

Doktori értekezés Ph.D. fokozat elnyerésére



**ANALITIKAI MÓDSZERFEJLESZTÉS
FUNKCIONÁLIS ÉLELMISZEREK
VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINTARTALMÁNAK
VIZSGÁLATÁRA**

ENGEL RITA

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készült:

Budapesti Corvinus Egyetem

Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2009.

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fodor Péter**
DSc, egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezetők: **Stefanovitsné dr. Bányai Éva**
DSc, egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Dr. Abrankó László
PhD, egyetemi adjunktus
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

Az doktori iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009. december 8 -i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Máthé Imre, DSc

Lugasi Andrea, PhD

Kovács Béla, CSc

Opponensek

Bartha András, PhD

Daood Hussein, CSc

Titkár

Üveges Márta, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
2	BEVEZETÉS.....	9
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1	A VITAMINOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	11
3.2	A VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK ÉS VITAMERJEIK SZERKEZETI FELÉPÍTÉSE.....	13
3.3	A VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK STABILITÁSA	15
3.4	VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK TERMÉSZETES FORRÁSA.....	17
3.5	VITAMINSZÜKSÉGLET	20
3.6	A VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK SZEREPE AZ ÉLŐ SZERVEZETBEN	22
3.7	ÉLELMISZEREK DÚSÍTÁSA	28
3.7.1	A dúsítás mérőegységei	29
3.7.2	Az élelmiszer dúsítás típusai.....	29
3.7.3	A dúsítás meghatározó tényezői	30
3.7.4	Dúsításra alkalmas élelmiszerek	32
3.7.5	A dúsításhoz használt komponensek.....	34
3.8	VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK MEGHATÁROZÁSA	35
3.8.1	Mikrobiológiai módszerek.....	35
3.8.2	Biospecifikus módszerek.....	38
3.8.3	Fizikai-kémiai analitikai módszerek.....	38
3.8.3.1	Vízben oldódó vitaminok egyedi meghatározása HPLC technikákkal	39
3.8.3.1.1	B ₁ -vitamin	39
3.8.3.1.2	B ₂ -vitamin	40
3.8.3.1.3	B ₃ -vitamin	41
3.8.3.1.4	B ₅ -vitamin	42
3.8.3.1.5	B ₆ -vitamin	43
3.8.3.1.6	B ₉ -vitamin	44
3.8.3.1.7	C-vitamin	46
3.8.3.2	Két vitamin együttes meghatározása HPLC technikákkal	48
3.8.3.2.1	Tiamin és riboflavin	48
3.8.3.2.2	Riboflavin és piridoxin.....	48
3.8.3.2.3	Nikotinamid és piridoxin	49
3.8.3.2.4	Folsav és pantoténsav.....	49
3.8.3.3	Három, vagy több vitamin együttes meghatározása HPLC technikákkal	49
4	CÉLKITŰZÉSEK.....	53
5	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	55
5.1	VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT VEGYSZEREK.....	55
5.2	VITAMINTARTALOM MEGHATÁROZÁSÁHOZ ALKALMAZOTT ANALITIKAI RENDSZEREK	56
5.2.1	HPLC-UV-VIS rendszer	56
5.2.2	HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS rendszer.....	56
5.3	VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK ELVÁLASZTÁSÁRA KIDOLGOZOTT MÓDSZEREK	58
5.4	MUNKÁM SORÁN HASZNÁLT STANDARDOLDATOK	59
5.5	VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINTARTALOM MEGHATÁROZÁSÁHOZ VÉGZETT MINTAELŐKÉSZÍTÉSEK.....	60
5.5.1	Hozzáadott vitamintartalom meghatározásához végzett mintaelőkészítések	60
5.5.1.1	Sósavas mintaelőkészítés	60
5.5.1.2	Metafoszforsavas mintaelőkészítés	61

5.5.2	<i>Teljes vitamintartalom meghatározáshoz végzett mintaelőkészítés.....</i>	61
6	EREDMÉNYEK	63
6.1	KOMPONENSEK KIVÁLASZTÁSA	63
6.2	VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK EGYÜTTES MEGHATÁROZÁSA RP-HPLC-(UV-VIS) RENDSZERREL.....	64
6.2.1	<i>Standardoldatok</i>	64
6.2.2	<i>Kromatográfiás módszerfejlesztés.....</i>	65
6.2.2.1	<i>Elválasztás kidolgozása.....</i>	66
6.2.3	<i>Stabilitás vizsgálat.....</i>	68
6.2.4	<i>A módszer alkalmazása élelmiszermintán.....</i>	69
6.2.5	<i>A módszer alkalmazása étrend-kiegészítőn.....</i>	69
6.3	VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK EGYÜTTES MEGHATÁROZÁSA IONPÁRKÉPZŐ HASZNÁLATÁVAL RP-IP-HPLC-(UV-VIS) RENDSZERREL	71
6.3.1	<i>A C-vitamin stabilitásának problémái.....</i>	71
6.3.2	<i>A C- és B-vitaminok együttes kromatográfiás meghatározásának problémái</i>	72
6.3.3	<i>A kidolgozott RP-IP-HPLC módszer alkalmazása élelmiszermintákon.....</i>	76
6.3.3.1	<i>Mintaelőkészítés.....</i>	76
6.3.3.2	<i>Élelmiszerminták mérése</i>	77
6.4	VÍZBEN OLDÓDÓ VITAMINOK MEGHATÁROZÁSA RP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS KAPCSOLT RENDSZERREL.....	85
6.4.1	<i>Standardoldatok készítése</i>	85
6.4.2	<i>RP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS módszer kidolgozása.....</i>	86
6.4.2.1	<i>Detektálási paraméterek optimálása.....</i>	86
6.4.2.1.1	<i>Ionforrás paraméterek</i>	87
6.4.2.1.2	<i>Komponensfüggő paraméterek</i>	88
6.4.2.1.3	<i>A vízben oldódó vitaminok anyaionjainak keletkezése, illetve azok feltételezett fragmentálódása.....</i>	91
6.4.2.2	<i>A vízben oldódó vitaminok elválasztásának kidolgozása</i>	93
6.4.2.2.1	<i>Gradiens program kidolgozása.....</i>	94
6.4.2.3	<i>Teljesítményjellemzők meghatározása</i>	98
6.4.2.3.1	<i>Kimutatási határ vizsgálat.....</i>	98
6.4.2.3.2	<i>Ismételhetőség, linearitás, érzékenység vizsgálat.....</i>	99
6.4.3	<i>A módszer alkalmazása élelmiszermintákon</i>	101
6.4.3.1	<i>Szelektivitás vizsgálat</i>	103
6.4.3.2	<i>Mátrixhatás vizsgálat</i>	103
6.4.3.3	<i>Mennyiségi meghatározás.....</i>	104
6.4.4	<i>Az extrakció hatásfokának vizsgálata.....</i>	107
6.5	TERMÉSZETES VITAMINTARTALOM MEGHATÁROZÁS.....	114
6.5.1	<i>A vizsgált analit készlet</i>	115
6.5.2	<i>Komponensfüggő paraméterek optimálása</i>	115
6.5.3	<i>Kromatográfiás elválasztás kidolgozása.....</i>	116
6.5.4	<i>Az összehasonlító vizsgálat eredményei</i>	119
7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	123
8	ÖSSZEFOGLALÁS.....	127
9	SUMMARY	129
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	131
11	MELLÉKLETEK	143

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

B₁	B ₁ -vitamerek, illetve Tiamin (eredmények fejezetben)
B₂	B ₂ -vitamerek, illetve Riboflavin (eredmények fejezetben)
B₃	B ₃ -vitamerek/Niacin
B₅[*]	B ₅ -vitamerek, illetve Pantoténsav (eredmények fejezetben)
B₆	B ₆ -vitamerek, illetve Piridoxin/Piridoxol (eredmények fejezetben)
B₇	B ₇ -vitamerek, Biotin /H-vitamin
B₉[*]	B ₉ -vitamerek/Folátok, illetve Folsav (eredmények fejezetben)
B₁₂	B ₁₂ -vitamerek/Kobalaminok
C	C-vitamin, illetve Aszkorbinsav (eredmények fejezetben)
DAD	Diódasoros Detektor (Diode Array Detector)
DHF	7,8-dihidrofolát
ESI	Elektroporlasztásos Ionizáció (Electrospray Ionization)
FAD	Riboflavin-5'-adenozildifoszfát/Flavin-adenin-dinukleotid
FMN	Riboflavin-5'-foszfát/Flavin-mononukleotid
HFBA	Heptafluoro-vajsav (Heptafluorobutyric acid)
HP	Hippursav (Hippuric acid)
HPLC	Nagyhatékonyságú Folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
IP	Ionpárképző
MeOH	Metanol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Tömegspektrometria(Mass Spectrometry)
MS/MS	Tandem Tömegspektrometria
NA	Nikotinamid
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NS	Nikotinsav
PL	Piridoxal
PLP	Piridoxál-5'-foszfát
PM	Piridoxamin
PMP	Piridoxamin-5'-foszfát

PN	Piridoxin/Piridoxol
PNP	Piridoxin-5'-foszfát
RP	Fordított fázisú (Reversed Phase)
TDP	Tiamin-difoszfát/Tiamin-pirofoszfát
TFA	Trifluoro-ecetsav (Trifluoroacetic acid)
THF	5,6,7,8-tetrahidrofolát
TMP	Tiamin-monofoszfát
TTP	Tiamin-trifoszfát
UV	Ultraibolya (Ultraviolet)
VIS	Láthatófény (Visible)

**Megjegyzés:* A dolgozatban, a táplálkozástudományban általánosan használt pantoténsav és a folsav elnevezések helyett, a vitaminok egységes elnevezése érdekében, illetve gyakorlati okokból (táblázat, ábra) a B₅- és a B₉-vitamin megnevezéseket használtam.

2 BEVEZETÉS

Napjainkban világszerte egyre nagyobb teret hódítanak maguknak a különböző szív- és érrendszeri, valamint rosszindulatú daganatos betegségek. Magyarországon az elhalálozások mintegy háromnegyed részéért ezek a betegségek felelősek. A helyzet súlyosságát az is mutatja, hogy Magyarországon a daganatos betegségekből eredő halálozás tendenciája egyre növekvő, Európában a legnagyobb [ZAJKÁS, 2004]. Ezen betegségek kialakulásának hátterében sokszor a helytelen életmód és a helytelen táplálkozás áll. Sokan rossz szokásból vagy rossz anyagi körülményekből kifolyólag egyoldalúan táplálkoznak, és nem jutnak hozzá megfelelő mennyiségben azokhoz a létfontosságú anyagokhoz, melyek a szervezet zavartalan működésének fenntartásához elengedhetetlenek.

Ezek közé az anyagok közé tartoznak a **vitaminok** is. Már elnevezésük is (vita = élet) az egészség fenntartásában való fontos szerepükre utal. A vitaminok kis mennyiségben ugyan, de nélkülözhetetlenek számos élettani folyamat zavartalan lezajlásához. Hiányuk a fent említettek mellett számtalan súlyos betegség kialakulásának okozója. A vitaminhiány világszerte, a fejlődő és a fejlett ipari országokban egyaránt komoly probléma. Világviszonylatban az A-vitaminhiány a legjelentősebb. A C-, D-és B-vitaminhiány a Föld lakosságának szintén jelentős hányadát veszélyezteti. A magyar lakosság körében a „magzatvédő” vitaminok (folsav, B₂-, B₆-, B₁₂-vitaminok) elégtelen bevitele a leggyakoribb. Hiányuk súlyos fejlődési rendellenességek kialakulását vonhatja maga után. Az Országos Élelmezés-biztonsági és Táplálkozástudományi Intézet (OÉTI) felmérése azt bizonyítja, hogy a magyar lakosság jelentős része nem fogyaszt természetes úton elegendő mennyiséget ezekből a vitaminokból [ZAJKÁS, 2004].

