. 15% В, 10 min. 20% В, 12 min. 0% В, при протоку

Analytical assays of declared content of active substances is an important aspect of dietary supplement quality control and therefore of their safe use assurance. To assay declared active components it is necessary to have and to develop quick and reliable methods which will enable assurance of safe use of these products for the intended persons. The objective of this research was to analytically test the declared content of vitamins B1, B2, B3 and B6 in dietary supplements present on the market of the Republic of Serbia as well as to establish whether the obtained values comply with the declared ones.

## Materials and Methods

### Standards and Chemicals

Standards of vitamin B1 (*Thiamine-hydrochloride*, 99.6%, *Supelco Analytical*), B2 (*Riboflavin*, 97.9%, *Supelco Analytical*), B3 (*Nicotinamide* (*Niacinamide*), 99.9%, *Supelco Analytical*) and B6 (*Pyridoxine-hydrochloride*, 99.9%, *Supelco Analytical*) were acquired in solid form (*Sigma Aldrich*).

Acetonitrile (*J. T. Baker*), trifluoroacetic acid (*Sigma Aldrich*), sulphuric acid (*Zorka Šabac*), sodium acetate (*J. T. Baker*), laboratory obtained ultra-pure deionised water (*Thermo GenPure UV*), and pH indicator paper (*Merck, Darmstadt*) were also used for analysis.

### Samples

Twenty-nine different dietary supplements were chosen for analysis and acquired from pharmacies and wholesale distributors on the territory of Belgrade. Sixteen of the samples were in the form of tablets or capsules, while 13 were in the form of powder, packed as single-dose sachets or in larger packages with instructions for quantities used as a single dose. All samples contained instructions for use as well as instructions for preparation where necessary.

### Instrument and Method Conditions

All samples were analysed on HPLC instrument *Agilent 1200* series (*Agilent Technologies, Santa Clara, USA*) consisting of a binary pump, mobile phase degasser, injector, thermostated column compartment and DAD (*Diode Array Detector*). Column *Zorbax Eclipse XDB-C18* was used for analysis, column size 4.6 x 150 mm, particle size 5 µm (*Agilent Technologies, Santa Clara, USA*). Mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B) with the addition of 0.1% trifluoroacetic acid. Gradient elution method was used as follows: 0 min - 0% B, 5 min 3% B, 6 min 15% B, 10 min 20% B, 12 min 0% B, with the flow speed of 1.3 mL/min. Detection wavelengths were: 245 nm (B1), 254 nm (B3 и B2) и 280 nm (B6).

### Sample Preparation

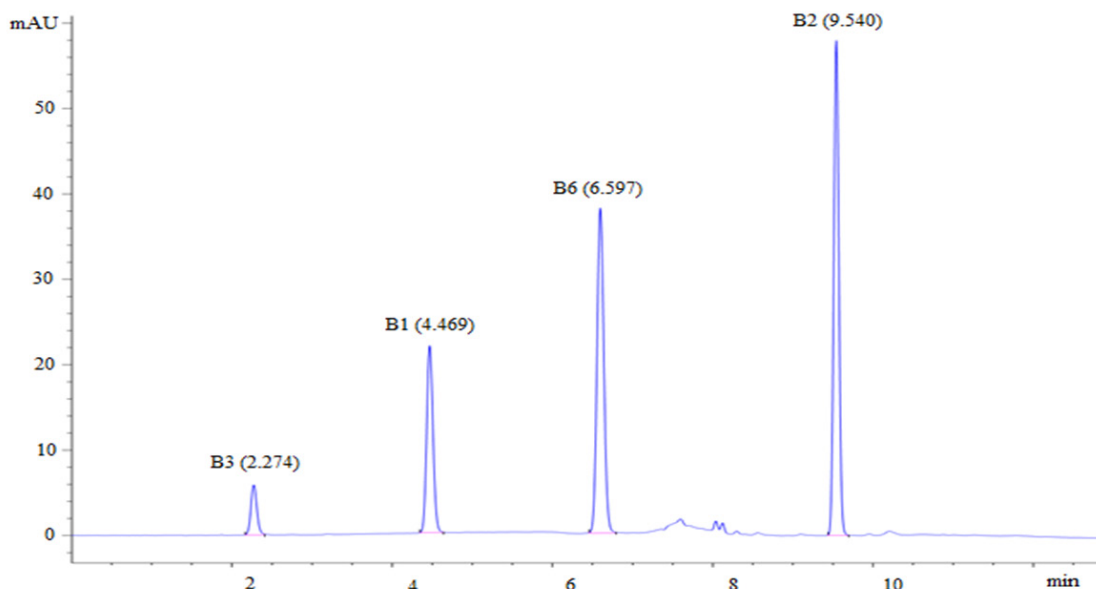
од 1,3 mL/min. Детекција је вршена на три таласне дужине: 245 nm (B1), 254 nm (B3 и B2) и 280 nm (B6).

### Припрема узорка

Сваки узорак је пре анализе уситњен и хомогенизован у авану. Ако је узорак дијететског суплемента био у облику таблета или капсула, прво је појединачно одмеравано 20 таблета/капсула и утврђивана просечна тежина. Након тога су таблете/капсуле хомогенизоване у авану и одатле је одмеравана одређена количина узорка која је коришћена за анализу. Репрезентативни узорак је растваран у 32 mL 0,1 M сумпорне киселине на ултразвучном купатилу уз загревање на 60 °C током 30 минута. Након тога узорак је хлађен, а рН вредност му је подешавана уз помоћ чврстог натријум-ацетата, до 4,0–4,5, уз коришћење рН индикаторског папира. Затим је припремљени узорак пренет у нормални суд од 50 mL и допуњен до црте дејонизованом водом. Пре инјектовања, узорак је филтриран кроз PTFE филтер пора 0,45 µm.

Сви стандарди су убризгавани у три понављања. Хроматограм вишеккомпонентног стандардног раствора приказан је на слици 1.

**Слика 1.** Хроматограм вишеккомпонентног стандардног раствора



Each sample was pulverised and homogenised in a mortar prior to the analysis. If the supplement was in the form of tablets or capsules, 20 tablets/capsules were individually weighed first and average mass was calculated. Thereafter the tablets/capsules were homogenised in a mortar from which a specific quantity of sample was measured and used for analysis. Representative sample was dissolved in 32 mL of 0.1M sulphuric acid by sonication in a water bath at 60° C for 30 minutes. After that, the sample was cooled and the pH value was adjusted using solid sodium-acetate to 4.0 – 4.5 controlled by pH indicator paper. The sample was subsequently transferred to a 50 mL volumetric flask and filled up to the mark with deionised water. Prior to injecting the sample was filtered through PTFE filters, pore size 0.45 µm.

All standards were injected in three replicates. Chromatogram of multicomponent standard solution is shown in figure 1.

**Figure 1.** Chromatogram of the multicomponent standard solution

Коефицијент корелације у свим матриксама је већи од 0,998. Параметри линеарности дати су у табели 2. Тачност методе потврђена је учествовањем у међулабораторијском тестирању *Vitamins in Liquid Vitamin Supplement 2117 September-October 2019 Fapas PT (proficiency testing – PT)*. Резултати издати од стране лабораторије Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут” били су у задовољавајућем

Correlation coefficient in all matrices was higher than 0.998. Linear regression parameters are shown in Table 2. Method accuracy was confirmed by interlaboratory testing “Vitamins in Liquid Vitamin Supplement 2117 September-October 2019 Fapas PT (proficiency testing – PT)”. Results issued by the laboratory of the Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut” were within satisfactory limits:  $-2 \leq z \leq 2$ . For reproducibility check, all

опсегу који износи  $-2 \leq z \leq 2$ . За проверу поновљивости сви узорци анализирани у овој студији убризгавани су у три понављања, а израчуната релативна стандардна девијација је била испод 5,0% за сва четири витамина, док је добијена вредност за *recovery* била 93–105 (табела 2).

**Табела 2.** Линеарност, тачност и прецизност методе за одређивање витамина Б групе (Б1, Б2, Б3 и Б6), коришћењем HPLC-DAD методе

	Витамин Б1 <i>Vitamin B1</i>	Витамин Б2 <i>Vitamin B2</i>	Витамин Б3 <i>Vitamin B3</i>	Витамин Б6 <i>Vitamin B6</i>
<b>Линеарност<sup>1</sup> / <i>Linearity</i><sup>1</sup></b>				
Коефицијент корелације <i>Correlation coefficient</i>	0,9999	0,9998	0,9986	0,9994
Нагиб / <i>Slope (mL/g)</i>	18,706	15,203	15,287	13,288
Одсечак / <i>Intercept</i>	13,844	1,672	4,395	17,770
<b>Тачност<sup>2</sup> / <i>Recovery</i><sup>2</sup></b>				
n				
1	105,76	95,62	105,22	93,38
2	102,64	92,83	102,49	96,24
3	104,53	101,16	98,02	98,70
<b>Поновљивост методе<sup>3</sup> / <i>Reproducibility</i><sup>3</sup></b>				
RSD (%)	2,72	3,84	3,44	3,04
LOD <sup>4</sup>	0,12	0,10	0,11	0,10
LOQ <sup>4</sup>	0,40	0,35	0,37	0,35

<sup>1</sup> Пет стандардних раствора са различитим нивоима концентрације (5, 10, 20, 30 и 50 µg/mL сваког витамина) убризганих у три понављања током четири дана.