A vitamin-, és ásványianyag-hiány következtében fellépő betegségek jelentős része megfelelő életmóddal és táplálkozással megelőzhető lehetne. Így világszerte a szakértők fő célja az emberek egészségtudatos táplálkozásra nevelése. Ez azonban hosszadalmas és sokszor akadályokba ütköző folyamat. Sok esetben ugyanis az emberek hiányos táplálkozásának hátterében a rossz anyagi körülmény áll. Ezért egyre több ország táplálkozás politikájának válik jelentős részévé az alapvető élelmiszerek (pl.: liszt, só) vitaminokkal és ásványi anyagokkal történő dúsítása, megteremtve ezzel minden társadalmi réteg számára az egészséges táplálkozás alapvető feltételeit.

A táplálkozási ismeretek a lakosság egyre szélesedő körében történő terjedése következtében egyre növekszik az a társadalmi réteg, mely törekszik az egészségtudatos

táplálkozásra. A gyógyszer- és élelmiszeripar, figyelembe véve az emberek ilyen irányú igényét, egyre több olyan terméket fejleszt ki és hoz forgalomba, melyek beltartalmuk, biológiai hasznosulásuk alapján többlet egészségügyi hatással rendelkeznek. A korszerű táplálkozástudományi ismeretek alapján előállított **étrend-kiegészítők**, illetve hozzáadott vitaminokat vagy más egészségmegőrzést szolgáló adalékokat tartalmazó **funkcionális élelmiszerek** egyre szélesebb skálája áll a fogyasztók rendelkezésére.

A vitaminozott élelmiszerek megjelenése, illetve egyre nagyobb ütemben történő elterjedése maga után vonja a minőségellenőrzést szolgáló, így a fogyasztók védelmét biztosító korszerű, gyors és költség-hatékony analitikai módszerek kidolgozásának szükségességét.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A vitaminok általános jellemzése

A vitaminok kutatásának kezdete 1896-ra tehető, amikor is Eijkman holland börtönorvos csirkéken végzett kísérletei során felfedezte, hogy a hántolt rizzsel etetett csirkéken a beri-beri betegség tünetei mutatkoztak, szemben a hántolatlan rizzsel tápláltsakkal. Funk, 1912-ben kimutatta, hogy a rizs korpájában található, kémiai szempontból az aminok tulajdonságát mutató hatóanyag megakadályozza a beri-beri kialakulását. Az ilyen életfontosságú aminok elnevezésére a vitamin kifejezést javasolta [GASZTONYI, 1992].

Ma már tudjuk, hogy a vitaminok többsége nem amin, de általánosan ezt az elnevezést használjuk azokra a természetes anyagokra, amelyek hiánya betegséget okoz. Tehát a **vitaminok** olyan változatos kémiai szerkezetű, szerves vegyületek, melyeket az emberi szervezet nem képes elegendő mennyiségben előállítani, de kis mennyiségben nélkülözhetetlenek annak zavartalan működéséhez [BALL, 2006].

A vitamin fogalom azonban relatív. Például a C-vitamint az ember, a majom, a tengerimalac és a gyümölcssevő denevér kivételével minden eddig vizsgált állatfaj glükózból képes előállítani, így a C-vitamin csak ezen élőlények számára nélkülözhetetlen vitamin. Mai ismereteink alapján az emberi szervezet zavartalan működésében 13 vitamin játszik szerepet, melyek oldhatóságuk alapján két csoportra, zsírban, illetve vízben oldódó vitaminokra oszthatók. A zsírban oldódó vitaminok csoportjába soroljuk az A-, D-, E- és K- vitaminokat, illetve a különböző mértékű A-vitaminhatással rendelkező karotinoidokat. A vízben oldódó vitaminok csoportját a C-, illetve a B-vitaminok (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂) alkotják [BALL, 2006].

A vitaminok elnevezésére nincs egységes, nemzetközileg elfogadott eljárás. A vitaminkutatás első szakaszában a latin ABC betűit használták erre a célra (A-, B-, C-vitamin), de ez a rendszer nem egyöntetű, mivel a későbbi kutatások során számos vegyületről bebizonyosodott, hogy azonos egy előbbieken már elnevezett vitaminnal, vagy, hogy mégsem tekinthető vitaminnak. Az utóbbi csoportba tartozó vegyületeket vitaminoidoknak nevezzük (pl.: esszenciális zsírsavak, koenzim-Q) [GASZTONYI, 1992].

A hasonló élettani hatású, de különböző eredetű, illetve eltérő kémiai szerkezetű vitaminokat, az azonos betű mellé tett számindex jelöli (pl.: A₁-, A₂-, B₁-, B₂, D₂-, D₃-vitamin). Ezen kívül egyes vitaminokat biológiai hatásuk vagy kémiai szerkezetük alapján is elneveztek.

Így például, amíg az aszkorbinsav elnevezés a C-vitamin skorbutellenes hatását tükrözi, addig a nikotinsav vagy a nikotinamid a B₃-vitamin kémiai szerkezetére utal [GASZTONYI, 1992].

Azonban a számindexes betűjelölés sem minden esetben egyértelmű. Ugyanis a vitaminkutatás előrehaladtával fény derült arra, hogy egyes vitaminok esetében nem csak egy, hanem számos, kémiai felépítésükben rokon vegyület rendelkezik különböző mértékben az adott vitaminra jellemző biológiai aktivitással. Például B₆-vitaminhatása hat különböző vegyületnek is van. Ezeket az azonos élettani hatású, rokon vegyületeket **vitamereknek** nevezzük [BALL, 2006].

A vitaminok fentiekben említett definíciója alapján a szervezet megfelelő vitamin-ellátottsága csak külső táplálékforrásból biztosítható. A definíció pontosítása végett szükséges még megemlítenem az úgynevezett **provitaminokat**. Ezek olyan biológiai aktivitás nélküli vegyületek, melyeket az emberi szervezet különböző anyagcsere folyamatok során vitaminokká képes átalakítani. Ilyen provitamin például az ergoszterin, melyekből D-vitamin keletkezik [GASZTONYI, 1992].

3.2 A vízben oldódó vitaminok és vitamerek szerkezeti felépítése

Amint azt már az előző fejezetben említettem, a vízben oldódó vitaminok csoportját igen változatos szerkezetű vegyületek alkotják (I. Melléklet). Ezen anyagok sokszínűségét fokozza az is, hogy egy adott vitaminhatással számos – sok esetben csak egy-egy funkciós csoportban különböző – rokon vegyület (vitamer) rendelkezik. Ezen vegyületek mind előfordulási gyakoriságukban, stabilitásukban, mind hatásuk mértékében különbözőséget mutatnak. Emiatt, legyen szó akár a különböző vitaminokkal dúsított élelmiszerekről, vitaminkészítményekről, akár ezek vitamintartalmának meghatározásáról, fontosnak tartom a különböző vitamerek részletezését is.

A természetben a **B₁-vitamin** *tiaminként* (szabad forma), illetve annak három foszforilált formájaként fordul elő. Az élő szövetekben túlnyomó részben *tiamin-difoszfátként* (TDP), vagy más néven tiamin-pirofoszfátként van jelen. Az állati szövetekben kis mennyiségben *monofoszfát* (TMP) és *trifoszfát* (TTP) észterei is megtalálhatók.

A **B₂-vitamerek** a flavinok csoportjába tartozó színes vegyületek. A természetben előforduló legjelentősebb B₂-vitaminaktivitást mutató flavin vegyületek a *riboflavin*, a *riboflavin-5'-foszfát* (flavin-mononukleotid, FMN), és a *riboflavin-5'-adenozildifoszfát* (flavin-adenin-dinukleotid, FAD).

A **B₃-vitamin**, más néven niacin gyűjtőnév, két azonos biológiai aktivitású vegyületet, a *nikotinsavat* (piridin 3-karboxilsavat) és a *nikotinamidot* (piridin 3-karboxamidot) foglalja magába. A piridin karbonsav származéka a nikotinsav. A nikotinsav amidja a nikotinamid. A szabad nikotinsav a szervezetben nikotinamiddá alakul át. Az élő szervezetben a nikotinamid a piridin enzimek dinukleotid jellegű koenzimjeinek, azaz a *nikotinamid-adenin-dinukleotid* (NAD) és a *nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát* (NADP) reakciócsoportja.

A **B₆-vitamin** elnevezés alatt az összes olyan 3-hidroxi-2-metilpiridin származékot értjük, melyek azonos piridoxin jellegű biológiai aktivitással rendelkeznek. Hat piridoxin hatású vegyület ismert, úgy mint a *piridoxin* vagy más néven piridoxol (PN), a *piridoxal* (PL), a *piridoxamin* (PM), valamint ezen vegyületek *5'-foszfátészterei* (PNP, PLP, PMP). A B₆-vitamin főként piridoxal-5'-foszfát formájában fejt ki élettani hatását, így a szervezetben a legtöbb piridoxin hatású vegyület ilyen foszfátszármazékká alakul át. A növényi szövetekben a piridoxin leggyakrabban 5'-O-(β-D-glükopiranozil)-piridoxin (PN-glükozid) kötésben fordul elő [BALL, 2006].

A **B₅-vitamin**, más néven *pantoténsav*, azon ritka, természetes vegyületek közé tartozik, melyek nem alfa-, hanem béta-aminósavat tartalmaznak. A molekula optikailag aktív, de csak a D(+)-enantiomerje fordul elő a természetben. A természetben más pantoténsav hatású vegyület is megtalálható. Ilyen például a *pantotenol*, mely a szervezetben pantoténsavvá oxidálódik, vagy a *pantetein*, ami a pantoténsav és a cisztein kapcsolódásából származó pantotenilcisztein dekarboxilezési terméke.

A **B₇-vitamin**, más néven *biotin* (H-vitamin) lehetséges nyolc sztereoizomerje közül csak a (+)D-biotin fordul elő a természetben és rendelkezik vitaminaktivitással.

A **B₉-vitamin** esetében a *folát* elnevezés a vitamin aktivitású pteroesav származékok vegyületcsoportját jelöli. A *folsav*, más néven pteroilmonoglutamát (PteGlu) alapvegyülete a pteroesav, melyhez egy L-glutaminsav kapcsolódik. A folsav a természetben redukált formában, *7,8-dihidrofolátként* (DHF), illetve *5,6,7,8-tetrahidrofolátként* (THF) van jelen. A THF 1-szénatomos vegyületrészekkel kiegészülve (*5-formil-, 10-formil-, 5-metil-, 5-formimino-, 5,10-metilén, 5,10-metenil-THF*) számos enzim koenzimjének felépítésében vesz részt. A folátok a természetben nagyrészt 5-7 γ -peptid kötésben kapcsolódó glutamátot tartalmazó poliglutamátként vannak jelen, melyek a szervezetben monoglutamáttá alakulnak.

A **B₁₂-vitamin** név a *kobalaminok* csoportját jelzi. A molekula központi kobalt atomjához különböző funkciós csoportok kapcsolódhatnak, úgymint cianid- (-CN), hidroxil- (-OH), nitritgyök (-NH₂), víz molekula (H₂O), metilcsoport (-Me) vagy 5'-deoxiadenozil. Elnevezésük ennek megfelelően: *cianokobalamin, hidroxokobalamin, nitritkobalamin, akvakobalamin, metilkobalamin és adenzilkobalamin*. A cianokobalamin szintetikus, B₁₂-vitaminhatású molekula. A természetben a kobalaminok főként hidroxokobalamin, metilkobalamin és adenzilkobalamin formájában fordulnak elő.

A **C-vitamin** két enantiomer párja létezik, úgymint az *L-, és D-aszkorbinsav*, valamint az *L-, és D-izoaszkorbinsav*. Az L-aszkorbinsav rendelkezik a legjelentősebb biológiai aktivitással. A D-aszkorbinsav és az L-izoaszkorbinsav csak mesterséges körülmények között fordul elő, vitaminhatásuk elhanyagolható. Az L-aszkorbinsav könnyen *dehidroaszkorbinsav*vá oxidálódik, mely a szervezetben is lejátszódó reverzibilis folyamat. A dehidroaszkorbinsav teljes értékű C-vitamin hatással rendelkezik, mivel a szervezetben azonnal L-aszkorbinsavvá redukálódik [BALL, 2006].

3.3 A vízben oldódó vitaminok stabilitása

Az ember vitaminszükségletének egy részét a frissen elfogyasztott zöldségekből és gyümölcsökből fedezi. Ezen élelmiszerek természetes vitamintartalma főként mátrixhoz kötött formában van jelen, mely biztosítja az egyes komponensek bizonyos mértékű stabilitását. A feldolgozott élelmiszerek esetében nagyobb hangsúlyt kell fektetni a vitaminok stabilitásának megővésére. Ez fokozottan igaz a főként szabad vitaminformákat tartalmazó, dúsított élelmiszerek esetén, ahol a dúsítási folyamat során a termékhez adott vitaminok különböző eredetű és mértékű környezeti hatásoknak vannak kitéve. Fontos tehát ismernünk az egyes vitaminok stabilitási jellemzőit.

A **tiamin** savas pH-n stabil, de a közeg pH-jának növekedésével egyre inkább csökken a különböző tényezőkkel (hő, kémiai reakciók) szembeni ellenállása. A tiamin a B-vitaminok közül a leghőlabilisabb. A fehérjék védelmet biztosítanak a tiamin számára, így az élelmiszer mátrixokban jobban ellenáll a hő-degradációnak, mint vizes oldatban. Élelmiszerek tárolása során bekövetkező veszteség fagyasztással és szárítással csökkenthető. Az élelmiszerek feldolgozása során fennálló lúgos közeg elősegíti a tiamin bomlását. Például sütőpor használata a liszt eredeti tiamin tartalmának 50%-os veszteségét okozhatja [LESKOVA, 2006]. Az élelmiszerekhez adott szulfitek, melyek a termék színének megőrzését, illetve az aszkorbinsav oxidációjának gátlását biztosítják, a tiaminra nézve káros hatásúak. [BELITZ, 2004].

A **riboflavin** oldott állapotban UV és látható fény hatására könnyen degradálódik, mely folyamat a hőmérséklet, illetve a pH emelkedésével csak fokozódik. Fénytől védve a riboflavin vizes oldata pH 2-5 tartományban 120 °C-ig hőstabil, pH 7 felett gyors degradációja következik be. Fénytől elzárva a riboflavin stabil marad oxigén és számos oxidáló ágensek jelenlétében is [BALL, 2006]. Általánosságban elmondható, hogy a riboflavin az élelmiszerek szokásos feldolgozása során megőrzi stabilitását [BELITZ, 2004].

Az oxigén, a fény és a hő a **B₃-vitamin** egyik formájára sem gyakorol kedvezőtlen hatást vízmentes, illetve semleges közegben. Az oxidált koenzimek (NAD⁺, NADP⁺) lúgos közegben, míg a redukáltak (NADH, NADPH) savas közegben labilisak. Az élelmiszerek tárolása és feldolgozása nem jár szignifikáns niacin veszteséggel [BALL, 2006].

A legtöbb B-vitaminnal szemben a **pantoténsav** stabilitása a pH növekedésével együtt fokozódik, pH 5-7-es tartományban a legstabilabb. Ettől a tartománytól eltérő pH-n hő-labilis. A levegő oxigéntartalma és a fény nem befolyásolja stabilitását. Az élelmiszerek feldolgozása csak minimális pantoténsav veszteséggel jár [BALL, 2006].

A **B₆-vitamin** hő-degradációja a pH növekedésével fokozódik [BALL, 2006]. A B₆-vitaminról általánosságban elmondható, hogy amíg elhúzódó hőkezelésre érzékeny, addig a levegő oxigénje nincs rá negatív hatással. A B₆-vitamin stabilitása az élelmiszerek feldolgozása során nagymértékben függ a jelenlévő vitamér típusától, ugyanis a *piridoxin* (PN) sokkal ellenállóbb, mint a *piridoxál* (PL) és a *piridoxamin* (PM). Ebből az következik, hogy a növényi eredetű termékek feldolgozása során, melyek főként piridoxint tartalmaznak, jóval kisebb a B₆-vitamin veszteség, mint az állati eredetű termékeknél, melyekben a piridoxál, és a piridoxamin jelenléte a jellemző [BALL, 2006; BELITZ, 2004; LESKOVA, 2006].

A **B₉-vitamin** vitamerei stabilitásukban igen nagy eltérést mutatnak. A legstabilabb folát a *folsav*. A pH csökkenése stabilitásának csökkenését vonja maga után. A folátok aktivitása fény hatására jelentősen csökken. A THF vas(III) és réz(II) ionok jelenlétében könnyen oxidálódik. Antioxidánsokkal (pl.: aszkorbinsavval) a folátok stabilitása növelhető. A folsav jó ellenállást mutat az élelmiszerek feldolgozásakor [BALL, 2006; BELITZ, 2004].

A cianokobalamin a legstabilabb **B₁₂-vitamin** aktivitású vegyület. A cianokobalamin vizes oldatban, szobahőmérsékleten oxigén jelenlétében stabil marad. Stabilitásához a legkedvezőbb a 4,5-5 pH tartomány. A B₁₂-vitamin aktivitását vesztí vizes közegben erős oxidáló, valamint nagy mennyiségű redukáló ágensek (aszkorbinsav, szulfit) jelenlétében. Fény hatására a cianokobalamin hidroxokobalaminná alakul, megőrizve B₁₂-vitaminaktivitását [BALL, 2006; BELITZ, 2004].

A vízben oldódó vitaminok közül a **C-vitamin** az egyik legérzékenyebb. Stabilitását számos tényező befolyásolja. Vizes oldatban, savas (pH 3-4,5) körülmények között jobb stabilitást tanúsít, mint 5-7 pH tartományban. A hőmérséklet a C-vitamin stabilitásának egyik legjelentősebb befolyásoló tényezője. A magas hőmérséklet a C-vitamin nagyfokú degradációját eredményezi. Az aszkorbinsav bomlása 4°C körüli hőmérséklettel lassítható. Az aszkorbinsav inaktiválódását a látható és az UV fény egyaránt előidézi. Oxigén és fém ionok (vas(III), réz(II)) jelenléte az aszkorbinsav irreverzibilis oxidációját okozhatják 2,3-diketogulonsavvá [BALL, 2006; BELITZ, 2004].

3.4 Vízben oldódó vitaminok természetes forrása

Annak köszönhetően, hogy az állati szövetekben kivétel nélkül, míg a növényi szövetekben a B₁₂-vitamin kivételével a B-vitaminok különböző mennyiségben és formában vannak jelen, minden természetes, és még feldolgozatlan élelmiszer B-vitamin forrásnak tekinthető. Számos állati és növényi eredetű termék magas vitamintartalmának köszönhetően kiemelkedő helyen áll az élelmiszerek között.

Az **állati eredetű** táplálékok közül a *máj* különös jelentőséggel bír, mivel nagy mennyiségben tartalmazza a vízben oldódó vitaminok csoportjának összes tagját (B- vitaminok, C-vitamin). Fogyasztás szempontjából az állati belsőségek közül magas C- és B₁₂-vitamintartalmának köszönhetően jelentős szerv még a szív, valamint a vese, melyben a B₃-és a B₇-vitamin kivételével minden vízben oldódó vitamin megtalálható. A különböző *húsok* szintén fontos B-vitamin források (B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂). Az állati eredetű élelmiszerek közül kiemelendő termék még a *tojás*, magas B₂-, B₃-, B₅-, B₇-, B₁₂-vitamintartalmának, illetve a *tej*, jelentős B₂- és B₁₂-vitamintartalmának köszönhetően.

A **növényi eredetű** termékek közül a friss gyümölcs- és zöldségnövények főként C-vitamin tartalmuk következtében játszanak fontos szerepet az emberi táplálkozásban. Kiemelkedő C-vitamin forrás a káposzta- és salátafélék, a paprika, a paradicsom, a burgonya, a citrusfélék, a fekete ribizli és a csipkebogyó. A spárga, a brokkoli, a kelbimbó és a levélzöldségek B₉-, a brokkoli B₅-és B₉-, a burgonya B₆-vitamint tartalmaz nagy mennyiségben a C-vitamin mellett. Jelentős B₁-, B₃-, B₆-vitaminforrás szerepét töltik be a hüvelyesek, a földimogyoró, és a gabonamagvak. Ezen felül a földimogyoró még magas B₇-, a gabonamagvak jelentős B₂-vitamintartalommal rendelkeznek [BALL, 2006; BELITZ, 2004; RODLER, 2005].

Az állati és növényi eredetű élelmiszereken kívül, még meg kell említenem az **élesztőt**, mely kiemelkedő forrása a B₁-, B₂-, B₃-, B₅- és B₆-vitaminoknak [RODLER, 2005].

Az élelmiszerekben a vízben oldódó vitaminok különböző formái szabadon vagy egyéb élelmiszer-komponensekhez kötődve fordulnak elő. A **B₁-, B₂- és B₆-vitamin** szabad tiamin, riboflavin, piridoxin, piridoxal és piridoxamin formában vagy foszforilált, főként TDP, FMN, FAD és PLP formában vannak jelen. Továbbá szoros, de nem kovalens kötással fehérjéhez kapcsolódhatnak. Amíg a **B₆-vitamin** az állati szövetekben túlnyomó részben fehérjéhez kötve piridoxal-foszfátként (PLP), addig a növényi eredetű táplálékokban piridoxinként van jelen. A növényekben a piridoxin egy része cukrokhoz kötődik glükózidot (PN-glükózid) alkotva [BALL, 2006].

A **B₃-vitamin** az élelmiszerekben nikotinamid formájában van jelen, mely főként a NAD hidrolízisével keletkezik. A NAD triptofánból is felépülhet, ha triptofán túlkínálat mutatkozik. Ezekre való tekintettel vezették be a niacin ekvivalens fogalmát: 60 mg L-triptofánból annyi NAD keletkezik, mint 1 mg nikotinamidból. A gabonafélék B₃-vitamintartalmának 85-90%-át niacinogén vagy niacitin, azaz fehérjéhez kötött nikotinsav alkotja.

A **pantoténsav** szabadon, illetve koenzim-A-hoz kötve egyaránt megtalálható. A **biotin** a többi vízben oldódó vitaminhoz képest nagyon kis mennyiségben fordul elő az élelmiszerekben. Az állati eredetű táplálékokban, a gabonafélékben és aogyoróban fehérjéhez kötött, a zöldség- és gyümölcsnövényekben, valamint a tejben szabad formában található meg.

A természetben előforduló **B₁₂-vitamint** kizárólag baktériumok és egyéb, a talajban, a vízben és az állatok bélrendszerében élő mikroorganizmusok termelik. A növényekben nyomokban előforduló B₁₂-vitamin a talajból vagy a trágyázásból eredő mikrobiológiai szennyeződés eredménye. Néhány pillangós növény gyökérgumóiban található baktériumok is képesek B₁₂-vitamin szintézisre. A B₁₂-vitamin számos formában jelen van az állati eredetű élelmiszerekben, melyek közül az adenosil- és a hidroxokobalamin a leggyakoribb.

A **C-vitamin** az élelmiszerekben aszkorbinsav, illetve dehidroaszkorbinsav formában egyaránt megtalálható [BALL, 2006].

A B-vitaminok néhány formája az emberek számára egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben hasznosítható. Ide tartozik a fentiekben már említésre került FAD fehérjéhez kovalensen kötött alakja, a PN-glükózid, a niacinogén valamint a niacitin [BALL, 2006]. Az **1. táblázatban** néhány élelmiszer vízben oldódó vitamin tartalmát tüntettem fel.