<sup>2</sup> Три нивоа концентрације (15, 25 и 45 µg/mL), сваки је убризган у три понављања (n = узорци нивоа).

<sup>3</sup> Добијено од узорка таблета са декларисаним садржајем витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 припреманих од стране два аналитичара током шест дана.

<sup>4</sup> LOD (S/N = 3) и LOQ (S/N = 10)

## Резултати

HPLC-DAD метода је примењена за одређивање витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 у узорцима 29 дијететских суплемената, укључујући инстант напитке, капсуле и таблете. У табелама 3 и 4 приказани су резултати експериментално одређене количине витамина Б1, Б2, Б3 и Б6, декларисане (наведене) вредности преузете са декларација производа и њихова дозвољена одступања, као и проценат НРВ.

analysed samples were injected in three replicates and calculated relative standard deviation was below 5.0% for all four vitamins, while recovery was 93 – 105 (Table 2).

**Table 2.** Linearity, Accuracy and Precision of the Method for B-group Vitamin Determination (B1, B2, B3 and B6), Using the HPLC-DAD Method

<sup>1</sup> Five standard solutions with different concentration levels (5, 10, 20, 30 и 50 µg/mL of each vitamin) injected in three replicates during four days.

<sup>2</sup> Three concentration levels (15, 25 и 45 µg/mL), each injected in three replicates (n = sample levels).

<sup>3</sup> Obtained from tablet samples with the declared content of vitamins B1, B2, B3 and B6 prepared by 2 analysts during 6 days

<sup>4</sup> LOD (S/N = 3) и LOQ (S/N = 10)

## Results

HPLC-DAD method was used for determining the levels of vitamins B1, B2, B3 and B6 in the samples of 29 dietary supplements including instant drinks, capsules and tablets. Tables 3 and 4 show the results of experimentally established levels of vitamins B1, B2, B3 and B6, declared (listed) values taken from product labels and their tolerance ranges as well as percentage of NRV.

**Табела 3.** Измерене и декларисане вредности витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 у испитиваним дијететским суплементима (витамински инстант напаци)

**Table 3.** Measured and Declared Values of Vitamins B1, B2, B3 and B6 in Tested Dietary Supplements (Vitamin Instant Drinks)

Редни број	Б1 (mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ	Б2 (mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ	Б3 (никотинамид, mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ	Б6 (mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ
No.	B1 (mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV	B2 (mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV	B3 (nicotinamide - mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV	B6 (mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV
1	0.72	0.55 (0.44-0.83)	50	0.64	0.7 (0.56-1.05)	50	9.67	8.0 (6.4-12.0)	50	1.05	0.7 (0.56-1.05)	50
2	0.7	0.55 (0.44-0.83)	50	0.61	0.7 (0.56-1.05)	50	7.55	8.0 (6.4-12.0)	50	0.92	0.7 (0.56-1.05)	50
3	0.82	0.55 (0.44-0.83)	50	0.68	0.7 (0.56-1.05)	50	7.91	8.0 (6.4-12.0)	50	1.06	0.7 (0.56-1.05)	50
4	0.68	0.55 (0.44-0.83)	50	0.58	0.7 (0.56-1.05)	50	8.73	8.0 (6.4-12.0)	50	0.79	0.7 (0.56-1.05)	50
5	0.6	0.55 (0.44-0.83)	50	0.58	0.7 (0.56-1.05)	50	9.22	8.0 (6.4-12.0)	50	1.02	0.7 (0.56-1.05)	50
6	0.82	0.55 (0.44-0.83)	50	0.61	0.7 (0.56-1.05)	50	8.92	8.0 (6.4-12.0)	50	0.78	0.7 (0.56-1.05)	50
7	<b>&lt;0,2</b>	1,10 (0,88-1,65)	100	<b>&lt;0,2</b>	1,10 (0,88-1,65)	79	-	-	-	<b>9,08</b>	1,4 (1,12-2,10)	100
8	0.48	0.55 (0.44-0.83)	50	0.6	0.7 (0.56-1.05)	50	9.4	8.0 (6.4-12.0)	50	0.83	0.7 (0.56-1.05)	50
9	0.47	0.55 (0.44-0.83)	50	0.62	0.7 (0.56-1.05)	50	9.23	8.0 (6.4-12.0)	50	0.87	0.7 (0.56-1.05)	50
10	0.45	0.55 (0.44-0.83)	50	0.74	0.7 (0.56-1.05)	50	9.12	8.0 (6.4-12.0)	50	0.75	0.7 (0.56-1.05)	50
11	0.44	0.55 (0.44-0.83)	50	0.63	0.7 (0.56-1.05)	50	9.08	8.0 (6.4-12.0)	50	0.72	0.7 (0.56-1.05)	50
12	0.44	0.55 (0.44-0.83)	50	0.63	0.7 (0.56-1.05)	50	9.63	8.0 (6.4-12.0)	50	0.82	0.7 (0.56-1.05)	50
13	0.44	0.55 (0.44-0.83)	50	0.64	0.7 (0.56-1.05)	50	9.58	8.0 (6.4-12.0)	50	0.71	0.7 (0.56-1.05)	50