1. táblázat: Néhány élelmiszertermék vízben oldódó vitamin tartalma [BELITZ, 2004]

Élelmiszertermék	B₁ mg ^a	B₂ mg ^a	B₃^b mg ^a	B₅^c mg ^a	B₆ mg ^a	Biotin μg ^a	Folsav μg ^a	B₁₂ μg ^a	C mg ^a
Tejtermékek									
Tehéntej	0,04	0,18	0,09	0,35	0,04	3,50	6,70	0,40	1,70
Vaj	0,005	0,02	0,03	0,05	0,005				0,20
Sajt (Camembert)	0,04	0,37	0,95	0,70	0,20	2,80	38,0	2,40	
Tojás									
Tojássárga	0,29	0,40	0,07	3,73	0,30	53,0	159,0	2,00	0,30
Tojásfehérje	0,02	0,32	0,09	0,14	0,01	7,00	9,20	0,10	0,30
Hústermékek									
Marhahús	0,01	0,08	0,26	7,50	0,31	0,24	3,00	3,00	5,00
Sertéshús	0,90	0,23	5,00	0,70	0,40			0,80	
Sertés máj	0,31	3,20	15,7	6,80	0,60	30,0	220	40,0	23,0
Sertés vese	0,34	1,80	8,40	3,10	0,60			20,0	16,0
Haltermékek									
Hering	0,04	0,22	3,80	0,90	0,50	4,50	5,00	8,50	0,50
Gabonatermékek									
Gabonamag	0,48	0,09	5,10	1,20	0,27	6,00	87,0		
Búzaliszt (550)	0,11	0,03	0,50	0,40	0,10	1,10	16,0		
Búzacsíra	2,01	0,72	4,50	1,00	0,50	17,0	520		
Kukorica	0,36	0,20	1,50	0,70	0,40	6,00	26,0		
Hántolatlan rizs	0,41	0,09	5,20	1,70	0,28	12,0	16,0		
Hántolt rizs	0,06	0,03	1,30	0,60	0,15	3,00	11,0		
Zöldségfélék									
Gomba (termesztett)	0,10	0,44	5,20	2,10	0,07	16,0	25,0		4,90
Burgonya	0,11	0,05	1,20	0,40	0,31	0,40	22,0		17,0
Fejessaláta	0,06	0,08	0,30	0,10	0,06	1,90	59,0		13,0
Lencse (szárított)	0,48	0,26	2,50	1,40	0,60		168		7,00
Sárgarépa	0,07	0,05	0,60	0,30	0,27	5,00	26,0		7,10
Spenót	0,09	0,20	0,60	0,30	0,22	6,90	145		52,0
Paradicsom	0,06	0,04	0,50	0,30	0,10	4,00	22,0		19,0
Káposzta (fehér)	0,05	0,04	0,30	0,30	0,19	3,10	31,0		48,0
Gyümölcsfélék									
Narancs	0,08	0,04	0,30	0,20	0,10	2,30	29,0		50,0
Eper	0,03	0,05	0,50	0,30	0,06	4,00	43,0		64,0
Csipkebogyó	0,09	0,06	0,48		0,05				1250
Fekete ribizli	0,05	0,04	0,28	0,40	0,08	2,40	8,80		177
Meggy	0,05	0,06	0,40				75,0		12,0
Élesztők									
Sütőélesztő (préselt)	1,43	2,31	17,4	3,50	0,68	33,0	716		
Sörélesztő (szárított)	12,0	3,80	44,8	7,20	4,40	20,0	3200		

^a A megadott értékek 100g fogyasztott termékre vonatkoznak, ^b nikotinamid, ^c pantoténsav

3.5 Vitaminszükséglet

A szervezetben lejátszódó anyagcsere folyamatok szabják meg a vitaminszükséglet mértékét, mely ebből kifolyólag bizonyos határok között folyton változik. A napi vitaminszükséglet nem minden emberre nézve egységes érték, mert függ az életkortól, az egészségi állapottól, a végzett munka jellegétől stb.. Az Amerikai Táplálkozástani Intézet (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies) meghatározta és egységesítette az egyes vitaminok és ásványi anyagok optimális beviteli mennyiségét, melyet RDA-nak (***Recommended Dietary Allowance***), azaz ajánlott napi tápanyagbevitelnek nevezett el. Az RDA értéket úgy állították be, hogy az kortól és nemtől függetlenül fedezze közel minden egészséges ember vitamin és ásványi anyag szükségletét. Az RDA értékeket az EAR (***Estimated Average Requirement***) értékből, azaz a becsült átlagos szükségletből számították ki, amely azt a becsült mennyiséget fejezi ki, mely fogyasztásával a vitaminhiány kialakulásának (az emberek elégtelen vitamin és ásványi anyag bevitelének) valószínűsége 50%. A vízben oldódó vitaminok ajánlott napi bevitelét a **2. táblázat** foglalja össze. A biotin és a pantoténsav esetében a hiányos ismeretekből fakadóan, az RDA helyett az AI (***Adequate Intake***), azaz az ajánlott beviteli érték található. Ez egy megközelítő értéket jelöl, amit különböző csoportokon végzett megfigyelésekből származtattak [DRI, 2004].

2. táblázat Vízben oldódó vitaminok ajánlott napi bevitelle (RDA, Recommended Dietary Allowances) [DRI, 2004]

Korosztály	C (mg/nap)	Tiamin (mg/nap)	Riboflavin (mg/nap)	Niacin (mg/nap) ^a	B₆ (mg/nap)	Folát (μg/nap) ^b	B₁₂ (μg/nap)	B₅ (mg/nap) ^c	Biotin (μg/nap)
Csecsemő									
0-6 hónap	40*	0,2*	0,3*	2*	0,1*	65*	0,4	1,7*	5*
7-12 hónap	50*	0,3*	0,4*	4*	0,3*	80*	0,5	1,8*	6*
Gyerek									
1-3 év	15	0,5	0,5	6	0,5	150	0,9	2*	8*
4-8 év	25	0,6	0,6	8	0,6	200	1,2	3*	12*
Férfi									
9-13év	45	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	4*	20*
14-18 év	75	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	5*	25*
19-30 év	90	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	5*	30*
31-50 év	90	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	5*	30*
51-70 év	90	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	5*	30*
>70 év	90	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	5*	30*
Nő									
9-13év	45	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	4*	20*
14-18 év	65	1,0	1,0	14	1,2	400	2,4	5*	25*
19-30 év	75	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	5*	30*
31-50 év	75	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	5*	30*
51-70 év	75	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	5*	30*
>70 év	75	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	5*	30*
Várandós anyák									
14-18 év	80	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	6*	30*
19-30 év	85	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	6*	30*
31-50 év	85	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	6*	30*
Szoptatós anyák									
14-18 év	115	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	7*	35*
19-30 év	120	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	7*	35*
31-50 év	120	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	7*	35*

(Forrás: Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies DRI riport, www.nap.edu)

*AI (Adequate Intakes) ajánlott beviteli érték

^a NE niacin ekvivalens érték 1mg niacin=60 mg triptofán

^b DFE (Dietary Folate Equivalents) étkezési folát ekvivalens érték 1DFE=1 μg élelmiszer folát = 0,6 μg folsav (dúsított élelmiszerekből vagy vitaminkészítményekből)

^c Pantoténsav

3.6 A vízben oldódó vitaminok szerepe az élő szervezetben

A vitaminok az emésztőcsatornából felszívódva, katalitikus vagy szabályzó tényezőként kapcsolódnak be az élettani folyamatokba. A vitaminok energiát nem szolgáltatnak, de kis mennyiségben nélkülözhetetlenek az anyag- és energiaforgalom elősegítéséhez. A B-vitamin csoportjának számos tagja (melyek a lebontó anyagcsere folyamatokban játszanak szerepet) katalizáló enzimek koenzimjeként vesz részt a szervezet energia ellátásában. Ezeket a vitaminokat **prosztetikus vitaminoknak** nevezzük. A koenzimek jellemzően egy fehérjéből (apoenzimből) és az ehhez kapcsolódó vitaminból épülnek fel. A koenzim vitamin része teszi lehetővé az enzim szubsztráthoz való kapcsolódását. Ha a megfelelő vitamin nem áll rendelkezésre a koenzim felépüléséhez, akkor az anyagcsere folyamatok menetében zavar keletkezik. Ennek következtében az a termék, melynek az átalakítása blokkolt, felhalmozódik a szervezetben, vagy egy alternatív anyagcsere folyamat megy végbe [BALL, 2006; RODLER, 2005]. A vízben oldódó vitaminok élettani hatását, valamint hiányukban kialakuló betegségeket, illetve azok tüneteit a **3. táblázatban** foglaltam össze.

Számos vitamin együttesen fejti ki élettani hatását. Például a vörös-és fehérvérsejtek, valamint a véralvadáshoz szükséges vérlemezék képződésének szabályozásában a B₉- és a B₁₂-vitaminok együttesen vesznek részt. A vér homocisztein szintjének szabályozásához az előbbi két vitaminon kívül a B₆-vitamin jelenléte is nélkülözhetetlen. B₂-vitamin szükséges a NADH oxidációjához, a NAD triptofánból történő szintéziséhez, valamint a B₆-vitamerek és a folátok egymásba átalakulásához. A C-vitamin regenerálja a redukálódott α -tokorefolt [RODLER, 2005].

A helytelen táplálkozás az emberi szervezet elégtelen vitaminellátottságát vonva maga után anyagcserezavarokhoz vezethet. Az ennek következtében fellépő hiánytünetek vitaminhiányos állapotról árulkodnak, melyet **hipovitaminózisnak** nevezzük, súlyosabb változata az **avitaminózis** [GASZTONYI, 1992].

A vízben oldódó vitaminok hiánytünetei szinte azonnal jelentkeznek. Amíg néhány B-vitamin hiánya jellemző tünetekkel járó betegségekben mutatkozik meg, addig más B-vitaminok hiánytünetei alig észrevehetőek. Egyes B-vitaminok esetében a kialakult tünetek nagyon hasonlóak lehetnek, melyek valódi okának téves felismerése, és helytelen kezelése, akár súlyos következményekkel is járhat. Például a folsav- és a B₁₂-vitamin hiányát, az idegrendszeri kórjelek megjelenéséig, csak a vérkép alapján lehet megkülönböztetni, a klinikai tünetek azonosak. A B₁₂-vitamin a B₉-vitamin aktív formájának (THF) regenerálódásában vesz részt.

Hiányában a B₉-vitamin inaktív formája felhalmozódik. Így abban az esetben, ha B₁₂-vitaminhiányban szenvedő beteget tévesen B₉-vitaminhiánnyal kezelik, a B₉-vitamin túlzott bevitele (B₁₂-vitamin nélkül) visszafordíthatatlan idegrendszeri károsodást okozhat. Ugyanis ebben az esetben a látható tünetek a B₉-vitamin fogyasztásával enyhülnek, de a B₁₂-vitamin hiányában fellépő idegi degeneráció kezeletlen marad. Ebből kifolyólag a vitaminkészítmények ezeket a vitaminokat mindig együtt tartalmazzák [ALLEN, 2006; BALL, 2006; RODLER, 2005].

Vitaminhiány a következő okokból léphet fel:

- helytelen táplálkozás
- felszívódási zavarok, nem megfelelő hasznosulás
- antivitaminok jelenléte
- fokozott kiválasztódás, megnövekedett szükséglet
- alkoholizmus

A **helytelen táplálkozásból** eredő vitaminhiány egyik jellegzetes példája a B₁-vitamin hiányában kialakuló betegség, a beriberi. Ez napjainkban is jelentős réteget érint, főként Kelet-Ázsiában, ahol a fő táplálék a hántolt rizs [FLETCHER, 2004].

Nagyfokú B₁₂-vitaminhiány **rendellenes felszívódás**, illetve helytelen gyomornedv kiválasztás esetén, vagy gyomorműtétek után léphet fel, ugyanis felszívódásához feltétlenül szükséges egy mukoprotein (intrinsic factor), amely a gyomorfalban képződik és a normális gyomornedvben mindig megtalálható [RODLER, 2005].

Az **antivitaminok** a vitaminok hatását inaktiváló szerves vegyületek. Hatásukat azonos kémiai szerkezetük révén fejtik ki, mint kompetitív gátlók, enzimek vagy komplexképzők. Főként a koenzim szerepet betöltő vitaminok hatását korlátozzák, kiszorítva azokat az enzimből, ezáltal biológiailag hatástalan enzimeket eredményezve. Ilyen antivitamin pl. a lilakáposztában található tiamináz, mely a tiamint hatástalanítja.

Az antivitaminok jelenléte és a helytelen táplálkozás sok esetben összefügg egymással. A niacin hiányának kialakulása például azokat veszélyezteti, akik főként kukoricaalapú élelmiszereket fogyasztanak. Ennek az az oka, hogy a kukorica mellett, hogy nikotinamidban szegény, tartalmazza annak antivitaminját, az indolecetsavat is, mely a táplálék többi alkotórészeivel bevitt B₃-vitamin biológiai hatását is semlegesíti [GASZTONYI, 1992].

A vitaminhiány kialakulását a szervezet **vitaminraktározó képessége** is befolyásolja. Az egyes vitaminok különböző mértékben és ideig raktározódnak az emberi szervezetben. Amíg a szervezet tiamin raktározó kapacitása mindössze csak két hét, addig a B₁₂-vitamin a májban akár

évekig is elraktározódik. Ebből következik, hogy hiánybetegségük kialakulásának valószínűsége is különböző [RODLER, 2005].