Припрема напитака (1–13):

Напаци 1–6 препоручена доза 16 g/200 mL: 16 g праха растворено у 200 mL воде;

Напитак 7: препоручена доза 20 g/250 ml: 20 g праха растворено у 250 mL воде;

Напаци 8–13: препоручена доза 19 g/250 mL: 19 g праха растворено у 250 mL воде

Preparation instructions (1-13):

Drinks 1-6: recommended dose 16 g/200 mL: 16 g of powder dissolved in 200 mL of water;

Drink 7: recommended dose 20 g/250 ml: 20 g of powder dissolved in 250 mL of water;

Drinks 8-13: recommended dose 19 g/250 mL: 19 g of powder dissolved in 250 mL of water.

**Табела 4.** Измерене и декларисане вредности витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 у испитиваним дијететским суплементима (капсуле/таблете)

**Table 4.** Measured and Declared Values of Vitamins B1, B2, B3 and B6 in Tested Dietary Supplements (capsules/tablets)

Редни број	Б1 (mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ	Б2 (mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ	Б3 (никотинамид, mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ	Б6 (mg/ појединачна доза)	Декларисана вредност (дозвољено одступање)	% НРВ
No.	B1 (mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV	B2 (mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV	B3 (nicotinamide - mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV	B6 (mg/ single dose)	Declared value (tolerance range)	% NRV
1	6.5	5.0 (4.0-7.5)	455	4.6	5.0 (4.0-7.5)	357	12.75	12.0 (9.6-18.0)	75	<b>3.1</b>	5.0 (4.0-7.5)	357
2	1.65	1.2 (0.96-1.8)	109	1.7	1.3 (1.04-1.95)	93	18.7	15.0 (12.0-22.5)	94	2.4	2.0 (1.6-3.0)	143
3	1.8	1.2 (0.96-1.8)	109	1.6	1.3 (1.04-1.95)	93	21.1	15.0 (12.0-22.5)	94	2.7	2.0 (1.6-3.0)	143
4	1.7	1.7 (1.3-2.6)	155	1.9	2.1 (1.7-3.2)	150	31.7	24.0 (19.2-36.0)	150	2.4	2.1 (1.7-3.2)	150
5	9.4	10.0 (8.0-15.0)	909	6.3	5.0 (4.0-7.5)	357	44.9	30.0 (24.0-45.0)	188	13.7	10.0 (8.0-15.0)	714
6	<b>26.9</b>	10.0 (8.0-15.0)	909	5.7	6.0 (4.8-9.0)	429	27	27.0 (21.6-40.5)	169	12.5	10.0 (8.0-15.0)	714
7	<b>0.4</b>	3.3 (2.6-5.0)	300	<b>2.1</b>	4.2 (3.4-6.3)	300	22.1	18.0 (14.4-27.0)	113	5.9	4.2 (3.4-6.3)	300
8	6.9	5.0 (4.0-7.5)	455	4.9	5.0 (4.0-7.5)	357	24.5	25.0 (20.0-37.0)	156	2.1	2.0 (1.6-3.0)	143
9	4.2	3.0 (2.4-4.5)	273	2.8	3.0 (2.4-4.5)	214	15.5	16.0 (12.8-24.0)	100	2.3	2.0 (1.6-3.0)	143
10	1.4	1.1 (0.9-1.7)	100	1.6	1.4 (1.1-2.1)	100	17	16.0 (12.8-24.0)	100	1.8	1.4 (1.1-2.1)	100
11	1.5	1.5 (1.2-2.3)	136	1.4	1.7 (1.4-2.6)	121	18.6	20.0 (16.0-30.0)	125	2	2.0 (1.6-3.0)	143
12	2.9	2.4 (1.9-3.6)	218	1.7	1.5 (1.2-2.3)	107	39.4	36.0 (28.8-54.0)	225	7.2	6.0 (4.8-9.0)	429
13	3	2.4 (1.9-3.6)	218	2.2	2.6 (2.1-3.9)	186	40	30.0 (24.0-45.0)	188	3.6	4.0 (3.2-6.0)	286
14	1.7	1.4 (1.1-2.1)	127	1.3	1.6 (1.3-2.4)	114	22	18.0 (14.4-27.0)	113	2.4	2.0 (1.6-3.0)	143
15	1.6	1.4 (1.1-2.1)	127	1.6	1.6 (1.3-2.4)	114	44.2	48.0 (38.4-72.0)	300	2.4	2.0 (1.6-3.0)	143
16	2.1	1.65 (1.3-2.5)	150	2	2.1 (1.7-3.2)	150	25.2	24.0 (19.2-36.0)	150	2.3	2.1 (1.7-3.2)	150



Од витамина Б групе анализирани су витамини Б1, Б2, Б3 и Б6. Витамин Б3 је био најзаступљенији у свим дијететским суплементима. Концентрације су варирале од 15,5 до 44,9 mg/појединачна доза за капсуле/таблете до 7,55–9,67 mg/појединачна доза за инстант прашкове. Вредности за витамин Б1 код узорака у облику инстант прашка су биле од <0,20–0,82 mg/појединачна доза, односно 0,4–9,4 mg/појединачна доза за капсуле/таблете. Код витамина Б2 добијено је <0,20–0,74 mg/појединачна доза за инстант прашкове и 1,36,3 mg/појединачна доза за капсуле/таблете. Витамин Б6 је имао нешто веће вредности и за инстант прашкове и за капсуле/таблете (0,71–9,08 и 1,8–13,7 mg/појединачна доза, редом). Из добијених резултата се види да је у свим анализираним узорцима количина витамина Б3 и Б6 била већа од лимита квантификације, а само код једног узорка вредности за витамин Б1 и Б2 су биле ниже од лимита квантификације. Добијене вредности за витамин Б3 биле су у складу са декларисаним, тј. у границама дозвољених одступања. Вредности за витамин Б6 код два узорка биле су веће од декларисаних, док су код витамина Б1 два узорка показала нижу, а један већу вредност од декларисане. Код два узорка за витамин Б2 је добијена нижа вредност од декларисане на паковањима анализираних дијететских производа. Од тринаест анализираних суплемената у облику инстант прашка, само један није одговарао декларисаним вредностима, док код шеснаест суплемената у облику капсула/таблета, три нису испуњавала услове. Декларисане вредности за испитиване витамине најчешће су биле у нивоу НРВ, само у неколико случајева обухватиле су максимално дозвољене количине. То су била два дијететска суплемента у облику капсула, чије су декларисане вредности за витамин Б1 и Б6 одговарале максимално дозвољеним количинама. Прашкови за инстант напитке имали су декларисане активне супстанце у опсегу од 50 до 100% НРВ, док су капсуле/таблете имале много веће количине активне супстанце за витамине Б1, Б2, Б3 и Б6 (100–909; 93–429; 75–300 и 100–714% НРВ, редом).

## Дискусија

Са повећањем производње и потрошње дијететских суплемената неопходна је адекватна и брза методологија испитивања активних компоненти, што би додатно осигурало и потврдило њихову безбедну примену. Адекватност HPLC-DAD методе [12] која је примењена у овом раду за одређивање витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 потврђена је у поступку валидације преко задовољавајућих резултата лимита квантификације, линеарности, поновљивости и тачности, као и током међулабораторијског упоредног испитивања. Добијени резултати током ана-

Of vitamins belonging to B-group, vitamins B1, B2, B3 and B6 were analysed. Vitamin B3 was the most represented one in all dietary supplements. Concentrations varied from 15.5 – 44.9 mg per single dose for capsules/tablets to 7.55 – 9.67 mg per single dose for instant powders. Values for vitamin B1 in instant powder samples were in the range of <0.20 – 0.82 mg per single dose and 0.4 – 9.4 mg per single dose in samples of capsules/tablets. For vitamin B2 obtained values were <0.20 – 0.74 mg per single dose for instant powders and 1.3 – 6.3 mg per single dose for capsules/tablets. Vitamin B6 levels have been somewhat higher in both instant powders and capsules/tablets (0.71 – 9.08 and 1.8 – 13.7 mg per single dose respectively). It is evident from the obtained results that the levels of vitamins B3 and B6 were above the limit of quantification in all analysed samples, while only in one sample the levels of vitamins B1 and B2 were below the limit of quantification. Established values of vitamin B3 complied with the declared values i.e. were within the tolerance range. Vitamin B6 values were higher than the declared ones in two samples, while for vitamin B1 two samples have shown lower and one sample higher values than those declared. In two vitamin B2 samples, the obtained value was lower than declared on the package of analysed dietary products. Out of thirteen instant powder supplements analysed, only one did not comply with the declared values, while in sixteen supplements in form of capsules/tablets, three did not comply with the requirements. Declared values of tested vitamins most often corresponded to NRV; only in a few cases they included maximal allowed amounts. These were two dietary supplements in capsule form, in which the declared values of vitamins B1 and B6 corresponded to maximal allowed amounts. In powders for instant drinks active substances were declared in the range of 50 – 100% NRV, while the declared amounts of active substance were much higher in capsules/tablets for vitamins B1, B2, B3 and B6 (100 – 909; 93 – 429; 75 – 300 и 100– 714 % NRV respectively).