A vitaminhiány mellett a vitaminok túladagolása is hasonló veszélyekkel járhat. Az egyes vitaminok túladagolása, mely vitaminkészítmények túlzott alkalmazása esetén léphet fel, súlyos tünetekkel járó **hipervitaminózi**s eredményez. A vízben oldódó vitaminok esetében ennek kialakulása ritka, mert a szervezetben nem vagy csak kis mértékben raktározódnak. A felesleg a vizelettel távozik a szervezetből. Készítményeik túlzott fogyasztása azonban, a kiválasztó szervek nagyfokú leterhelését eredményezheti [RODLER, 2005].

A vízben oldódó vitaminok közül a B₁-, a B₂-, B₁₂-vitaminnak, a biotinnak és a pantoténsavnak toxikus hatását még nem mutatták ki. Azonban a niacin, a folsav, a B₆- és a C-vitamin esetében már kimutatták a túlzott fogyasztás egészségre gyakorolt káros hatásait. A niacin, főként a nikotinsav formájának túlzott bevitele értágulatot, bőrpírt (égető viszkető érzés az arcon és a kezeken), ízületi gyulladást, máj- és szemrendellenességet okozhat. B₆-vitamin 500 mg/nap feletti dózis fogyasztása fényérzékenységet, valamint a környéki idegrendszer működésében zavarokat válthat ki. Magas folsav bevitel mentális változásokat, alvási zavarokat, gyomor-bélrendszeri panaszokat idézhet elő, valamint elfedheti a B₁₂-vitamin hiányának tüneteit. A C-vitamin 1000 mg/nap feletti mennyiségben fogyasztva elősegíti a vesekőképződést [MELTZER, 2003].

3. táblázat A vízben oldódó vitaminok élettani hatása, hiányukban kialakuló betegségek, és azok tünetei

<i>Vitaminok</i>	<i>Élettani hatásuk</i>	<i>Jellemző hiánybetegségek</i>	<i>Jellemző hiánytünetek</i>
C-vitamin	• antioxidáns: szabadgyökfogó, α-tokoferol regenerálása • szintézis: adrenalin, kollagén, epesavak, karnitin, neuroendokrin hormonok, P-450 • tirozin bontása • gátlás: glikogénbontás, szénhidrátok fehérjéből való felépülése • elősegíti a vas felszívódást a bélrendszerből • májban zajló méregtelenítési folyamatok (P-450 szintézis révén) • immunrendszer szabályos működése	• skorbut • tavaszi fáradtság • a szervezet ellenálló képességének csökkenése meghűléses betegségekkel szemben	• gyengeség, fáradékonyság, rossz közérzet • izomfájdalom • sárgás-fehér bőr • ízületi bevérvések a nyomásnak kitett helyeken • fogínyvérzés, foghullás
B₁-vitamin	• aktív formája: tiamin pirofoszfát • számos enzim koenzimje (pl.: a piroszölősav, illetve az α-keto-glutársav dekarboxilezését végző enzimé) • szénhidrát és aminosav metabolizmus • idegrendszeri membránok Na⁺-permeabilitása • antineuritiszes hatás	• beriberi • szénhidrát-anyagcsere felbomlása (piroszölősav, tejsav feldúsulása a vérben és a szövetekben)	• ideggyulladás • izomgyengeség • álmatlanság • ödémaképződés • bénulás
B₂-vitamin	• aktív formái: FAD, FMN • dehidrogenázok csoportjába tartozó flavinenzimek koenzimje • oxidációs-redukciós folyamatok • piroszölősav, zsírsavak, aminosavak oxidatív lebontása • NADH oxidációja • B₆-vitamerek, folátok egymásba átalakulása • NAD szintézise triptofánból • szöveti légzés • méregtelenítés	• vas-anyagcsere zavar (hypochrom anaemia)	• ritkán jelentkeznek • a száj és a nyelv nyálkahártya-gyulladása • dermatitisz (bőrgyulladás) • fényérzékenység • fáradtság • látási zavarok • fejlődés leállása (állatok) • szőrzet kihullása (állatok)

Vitaminok	Élettani hatásuk	Jellemző hiánybetegségek	Jellemző hiánytünetek
B₃-vitamin	• aktív formái: NAD, NADP • dehidrogenáz enzimek koenzimje • szöveti redox folyamatokban vesz részt (pl.: foszforiláció folyamatában a citrátkörben) • szénhidrátokból, zsírsavakból és aminosavakból történő energia felszabadítás • aminosavak-, zsírsav-, pentóz-szintézis • gyomornedv sósavjának képzése • vér koleszterinszintjének csökkentése • értágító hatás	• pellagra (3D betegség)	• <i>Dermatitis</i> (száj és nyelv nyálkahártya-gyulladás, bőrgyulladás, fénynek kitett bőrfelület pigmentálódása) • <i>Diarrhoea</i> (étvágytalanság, emésztési zavarok, hányás, hasmenés) • <i>Dementia</i> (álmatlanság, nyugtalanság, ingerlékenység, remegés)
B₆-vitamin	• Aktív formái: foszfát formák • több mint 100 különböző enzim koenzimjei • aminosav-, szénhidrát-, lipidanyagcsere • hemoglobin oxigénaffinitásának fokozása • szteroid hormonokra gyakorolt hatás • immunrendszer szabályos működése • normális növekedés, fejlődés, homeosztázis biztosítása • neurotranszmitterek képzése	• fehérje-anyagcsere zavar	• bőrelváltozás, • vérszegénység • álmatlanság
B₅-vitamin	• koenzim-A, acil-hordozó-fehérje alkotóeleme • energia felszabadítás • szénhidrát anyagcsere • zsírsav szintézis • acetyl-koenzim-A-ként amino-cukrok acilezésében vesz részt, melyek a kötőszövetet alkotó mukopoliszacharidok részei • acetyl-koenzim A-ként a neurotranszmitter acetyl-kolin kolinjának acilezése • szukcinil-koenzim A-ként a porfirin, ezáltal a hemoglobin és a citokrom prekürzora • szteroid vegyületek bioszintézise	• csak mesterségesen idézhető elő	• fáradtság • fejfájás • gyengeség érzet • izomgörcs emésztési zavar

<i>Vitaminok</i>	<i>Élettani hatásuk</i>	<i>Jellemző hiánybetegségek</i>	<i>Jellemző hiánytünetek</i>
<i>B₇-vitamin</i>	• enzimek prosztetikus csoportja • négy karboxiláz enzim prosztetikus csoportja • szénhidrát és lipidanyagcsere • glikogenezis, zsírsav bioszintézis, aminosav metabolizmus, telítetlen zsírsav katabolizmus	• csak mesterségesen idézhető elő	• kimerültség • anorexia • izomfájdalom • csecsemők esetében bőrgyulladás, főként a fejbőrön
<i>B₉-vitamin</i>	• aktív formája: tetrahidrofolsav és derivátumai • homocisztein, hisztidin, triptofán, szerin lebontása • metionin, purin és DNS szintézisben • emésztőrendszer nyálkahártyájának kialakítása • metil donor a homocisztein-metioin átalakulásban (5-metil-THF)	• <i>megaloblasztos anaemia</i> (szabálytalan DNS replikáció, éretlen vörösvérsejtek szabálytalan osztódása) • <i>rák</i> (DNS károsodás, mutáció) • <i>emésztési zavarok</i> (a bélrendszer nyálkahártya sejtjeinek elégtelen megújulása) • <i>érrendszeri (elzáródás) betegségek</i> (plazma emelkedett homocisztein szintje) • <i>idegi pályák károsodása</i> (homocisztein metabolizmus zavara)	• idegrendszeri panaszok • étvágytalanság • gyengeség • emésztési panaszok
<i>B₁₂-vitamin</i>	• aktív formái: metilkobalamin, adenzilkobalamin • különböző enzimek koenzimjei • normális növekedés • egészséges idegállapot • vérvérvetés • folát metabolizmus: metionin szintézisben koenzimje annak az enzimnek ami katalizálja a homocisztein-metionin átalakulást	• ritka, felszívódási zavarok esetén • vészes vérszegénység (anaemia perniciosa) • idegrendszeri zavarok • DNS szintézisben zavarok	• étvágytalanság • gyengeség • emésztési panaszok • idegrendszeri panaszok: először a környéki idegrendszeri panaszok (lábak, ujjak), majd kiterjed a gerincvelőre és az agyra

3.7 Élelmiszerek dúsítása

Az ásványi anyag- és vitaminhiány világszerte, a fejlődő és a fejlett ipari városokban egyaránt komoly probléma, mely súlyos egészségügyi és gazdasági következményeket von maga után. Világviszonylatban a vas-, a jód-, és az A-vitaminhiány a legjelentősebb. Csak vashiányban megközelítőleg két milliárd ember szenved [ACC/SCN, 2000]. A B-vitaminok (tiamin, riboflavin, B₆, folátok), a C-, a D-vitamin, a kalcium és a cink hiányának kialakulása a Föld lakosságának szintén jelentős hányadát veszélyezteti [BRUSSAARD, 1997; ESSAMA-TJANI, 2000; GREGORY, 2000; O'BRIEN, 2001]. A különböző hiánybetegségek kialakulása főként a gyerekeket, az öregeket, a várandós nőket, illetve azokat az embereket fenyegeti, akik valamilyen okból (rossz szokásból, rossz anyagi körülményekből) kifolyólag egyoldalúan táplálkoznak [NILSON, 1998].

Ezen hiánybetegségek kiküszöbölése jelenleg három módon lehetséges:

- változatos étrend kialakításával
- étrend-kiegészítők alkalmazásával
- funkcionális élelmiszerek fogyasztásával

Mindegyik megoldásnak megvannak a maga előnyei és hátrányai. Az emberek **helyes táplálkozásra** nevelése a lehetséges legjobb, de hosszadalmas folyamat. **Étrend-kiegészítők** alkalmazásával egyrészt gyors, látványos javulás érhető el, de ugyanakkor fennáll a túladagolás kockázata is.

Funkcionális (dúsított) élelmiszerek fogyasztásával szintén gyors eredmények érhetők el [FLETCHER, 2004]. Ezen élelmiszercsoport alatt olyan, egészségre jótékony hatású anyagokkal (például mikroelemekkel vagy vitaminokkal) dúsított élelmiszereket értünk, amelyek beltartalmuk, biológiai hasznosulásuk alapján többlet egészségügyi hatással rendelkeznek [DANSE, 1998]. A dúsított élelmiszerek az étrend-kiegészítőknél nagyobb mértékben jutnak el a veszélyeztetett réteghez, használatuk biztonságosabb, de a túladagolás veszélye ezen termékek esetében is fennáll [FLETCHER, 2004].

3.7.1 A dúsítás mérőföldkövei

Az élelmiszerek dúsításának jótékony hatását már Krisztus előtt 400-ban felismerték, amikor Melampus perzsa orvos tanácsára a katonák borába erőnlétük növelése érdekében vasat kevertek [FLETCHER, 2004].

A strúma (golyva) megelőzésére elsőként 1831-ben Boussingault francia orvos a só jódozását javasolta, melyet 1923-ban Svájcban, majd 1924-ben az Amerikai Egyesült Államokban be is vezettek [BLUM, 1997].

Margarin A-vitaminnal történő dúsítását először Angliában végezték 1927-ben. A Második Világháború óta a margarin dúsítását törvényi szabályozás írja elő, mely az A-vitamin mellett kötelezővé teszi a D-vitamin hozzáadását is.

1907 és 1940 között a niacin hiánybetegsége, a pellagra, melyet kezdetben fertőzésnek véltek, járványszerűen szedte áldozatait. Főként az Egyesült Államok déli részét sújtotta, ahol a kukorica alapú élelmiszerek fogyasztása dominált. A betegség valódi okának felismerését követően, 1940-ben a fehér liszt niacin-, tiamin-, riboflavin- és vastartalmának növelését törvénybe foglalták. Ezen intézkedés hatására a pellagra, valamint a tiamin hiánybetegsége a beriberi 1950-re teljesen eltűnt [BOLLET, 1992; LANSKA, 1996].

Az újszülötteket nagy számban fenyegető idegcsőzáródási rendellenesség kialakulásának megelőzése érdekében 1998-ban az Egyesült Államokban kötelezővé tették a gabonaalapú termékek folsavval történő dúsítását [CHOI, 2002].

3.7.2 Az élelmiszer dúsítás típusai

Napjainkban az élelmiszergyártók a törvények által előírt **kötelező** dúsításon kívül **önkéntes** alapon is adhatnak bizonyos vitaminokat és ásványi anyagokat termékeikhez. A dúsítás egyrészt történhet **(i) technológiai célból** (pl.: borászati eljárások során), mely során a vitaminok adalék- és ízesítőanyagok, valamint színezékek szerepét töltik be [WIRAKARTAKUSUMAH, 1998]. Egy másik cél lehet a feldolgozáskor bekövetkező vitamin- és ásványianyag-veszteség **(ii) helyreállítása**. Ilyen például a fehér liszt hántolása során bekövetkező B-vitaminveszteség pótlása [BAUERNFEIND, 1991; BOWLEY, 2003]. Tápanyagokkal történő dúsítás **(iii) helyettesítő élelmiszerek tápanyag-egyenértékének biztosítása** érdekében is végezhető, mint például, A-, és D-vitamin adása, a vaját helyettesítő margarinokhoz. A dúsítás egy másik célja lehet a **(iv) tápértéknövelés**, mely során az élelmiszerek természetes vitamin és ásványi anyag

szintjét növelik, vagy olyan vitaminokat és ásványi anyagokat adnak a termékekhez, melyeket természetesen nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben tartalmaznak [RICHARDSON, 1997; WIRAKARTAKUSUMAH, 1998]. Ilyen például a gyümölcslevek, gabonapelyhek B-vitaminnal dúsítása.

3.7.3 A dúsítás meghatározó tényezői

A dúsításhoz használt komponensek kiválasztása a biztonság, a táplálékból való biológiai hasznosulásnak, az általuk okozott érzékszervi változás elhanyagolhatóságának, és az ésszerű költségek kompromisszumán alapszik.

A vízben oldódó vitaminok élelmiszerekhez történő hozzáadásának fő korlátja a komponensek **stabilitása**, melyet számos fizikai és kémiai tényező befolyásol. Ilyenek a hőmérséklet, a nedvességtartalom, a fény, a pH, valamint az összeférhetetlen komponensek és az oxigén jelenléte [FLETCHER, 2004; WIRAKARTAKUSUMAH, 1998]. Ezért a vitaminnal dúsított élelmiszerek gyártásának, csomagolásának és tárolásának tervezésekor a stabilitás megővására fokozott figyelmet kell fordítani.

A komponensek, feldolgozás, illetve tárolás alatt bekövetkező vesztesége bizonyos fokig csökkenthető (pl.: megfelelő technológiával, speciális csomagolással), de nem kerülhető el teljesen [OTTAWAY, 1995; WIRAKARTAKUSUMAH, 1998]. A tervezett dúsítási szint biztosítása érdekében, az esetlegesen bekövetkező veszteség, a termék csomagolásán feltüntetett értéken felüli többletmennyiség hozzáadásával kompenzálható [BARCLAY, 1998]. Például dúsított lisztből készült kenyér a hozzáadott B₁-, B₂-, B₆-vitamin, niacin és folsav 70-95%-át, a dúsított lisztből előállított tészta, szárítást és főzést követően ugyanezen vitaminok körülbelül 70%-át őrzi meg. Ebből kifolyólag, liszt esetében 20-30% többlet vitaminmennyiség hozzáadása szükséges annak érdekében, hogy a kész termékek tartalmazzák a tervezett mennyiséget [NILSON, 1998].

A stabilitás mellett az is lényeges, hogy a dúsításhoz használt komponensek **biológiailag hozzáférhető** formában legyenek jelen. A vitaminok stabilitását és biológiai hasznosulását az élelmiszerek természetes vagy hozzáadott komponensei között esetlegesen fellépő **kölcsönhatások** befolyásolhatják. Fémionok (vas, réz) jelenlétében például a C-, és B₁₂-vitamin bomlása felgyorsul [BARCLAY, 1998], míg tiamin és nikotinamid jelenlétében a cianokobalamin lassú degradálódása figyelhető meg [BECK, 2001]. A kedvezőtlen hatások mellett előfordulnak olyan esetek, amikor az egyes vitaminokat kifejezetten az egyéb

komponensekre gyakorolt pozitív hatása miatt adják az élelmiszerekhez. Ilyen például a C-vitamin, mely javítja az A-vitamin stabilitását, emellett elősegíti a vas felszívódást is [ALLEN, 2006].

A fent bemutatott tényezők mellett a dúsítás **biztonságos szintjének** megfelelő meghatározása is kiemelkedő jelentőséggel bír, ugyanis a vitaminok túlzott fogyasztása káros hatású is lehet. Ez főként abban az esetben állhat fenn, ha a napi szükséglet és a már egészségkárosító mennyiség közel áll egymáshoz. A dúsítás mértéke nem haladhatja meg a szervezet számára még egészséges szintet [MELTZER, 2003]. Így a gyártóknak figyelembe kell venniük az ajánlott beviteli referenciaértékeket, a még biztonságosan fogyasztható mennyiség felső határát [SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2000], valamint az élelmiszerekben természetesen előforduló vitaminok és ásványi anyagok mennyiségét is. Albert Flynn és munkatársai [2003] a túlادagolás kockázatának minimalizálása érdekében a következő modellt dolgozták ki (**1. egyenlet**), mellyel megbecsülhető az egyes tápanyagok, élelmiszerkehez adható biztonságos szintje.

1. egyenlet

$$FA_n = \frac{(UL - CI_{95})}{(0.5 \times 36 \times PFF_n)}$$

FA_n: (Fortified Amount): Az egyes tápanyagok azon mennyisége, amely az élelmiszer 100 kcal mennyiségéhez még biztonságosan adható (mg/100 kcal).

UL: (Tolerable Upper Intake Level): Az egyes tápanyagoknak a napi maximális beviteli mennyisége, melynek még nagy valószínűséggel nincs egészségkárosító hatása (mg) [SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2000].

CI₉₅: (Energy intake): Európa lakosságának becsült energiabevitele (mg)

PFF_n: (Potentially Fortifiable Foods): A forgalomban lévő termékek azon hányada, mely alkalmas az egyes tápanyagokkal való dúsításra (100 kcal).

A vízben oldódó vitaminok közül a B₁-, a B₂-, B₁₂-vitaminnak, a biotinnak és a pantoténsavnak toxikus hatását még nem mutatták ki. Azonban a niacin, a B₆-vitamin, a folsav és a C-vitamin esetében az élelmiszerekhez adott mennyiség megállapításánál figyelembe kell venni az UL (Tolerable Upper Intake Level) értékeket. Ez az érték niacin esetében gyerekeknél 10-15 mg/nap, felnőtteknél 20-35 mg/nap, ugyanezek az értékek B₆-vitaminnál 30-40 mg/nap, valamint 60-100 mg/nap, folátoknál 300-400 µg/nap és 600-1000 µg/nap, végül a C-vitaminnál

600-900 mg/nap, illetve 1700-3000 µg/nap intervallumba esik [SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2000].

Az alkalmazni kívánt komponensek kiválasztásakor az érzékszervi (organoleptikus) szempontok sem elhanyagolhatóak. Dúsításra azok az anyagok alkalmasak, melyek a felhasznált koncentrációban nem okoznak lényeges **érzékszervi** (szín, illat, íz, állag) **változást** a terméken, és nem válnak ki az élelmiszer mátrixból, üledéket képezve. Például a folsav világossárga-, a riboflavin erős sárgaszínű, valamint kellemetlen keserű ízű. Így ezen vegyületek adagolásánál a biztonsági kritériumon kívül azt is figyelembe kell venni, hogy ne okozzanak szín- és ízbeli elváltozást. Az íz, vagy egyéb érzékszervi problémák a komponensek bevont formáinak használatával is kivédhetők [ALLEN, 2006]. Fontos szempont még, hogy a dúsítás **költsége** ne befolyásolja nagymértékben a termék elérhetőségét, illetve versenyképességét a dúsítatlan alternatívával szemben [BARCLAY, 1998; RICHARDSON, 1990, 1997; WIRAKARTAKUSUMAH, 1998].

A dúsítás során figyelembe vett szempontok (technológia, érzékszervi tényezők, biztonság, költség) az egyes vízben oldódó vitaminok esetében különböző súllyal rendelkeznek. Ezen tényezők az egyes vízben oldódó vitaminokra gyakorolt hatását a **4. táblázat** tünteti fel.

4. táblázat: A vízben oldódó vitaminok dúsításának korlátozó tényezői [Allen, 2006]

Vitamin	Technológia/ érzékszervi tényezők	Biztonság	Költség
C	xx	x	xxx ^a
B ₁	-	-	-
B ₂	xx	-	-
B ₃	-	xxx ^d	x
B ₆	-	x	x
B ₉	-	xxx ^c	-
B ₁₂	-	-	x

- Nincs, x kis mértékű, xx mérsékelt, xxx jelentős korlátozó hatás

^a főként a gyártás, a tárolás során bekövetkező vitamin veszteségből ered

^b nikotinamid használata esetében jóval kisebb a nikotinsavhoz képest

^c a fordított hatás kialakulásának kockázata csökkenthető B₁₂-vitamin együttes adásával

3.7.4 Dúsításra alkalmas élelmiszerek

Anglia lakosságának körében végzett felmérések alapján a dúsított élelmiszerek az emberek energia-bevitelének mindössze 22-24%-át (19% kötelezően, 3-5% önkéntesen dúsított) teszik ki.

Ez azzal magyarázható, hogy a dúsításra alkalmas élelmiszerek körét az alkalmazott technológiák és más egyéb tényezők nagymértékben behatárolják [FLETCHER, 2004]. Ezt a kört tovább szűkítik a vitaminok és ásványi anyagok hozzáadására vonatkozó rendeletek is. Ilyen például az Európai Parlament által kibocsátott [1925/2006/EK] rendelet, miszerint vitaminok és ásványi anyagok nem adhatók feldolgozatlan élelmiszerekhez (beleértve a gyümölcsöket, zöldségeket, húsféléket, halakat), valamint néhány kivételtől eltekintve (pl.: hagyományos borreceptek védelmére) az 1,2 térfogatszázaléknál nagyobb alkoholtartalmú italokhoz.

A **dúsításhoz megfelelő élelmiszerek** és anyagok kiválasztását a következőkben bemutatott tényezők befolyásolják. Egy dúsított élelmiszer akkor válhat sikeressé, ha a **célcsoport elfogadja**, megvásárolja és fogyasztja. Ebből kifolyólag azok a legalkalmasabb élelmiszerek, melyeket az emberek nagy többsége, beleértve a társadalom legveszélyeztetettebb részét is **rendszeresen**, megfelelő mennyiségben, egész évben egyenletesen fogyaszt. Nem elhanyagolható szempont az sem, hogy előállításuk különböző keverékekkel, alacsony költségű technológiákkal viszonylag egyszerűen megoldható legyen. Előnyösebbek azok az élelmiszerek, melyek a gyártást és felvásárlást követően viszonylag **rövid időn belül felhasználásra** kerülnek, így csökkentve a tárolás során bekövetkező vitaminveszteség veszélyét. Ennek tükrében általában a gabonafélék, az olajok, a tejtermékek, az üdítők, az ételízesítők, úgymint a só, cukor, különböző öntetek különösen alkalmasak dúsításra [WIRAKARTAKUSUMAH, 1998]. Vízben oldódó vitaminokat főként gabonapelyhekhez, tejtermékekhez (tej, tejjal, tejpor), gyümölcslevekhez, italporokhoz esetleg rizsliszthez, olajokhoz és margarinokhoz adnak. Ezen felül B-vitaminokat adnak búza és kukoricaliszthez. A búzaliszt C-vitaminnal történő dúsítása még nem megoldott [NILSON, 1998]. Az önkéntesen dúsított élelmiszerek legnagyobb hányadát a reggeli gabonapelyhek teszik ki [FLETCHER, 2004].