## Discussion

Increase in production and consumption of dietary supplements necessitates adequate and quick methodology for active component testing, which would additionally ensure and confirm their safe use. Adequacy of HPLC-DAD method [12] which was used in this study for determining vitamins B1, B2, B3 and B6 was confirmed in a validation process through satisfactory results for limits of quantification, linearity, reproducibility and accuracy as well as through interlaboratory comparison testing. Results established through dietary supplement analysis were interpreted based on allowed tolerance as defined in the Guidance document [13], hence 86.2% of tested supplements com-

лизе дијететских суплемената тумачени су на основу дозвољених одступања дефинисаних у Водичу [13], тако да је 86,2% испитиваних суплемената одговарало декларисаним вредностима за сва четири витамина групе Б. Вредности за витамин Б3 биле су у складу са декларисаним код свих анализираних суплемената, а од осталих анализираних витамина, витамин Б1 је код 89,7% суплемената испуњавао захтеве декларисања, док је садржај активне супстанце витамина Б2 и Б6 био у декларисаним границама код 93,1% испитаних дијететских суплемената.

На основу података из литературе може се закључити да је основна техника за одређивање витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 управо HPLC техника, уз примену неколико различитих детектора. Поред DAD детектора, који је коришћен у овом раду, за одређивање витамина Б групе коришћени су и PDA детектор [14], као и електрохемијски детектор [15]. У овом раду од интереса су били радови где је примењен HPLC систем са DAD детектором. Прегледом литературе је констатовано да постоје подаци који доказују да су и други аутори користили ову технику за одређивање витамина у дијететским суплементима [16–19]. Сви ови аутори су своја испитивања потврдили одговарајућом валидацијом примењених метода, а након тога су одређивали садржај активних компоненти витамина групе Б у дијететским суплементима и проверавали њихову усклађеност са декларисаним вредностима [13]. У три [16–18] од ова четири [16–19] рада испитивање је спроведено на три дијететска суплемента, а само код једног на тринаест. Резултати комерцијалних узорака за садржај витамина Б1, Б2, Б3 и Б6, које су приказали Томас и сарадници [16], показали су да су сва три дијететска суплемента испуњавали услове тј. били су у границама дозвољеног одступања. Сим и сарадници [17] су код два од три мултивитаминска суплемента која су испитивали добили ниже вредности у односу на декларисане, тако што је код једног био смањен садржај витамина Б3, а код другог витамина Б2. Такође и Видовић и сарадници [18] су код два дијететска суплемента пронашли мање вредности за садржај неког од испитаних витамина у односу на њихову декларисану вредност. Ракуша и сарадници [19] су своју студију спровели на тринаест суплемената, и као што се и могло очекивати, било је и одступања од декларисаних вредности, што је утврђено код четири дијететска суплемента. За разлику од резултата поменутих аутора, резултати испитивања која су спроведена у овом раду су охрабрујући, јер од 29 суплемената који су анализирани на садржај појединих витамина групе Б, само четири су показала одступање.

Постоји велико интересовање за витамине групе Б.

plied with declared values for all four B-group vitamins. Values for vitamin B3 were in accordance with the declared ones in all analysed supplements while of other vitamins analysed, vitamin B1 met the declared requirements in 89.7% of the supplements and the active substance content of vitamins B2 and B6 was within the declared limits in 93.1% of tested dietary supplements.

From the scientific literature data, it can be inferred that the fundamental technique for determination of vitamins B1, B2, B3 and B6 is precisely the HPLC technique coupled with a variety of detectors. In addition to DAD detector, which was used in this study, for determining B-group vitamins PDA detector [14] as well as electrochemical detector [15] are used. In this research, the studies where HPLC system was coupled with DAD detector were of interest. Literature review has yielded data showing that other authors as well have used this technique for determination of vitamins in dietary supplements [16–19]. All these authors have confirmed their analyses by adequate method validation, after which they determined the content of active components belonging to B-group vitamins in dietary supplements and tested their compliance with the declared values [13]. In three [16–18] out of four [16–19] of these papers, study was conducted on three dietary supplements and only one involved thirteen supplements. Results of vitamin B1, B2, B3 and B6 content for commercial samples presented by Thomas et. al. [16] have shown that all three dietary supplements complied with the requirements, i.e. were within the tolerance range. Sim et. al. [17] have established that values were lower than declared in two out of three tested supplements, so that one showed decreased content of vitamin B3 and the other of vitamin B2. In addition, Vidović et. al. [18] have also found lower content of some of the tested vitamins compared to the declared value in two dietary supplements. Rakuša et. al. [19] have conducted their study on thirteen supplements and, as was to be expected, there were deviations from the declared values, which was established in four dietary supplements. Unlike the results from the aforementioned authors, the results in this study are encouraging, since out of twenty-nine supplements where content of some of the B-group vitamins was analysed, only four have shown deviations.