Felmerülhet a kérdés, hogy az önkéntesen dúsított élelmiszerek, melyek csak viszonylag kis mértékben járulnak hozzá a napi energia-bevitelhez, jelenthetnek-e megoldást az érintett rétegek vitaminhiányának pótlására. Világszerte számos kutatás igazolta a reggeli gabonapelyhek fogyasztása és a vitaminok bevitele közötti pozitív összefüggést [BERTRAIS, 2000; GALVIN, 2003; GIBSON, 2003; TUCKER, 2004]. Így számos kutatási eredmény alátámasztja a dúsított élelmiszerek jelentőségét a vitaminhiány kialakulásának megelőzése, illetve kezelése terén [FLETCHER, 2004].

3.7.5 A dúsításhoz használt komponensek

A dúsításhoz használható élelmiszerek mellett az élelmiszerekhez adható vitaminokat és ásványi anyagokat is törvény szabályozza. Így az [1925/2006/EK] európai parlamenti és tanácsi rendelet alapján az élelmiszerekhez a következőkben felsorolt vízben oldódó vitaminkészítmények adhatók:

- *B₁-vitamin*: tiamin-hidroklorid, tiamin-mononitrát
- *B₂-vitamin*: riboflavin, riboflavin-5'-foszfát nátriumsója
- *B₃-vitamin*: nikotinsav, nikotinamid
- *B₅-vitamin*: kalcium-D-pantotenát, nátrium-D-pantotenát, dexpanthenol
- *B₆-vitamin*: piridoxin-hidroklorid, piridoxin-5'-foszfát, piridoxin-dipalmitát
- *B₉-vitamin*: pteroilmonoglutaminsav (folsav)
- *B₁₂-vitamin*: cianokobalamin, hidroxikobalamin
- *B₇-vitamin*: D-biotin
- *C-vitamin*: L-aszkorbinsav, nátrium-L-aszkorbát, kalcium-L-aszkorbát, kálium-L-aszkorbát, L-aszkorbil-6-palmitát

A dúsított élelmiszerek előállításakor a fent említett formák különböző gyakorisággal kerülnek felhasználásra. A B₁-vitaminkészítmények közül a gyakorlatban főként a vízben jobban oldódó tiamin-hidrokloridot alkalmazzák. A nem higroszkópos tiamin-monohidrátnak a lisztek dúsításánál van jelentősége. Niacin esetében a nikotinsavval szemben a nikotinamid, a B₆-vitamin három engedélyezett formája közül a piridoxin-hidroklorid használata terjedt el kedvező vízoldhatóságuknak köszönhetően [ALLEN, 2006; BALL, 2006]. A B₁₂-vitamint szinte kivétel nélkül a stabilabb cianokobalamin formájában adják az élelmiszerekhez. A pantoténsav egy halványsárga, erősen higroszkópos anyag révén nem alkalmas a dúsítási eljárásokhoz, így helyette a D-pantotenát használata terjedt el az élelmiszeriparban. A B₉-vitamint kizárólagosan szintetikus folsavként adják a termékekhez, míg a biotint D-biotinként. A csecsemőtápszerek kivételével az élelmiszerek biotinnal dúsítása nem jelentős. A C-vitamin engedélyezett formái közül széleskörűen az L-aszkorbinsavat használják az egyes élelmiszer technológiák (dúsítás, stabilizátor, antioxidáns) során [ALLEN, 2006; BALL, 2006].

Az élelmiszerek dúsítása viszonylag egyszerű technológiát igényel. A hozzáadás lehetséges komponensenként vagy több komponenses keverékként. A folyadék halmazállapotú termékekhez, mint például gyümölcslevekhez, üdítőitalokhoz és tejtermékekhez a komponensek vizes oldatát adják. A különböző lisztekhez, instant italporokhoz, tejporokhoz közvetlenül por

formájában adagolható. Reggeli gabonapelyhekhez a vitaminkomponensek adhatók a préselést megelőzően száraz keverékként, vagy a már késztermékre (pirítást követően) permetezhető oldat vagy szuszpenzió formájában [ALLEN, 2006; NILSON, 1998].

A dúsított élelmiszerek megjelenése és egyre nagyobb mértékű elterjedése szigorú minőségbiztosítási-rendszerek kidolgozását teszi szükségessé, a fogyasztók védelme érdekében, mely maga után vonja az egyszerű, gyors, pontos, érzékeny analitikai módszerek iránti igényt.

3.8 Vízben oldódó vitaminok meghatározása

A vízben oldódó vitaminok meghatározásának számos analitikai megoldása létezik, úgymint mikrobiológiai, biospecifikus (immuno- és fehérjekötő-eljárás), valamint fizikai-kémiai analitikai (titrimetria, spektrofotometria, kapilláris elektroforézis, gázkromatográfia, folyadékkromatográfia) módszerek.

3.8.1 Mikrobiológiai módszerek

A nemzetközileg elfogadott, az élelmiszerek B-vitamintartalmának meghatározását szolgáló szabványos módszerek a legtöbb esetben valamilyen **mikrobiológiai módszeren** alapulnak (5. táblázat). Ezekben az esetekben a B₆-vitamin kivételével, az élelmiszerek B-vitamintartalmának meghatározását tejsavbaktériumokkal végzik. Egyrészt mérhetik az inkubációs periódus alatt (72 óra) felhalmozódott tejsav mennyiségét **titrimetriás** módszerrel, melyből következtetni lehet a minta vitamintartalmára. Másrészt a meghatározás alapulhat **turbidimetriás** eljárás, mely során az adott vitamin jelenlétében felszaporodott mikrobák által okozott zavarosságból következtetnek a vitamintartalomra. Napjainkban, a rövidebb inkubációs időigényének és egyszerűségének köszönhetően a turbidimetriás módszert elterjedtebben alkalmazzák. A B₆-vitamin meghatározása egyes élesztőfajtákkal lehetséges (pl.: *Saccharomyces cerevisiae*) [BALL, 2006].

A mikrobiológiai módszerek legnagyobb hátránya a pontatlanság. A mérések során fennálló $\pm 20\%$ -os bizonytalanság általánosnak mondható, mely adódhat a minta szennyezettségéből, a különböző keresztreakciókból (egyéb vitaminokkal, mintakomponensekkel), illetve a mikroorganizmusoknak az egyes vitamerekre adott eltérő válaszreakciójából. Például a B₆-vitamin esetében a *Saccharomyces cerevisiae* használatakor a teljes B₆-vitamin-tartalom

alulbecslésének kockázata állhat fenn, abban az esetben, ha a piridoxamin a domináns vitamer a mintában, mivel ezen vitamer által kiváltott mikrobiológiai reakció jóval alul marad a másik két formával szemben (piridoxin, piridoxal) [Blake, 2007]. A pontatlanság mellett a mikrobiológiai módszerek másik nagy hátránya, hogy nem teszik lehetővé az egyes vitamerek szelektív meghatározását.

5. táblázat Vízben oldódó vitaminok meghatározását szolgáló mikrobiológiai módszerek [BALL, 2006]

Vitamin	Hivatalos módszer	Cím	Organizmus	Alkalmazási terület
Riboflavin	AOAC 940.33 (1960)	Vitaminkészítmények riboflavin-tartalma	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Minden élelmiszertermék
Niacin	AOAC 944.13 (1960)	Vitaminkészítmények niacintartalma – mikrobiológiai módszer	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Minden élelmiszertermék. Megjegyzés: A gabonaalapú élelmiszerek esetében további hidrolízis szükséges a kötött nikotinsav felszabadításához.
	AOAC 985.34 (1988)	Tejalapú csecsemőtápszerek niacintartalma - mikrobiológiai turbidimetriás módszer	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Tejalapú csecsemőtápszerek. Továbbá alkalmazható: egyéb csecsemőtápszerek (húsalapú), üdítőitalok, gyümölcslevek, gabonatermékek, sajtok, tejtermékek, gyümölcsök, burgonyatermékek
Pantoténsav	AOAC 992.07 (1995)	Tejalapú csecsemőtápszerek pantoténsav-tartalma- mikrobiológiai turbidimetriás módszer	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Tejalapú csecsemőtápszerek. Foszfáttal és peptidázzal kezelt csecsemőtápszerek (a kötött pantoténsav felszabadítása céljából)
B₆-vitamin	AOAC 985.32 (1988)	Tejalapú csecsemőtápszerek B ₆ -vitamin-tartalma (PN,PL,PM) – mikrobiológiai módszer	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tejalapú csecsemőtápszerek.
	AOAC 961.15 (1975)	Élelmiszerek B ₆ -vitamin-tartalma (PN,PL,PM) - mikrobiológiai módszer	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Minden élelmiszer
	EN 14166:2001	Élelmiszerek. B ₆ -vitamin meghatározása mikrobiológiai módszerrel	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Minden élelmiszer
Biotin	Csecsemőtápszer Tanács Módszer C-1 (1982)	Szabad biotin	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Folyadék és por csecsemőtápszerek
Folsav	AOAC 992.05 (1995)	Csecsemőtápszerek folsavtartalma – mikrobiológiai módszer	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Tejalapú, folyadék halmazállapotú csecsemőtápszerek. Csak szabad folsavtartalom meghatározására.
Teljes folát	AOAC 2004.05 (2004)	Gabonák és gabonaalapú élelmiszerek teljes foláttartalma – mikrobiológiai módszer (3-enzim)	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Gabonamagvak és gabonaalapú élelmiszerek, foláttal dúsított gabonatermékek. Kötött folátok enzimes felszabadítása.
	EN 14131:2003	Élelmiszerek. Folát meghatározás mikrobiológiai módszerrel (megjegyzés: 3-enzim eljárás)	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Minden élelmiszer. Teljes kiőrlésű lisztre, tejporra, zöldségkeverékre, sertésmájra érvényesítve
B₁₂-vitamin	AOAC 986.23 (1988)	Tejalapú csecsemőtápszerek kobalamintartalma (B ₁₂ -vitamin aktivitású) –turbidimetriás módszer	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Tejalapú csecsemőtápszerek
	AOAC 952.20 (1960)	Vitaminkészítmények kobalamintartalma (B ₁₂ -vitamin-aktivitású) – mikrobiológiai módszer	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Minden élelmiszertermék

3.8.2 Biospecifikus módszerek

Néhány B-vitamin élelmiszerből történő meghatározása lehetséges **biospecifikus módszerekkel**, melyeknek két fő típusa az **immuno- és a fehérjekötő-eljárás**. Az antitest-antigén specifikus kölcsönhatásán alapuló immuno-eljárások közül a **radioimmuno-vizsgálatot** (radioimmunoassay, RIA) a pantoténsav, míg az **enzimhez kötött immunadszorpciós-vizsgálatot** (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) a pantoténsav és B₆-vitamin meghatározására alkalmazzák. A biotin, a folátok és a B₁₂-vitamin, a természetben is előforduló vitaminkötő fehérjéket alkalmazó, **radioaktív nyomjelzéses** (radiolabeled protein-binding assay, RPBA), illetve **enzimjelölt fehérjekötő** (enzymelabeled protein-binding assay EPBA) eljárásokkal meghatározhatóak [BALL, 2006].

3.8.3 Fizikai-kémiai analitikai módszerek

A C-vitamin meghatározást szolgáló fizikai-kémiai módszerek közül számos eljárás az aszkorbinsav és a dehidro-aszkorbinsav reverzibilis redox-reakcióján alapszik. Például a **titrimetriás módszerekben** a lilás-kék 2,6-dikloro-fenolindofenolt az aszkorbinsav színtelen vegyületté redukálja [AOAC 967.21:1968; CIANCAGLINI, 2001; KABASAKALIS, 2000]. A C-vitamin közvetlen **spektrofotometriás** meghatározása is az aszkorbinsav és a dehidro-aszkorbinsav reverzibilis redox-reakcióját használja ki, mely során az aszkorbinsav réz(II)szulfát jelenlétében oxidálódik [LAU, 1986]. Mindkét reakció nagy hátránya, hogy teljes C-vitamin-tartalom meghatározására nem alkalmas, mivel a dehidro-aszkorbinsav nem vesz részt a reakcióban, valamint mindkét esetben, a mátrix egyéb redukáló ágensei (vas, réz) okozta zavaró hatás torzíthatja az eredményeket. A C-vitamin meghatározásának **kolorimetriás** és **fluorimetriás** megoldása is egyaránt kidolgozott [AOAC 967.22:2000; BALL, 2006]. A B-vitaminok közül a B₃-vitamin kolorimetriásan, a B₁-, a B₂-és a B₆-vitaminok fluorimetriásan mérhetők [AOAC 942.23:2000; AOAC 970.65:2000].