There is a lot of interest in B-group vitamins. Many researchers have studied relations between vitamin B intake and risk for developing certain diseases, because of the importance of vitamin B complex for human health [9-11]. There are numerous clinical studies that have tracked the effect of supplements containing B-complex vitamins on various body conditions, but none in the existing literature have included all four B-group vitamins that have been studied in this paper. There are several studies that examined the effect of some of the B-group vitamins. Thus, large

Многи истраживачи проучавали су везе између уноса витамина Б и ризика од развоја одређених болести, због значаја витамина Б комплекса за људско здравље [9–11]. Постоје бројне клиничке студије које прате ефекат суплемената витамина Б-комплекса на разна стања организма, али у литератури ниједна студија није обухватила сва четири витамина Б-групе која су одређивана у овом раду. Постоји неколико студија које су пратиле ефекат појединих витамина групе Б. Тако су велике дозе биотина (2 г/дан) код пацијената са дијабетесом довеле до побољшања гликемијске контроле [20], док је велика доза (1–4 г) витамина Б3, код пацијената са стабилном коронарном болешћу, довела до смањења учесталости кардиоваскуларних болести и коронарне болести срца и имала позитиван учинак на инфламаторне биомаркере [21, 22]. Ове малобројне студије су потврда да су витамини Б групе неопходни у одређеним стањима, али и да имају ограничену улогу у стањима која захтевају другачији приступ и третман.

### **Закључак**

На нашем тржишту се налази велики број додатака исхрани који садрже витамине Б1, Б2, Б3 и Б6. Од укупно 29 анализираних дијететских суплемената, 25 тј. 86,2% су одговарали декларисаним вредностима за сва четири витамина групе Б. Од укупно шеснаест анализираних капсула/таблета, тринаест су испуњавале услов декларисања (81,3%), а од тринаест анализираних инстант прашкова само један (7,7%) није одговарао декларисаним вредностима активних компоненти одговарајућих витамина. Садржај витамина Б1, Б2, Б3 и Б6 код дијететских суплемената у облику таблета/капсула у односу на инстант прашкове био је много већи од њихове нутритивне референтне вредности.

Интерес је потрошача, тј. популације којој је неопходна суплементација овим витаминима, да садржај активне супстанце одговара декларисаним вредностима, због ефеката које поједине дозе испољавају како у току превенције тако и током третирања појединих стања организма.

Студије овог типа су неопходне како због развијања брзих и поузданих метода за одређивање активних компоненти које се налазе у суплементима, тако и због провере оних који се налазе на тржишту.

doses of biotin (2 g/day) have led to improved glycaemic control in patients with diabetes [20], while large dose (1-4 g) of vitamin B3 in patients with stable coronary disease led to a decreased incidence of cardiovascular diseases and coronary heart disease and had a positive effect on inflammatory biomarkers [21,22]. These few studies are a confirmation that B-group vitamins are necessary in certain conditions, but that they also have a limited role in conditions that require a different approach and treatment.

### **Conclusion**

On the domestic market, there is a large number of dietary supplements containing vitamins B1, B2, B3 and B6. Of 29 dietary supplements analysed altogether, 25 i.e. 86.2% complied with the declared values for all four B-group vitamins. Out of a total of sixteen analysed capsules/tablets, thirteen complied with the declared requirements (81.3%), while out of 13 analysed instant powders only one (7.7%) did not comply with the declared values of active components of corresponding vitamins. Content of vitamins B1, B2, B3 and B4 in dietary supplements in the form of tablets/capsules compared to instant powders was much larger than their nutrient reference values.

It is in the interest of consumers, i.e. population who need supplementation with these vitamins, for the content of active substance to comply with the declared values, because of the effect that certain doses have both in prevention and in treatment of given health conditions.

These types of studies are necessary for developing rapid and reliable methods for determination of active components found in dietary supplements as well as for testing of those present on the market.

## Литература / References

1. Rulebook on food supplements (dietary supplements). "Official Gazette of RS", no. 45/2022.
2. National Institutes of Health State-of-the-Science Panel. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: multivitamin/mineral supplements and chronic disease prevention. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(1):257S-264S. doi: 10.1093/ajcn/85.1.257S.
3. Vučićević M. Dietary supplement market in the Republic of Serbia. Chamber of Commerce and Industry of Serbia Belgrade, December 10, 2019. (<https://api.pks.rs/storage/assets/FINAL%20PKS%20Prezentacija.pdf>)
4. Kennedy DO. B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy – A Review. *Nutrients* 2016; 8(2):68; doi:10.3390/nu8020068.
5. Juturu V, Gormley JJ. (2013). "Bioactive nutrients and cardiovascular disease", in *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease 2013*; San Diego, CA, USA: London, UK: Waltham, MA, USA: Academic Press; 73–88. doi:10.1016/B978-0-12-396485-4.00003-7.
6. Lonsdale, D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2006; 3(1):49–59. doi: 10.1093/ecam/nek009.
7. Rulebook on declaring, labeling and advertising food. "Official Gazette of RS", no. 19/2017, 16/2018, 17/2020, 23/2022, 30/2022.
8. Shible AA, Ramadurai D, Gergen D, Reynolds PM. Dry Beriberi Due to Thiamine Deficiency Associated with Peripheral Neuropathy and Wernicke's Encephalopathy Mimicking Guillain-Barré syndrome: A Case Report and Review of the Literature. *American Journal of Case Report* 2019; 13(20):330-334. doi: 10.12659/AJCR.914051.
9. Pinto JT, Zemleni J. Riboflavin. *Advances in Nutrition* 2016 15; 7(5):973-5. doi: 10.3945/an.116.012716.
10. Combs GF, McClung JP. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health.* London, United Kingdom; San Diego, CA, United States : Elsevier/Academic Press, 2017.
11. Rulebook on nutritional and health statements stated on the food declaration. "Official Gazette of RS", no. 51/2018, 103/2018.
12. Trang, Hung Khiem, "Development of HPLC methods for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceuticals and fortified food products". All Theses. 1745. 2013. [https://tigerprints.clemson.edu/all\\_theses/1745](https://tigerprints.clemson.edu/all_theses/1745).
13. European Commission. Guidance document for competent authorities for the control of compliance with EU legislation with regard to the setting of tolerances for nutrient values declared on a label 1924/2006 i 1925/2006. December 2012. [https://www.fsai.ie/uploadedfiles/guidance\\_tolerances\\_december\\_2012.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedfiles/guidance_tolerances_december_2012.pdf)
14. Mozumder NHMR, Akhter MJ, Anwara AK, Rokibuzzaman M, Akhtaruzzaman M. Estimation of Water-Soluble Vitamin B-Complex in Selected Leafy and Non-Leafy Vegetables by HPLC Method. *Oriental Journal of Chemistry* 2019; 35(4): 1344-1351. doi: <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/350414>.
15. Langer S, Lodge JK. Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: a comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in a breakfast cereal matrix. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014; 960:73-81. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.04.001.
16. Thomas S, Kumar R, Sharma A, Issarani R, Badri, Nagori BP et al. Stability indicating HPLC method for determination of vitamins B1, B2, B3 and B6 in pharmaceutical liquid dosage form. *Ind J Chem Technol.* 2008; 15:598–603.
17. Sim HJ, Kim B, Lee J. A Systematic Approach for the Determination of B-Group Vitamins in Multivitamin Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry. *J AOAC Int.* 2016; 99(5):1223-32. doi: 10.5740/jaoacint.16-0093.
18. Vidović S, Stojanović B, Veljković J, Pražić-Arsić L, Roglić G, Manojlović D. Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method. *J Chromatogr A.* 2008; 1202(2):155–62. doi:10.1016/j.chroma.2008.06.039.

19. Temova Rakuša Ž, Grobin A, Roškar R. A comprehensive approach for the simultaneous analysis of all main water-soluble vitamins in multivitamin preparations by a stability-indicating HPLC-DAD method. *Food Chem.* 2021;337:127768. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127768.
20. Albarracin C, Fuqua B, Geohas J, Juturu V, Finch MR, Komorowski JR. Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *J Cardiometab Syndr.* 2007 Spring;2(2):91-7. doi: 10.1111/j.1559-4564.2007.06366.x.
21. Lavigne PM, Karas RH. The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61(4):440–446. doi:10.1016/j.jacc.2012.10.030.
22. Kuvin JT, Dave DM, Sliney KA, Mooney P, Patel AR, Kimmelstiel CD, Karas RH. Effects of extended-release niacin on lipoprotein particle size, distribution, and inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2006; 98(6):743-5. doi:10.1016/j.amjcard.2006.04.011.



### Кореспонденција / Correspondence

Маргарита С. Додевска - Margarita S. Dodevska  
[margarita\\_dodevska@batut.org.rs](mailto:margarita_dodevska@batut.org.rs)