A vitaminok meghatározásának egy másik módja a **kapilláris elektroforézis**, melyet főként gyógyszerkészítmények vizsgálatára alkalmaznak. Ez az eljárás a kis injektált mintamennyiségből eredő alacsonyabb érzékenységből kifolyólag kisebb jelentőséggel bír az élelmiszeranalitikában. Húsok és tej tiamin-, valamint zöldségek, gyümölcsök C-vitamin-tartalmának meghatározására **micelláris elektrokinetikus kromatográfiát** alkalmaznak [THOMPSON, 1995; VIDAL-VALVERDE, 1999, 2000]. A szakirodalomban találhatunk

néhány példát élelmiszerek vitamintartalmának (B_2 -, B_3 -, C-vitamin) **kapilláris zónaelektroforézissel** történő meghatározására is [CANCALON, 2001; CATALDI, 2002; WARD, 1997].

3.8.3.1 Vízben oldódó vitaminok egyedi meghatározása HPLC technikákkal

Az eddigiekben bemutatásra került módszerek többsége nem teszik lehetővé a komponensek mátrixtól való elválasztását, így ez a módszerek pontatlanságát eredményezheti. Emellett sok esetben ezek a módszerek időigényesek és automatizálásuk nem megoldható. Ezen problémák áthidalhatók az egyre nagyobb népszerűségnek örvendő nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás technikák (HPLC, *high performance liquide chromatography*) alkalmazásával. A HPLC technikák lehetőséget nyújtanak az egyes vitaminok és vitamereik szelektív meghatározására. A következő fejezetekben a doktori munkám során vizsgálatra kerülő vízben oldódó vitaminok HPLC technikán alapuló vizsgálati módszereit mutatom be.

3.8.3.1.1 B_1 -vitamin

Az élelmiszerek össztiamin-tartalmának meghatározásához a fehérjékhez kötött és foszforilált formák felszabadítása szükséges, mely sósavas autoklávozást követő enzimes (takadiasztáz, papain) hidrolízissel érhető el [NDAW, 2000]. Az így előkészített minta szilárdfázisú extrakcióval (ioncserelő gyantával) tovább tisztítható az egyes interferenciák csökkentése érdekében [ARELLA, 1996; FELLMAN, 1982; REYES, 1989]. A vitamintabletták és dúsított élelmiszerek vizsgálatokor egyszerűbb mintaelőkészítés is elegendő [KIRCHMEIER, 1978; WALKER, 1981].

A tiamin HPLC-s meghatározásának számos módjával találkozhatunk a szakirodalomban. Detektálása fluoreszcenciás és UV detektor alkalmazásával egyaránt kivitelezhető. A tiamin moláris abszorpciója viszonylag alacsony, ezért a két detektálási mód közül a szelektívebb és érzékenyebb **fluoreszcenciás** detektálást elterjedtebben használják [WIMALASIRI, 1985]. A tiamin önmagában nem fluoreszcens, de **oszlop előtti vagy utáni derivatizálással**, erős fluoreszcens tulajdonságú tiokrómmá oxidálható lúgos kálium-hexaciano-ferrát (III) ($K_3Fe(CN)_6$) használatával [LYNCH, 2000]. Az **oszlop előtti derivatizáció** lehetővé teszi az apolárisabb természetű tiokróm fordított fázisú kromatográfiás meghatározását [SIMS, 1993]. A származékképzés egyik hátránya, hogy a kálium-hexaciano-ferrát (III) hatására kialakuló

lúgosabb közegben a tiamin tiokrómmá alakulása során melléktermékként tiamin-diszulfid is keletkezhet, rontva ezzel a módszer érzékenységén. Ez a mellékreakció ortofoszforsav használatával csökkenthető [FELLMAN, 1982; FERNANDO, 1990; REYES, 1989].

Az oszlop utáni derivatizáció használata rutinmérésekhez alkalmasabb, mert a manuális injektálást kikerülve az eljárás automatizálható. Hátránya az oszlop előtti derivatizációhoz képest, hogy gyengébb érzékenység érhető el, és hogy a tiamin nem rendelkezik megfelelő visszatartással fordított fázisú oszlopon. Meghatározásához ezért normál-fázisú vagy fordított fázisú ionpár kromatográfiára szükséges [HURST, 1983; MAURO, 1984; OHTA, 1984]. Erre a célra legelterjedtebben használt ionpárképző reagens a hexán-szulfonsav [HURST, 1983; KIRCHMEIER, 1978; MAURO, 1984; WALKER, 1981].

A HPLC-s technikákkal lehetővé vált az össztiamin meghatározásán kívül a tiamin és a tiamin koenzimek meghatározása is, mely oszlop előtti és utáni derivatizálásal egyaránt megoldható. Például Batifoulie és munkatársai [2005] a tiamin, tiamin-monofoszfát és a tiamin-difoszfát tiokrómként történő meghatározását dolgozták ki, mely során egy egyszerű perklórsavas extrakciót követően, oszlop előtti derivatizációval, egy RP-amid C₁₆-os oszlopon választották el a három vegyületet.

A tiamin viszonylag alacsony moláris abszorpciója ellenére, az **UV detektálás** kiválóan alkalmas vitaminkészítmények [AMIN, 1987; KIRCHMEIER, 1978; WALKER, 1981], funkcionális élelmiszerek [HILKER, 1982], csecsemőtápszerek, illetve magas természetes tiamintartalmú élelmiszerek, mint például a hüvelyesek [VIDALVALVERDE, 1990], disznóhús [BARNA, 1994; VIDALVALVERDE, 1990] mérésére. Így ezekben az esetekben a tiokróm képzése elhagyható.

3.8.3.1.2 B₂-vitamin

A B₂-vitamin meghatározásának legelterjedtebb módjai a **fordított fázisú**, vagy a **fordított fázisú ionpárképző** kromatográfia **fluoreszcenciás** detektálás alkalmazásával. A gyakorlatban főként C₁₈-as állófázisokat, ionpárképzőként hexa- vagy hepta-szulfonsavat használnak.

A B₂-vitamin (riboflavin, FMN, FAD) rendelkezik fluoreszcens tulajdonsággal, melynek intenzitása **lumiflavin** képzésével tovább növelhető. A fehérjékhez kötött formák nem fluoreszkálnak, így kvantitatív meghatározás esetén a flavinok felszabadítása szükséges, mely savas hidrolízissel érhető el [BALL, 2006].

Az élelmiszerek teljes B₂-vitamin-tartalmát leggyakrabban szabad riboflavin formájában határozzák meg. Ehhez a foszforilált formák (FMN, FAD) enzimatisz feltárása szükséges.

Johnsson és Branzell [1987] számos élelmiszer teljes B₂-vitamin-tartalmának meghatározására a fent említett extrakciós módszert használták és hasonlították össze egy szabványos mikrobiológiai módszerrel (*Lactobacillus rhamnosus*). A vitaminnal dúsított élelmiszerek esetében, a két módszer szoros összefüggést mutatott, míg például dúsítatlan lisztek esetén a mikrobiológiai módszer 25-50%-al magasabb értékeket adott.

Tojás, tej és tejtermékek esetében, ahol a B₂-vitamin túlnyomó részben szabad vagy lazán kötött riboflavin formájában van jelen, a savas és enzimatis hidrolízis elhagyható. Így például a tej mintaelőkészítése a fehérjék kicsapatásából, valamint szűrésből áll [ASHOOR, 1983; TOYOSAKI, 1986].

A B₂-vitamin meghatározására **UV-VIS detektor** is alkalmazható [ASHOOR, 1985; STANCHER, 1986; VIDALVALVERDE, 1990]. Vizes közegben, négy jellemző hullámhosszon van abszorbanciája (223, 266, 373 és 445 nm).

A B₂-vitamin riboflavinként történő meghatározásán kívül lehetőség van az egyes vitamerek szelektív kromatográfiás meghatározására is. Greenway és Kometa [1994] ennek érdekében egy online mintaelőkészítést dolgoztak ki, és alkalmazták tej és gabona riboflavin- és FMN-tartalmának meghatározására. Ennek során a mikrohullámú extrakciót dialízis, majd dúsítási lépés követi. Russel és Vanderslice [1992] egy degradáció nélküli, kétlépéses extrakciós módszert alkalmaztak különböző élelmiszerek riboflavin-, FMN-, FAD-tartalmának egy menetes meghatározásához, melyet később automatizáltak [RUSSELL, 1998].

3.8.3.1.3 B₃-vitamin

Az élelmiszerek B₃-vitamin-tartalma az alkalmazott extrakciótól függően teljes vagy biológiailag felvehető niacinként is meghatározható. A **teljes niacintartalom** meghatározásához alkalmazott extrakció egy savas és egy lúgos hidrolízisből áll. A savas hidrolízis a nikotinamid felszabadítását szolgálja NAD-ból és NADP-ből. Az így kapott extraktumon végzett lúgos hidrolízis során a jelenlévő nikotinamid nikotinsavvá alakul át, így a későbbi folyadékkromatográfiás elválasztás során csak ez utóbbi molekula vizsgálata szükséges. A **biológiailag felvehető niacintartalom** meghatározása céljából savas hidrolízis is elegendő, habár ez az extrakciós módszer felszabadíthatja a biológiailag nem hozzáférhető nikotinsav egy részét is [BALL, 2006]. Ennek kikerülése érdekében Ndaw és munkatársai [2002] a savas hidrolízis helyett NAD glikohidroláz használatát javasolják, mely kizárólagosan a hozzáférhető nikotinamidot szabadítja fel.

Az élelmiszerminták niacintartalmának meghatározásához, a vizsgálni kívánt vitamerektől függően, különböző elválasztás-technika használható. A nikotinsav mátrixtól való elválasztása kivitelezhető anioncserés [LACROIX, 2001], kationcserés [HAMANO, 1988] fordított fázisú ionpárképző kromatográfiával tetrabutil-ammónium hidroxid [VIDALVALVERDE, 1991], nátrium-dodecil-szulfát [TYLER, 1990] vagy heptánszulfonsav [VALLS, 2000] ionpárképzők használatával, illetve fordított fázisú kromatográfiával [LAHELY, 1999; ROSE-SALLIN, 2001; VANNIEKERK, 1984].

A niacin HPLC-s meghatározásához legelterjedtebben **UV detektálást** alkalmaznak 261 [OISHI, 1988; TSUNODA, 1988; VALLS, 2000] vagy 254 nm-en [TYLER, 1990; VANNIEKERK, 1984; VIDALVALVERDE, 1991]. A nikotinsav és a nikotinamid abszorpciós spektruma az UV tartományban hasonló. Az abszorpciót a pH nagymértékben befolyásolja [BALL, 2006].

UV detektálás alkalmazásakor sok esetben mintatisztítási lépéssel bővített mintaelőkészítés szükséges. Ennek legalkalmasabb módja a szilárdfázisú extrakció. Például Tyler és Genzale [1990] C₁₈-as, míg LaCroix és Wolf [2001] erős kationcserélő szilárdfázisú extrakciót alkalmaztak.

Fluoreszcenciás detektálással növelhető a szelektivitás és az érzékenység, de ehhez a niacin derivatizálása szükséges, mivel természetes módon nem rendelkezik fluoreszcenciás tulajdonsággal. Legelterjedtebb módja ennek az oszlop utáni származékképzés. Ez történhet az effluens azonnali UV besugárzásával ($\lambda > 300$ nm), hidrogén peroxid és réz (II) jelenlétében [LAHELY, 1999; MAWATARI, 1991], vagy cianogén-bromid és p-aminofenol alkalmazásával [KRISHNAN, 1999].

3.8.3.1.4 B₅-vitamin

A pantoténsav meghatározásához legelterjedtebben **fordított fázisú kromatográfiás** rendszereket használnak. Mivel a pantoténsavnak nincs karakterisztikus kromofor csoportja ezért **UV detektálása** nehézségekbe ütközik [BALL, 2006].

Woollard és munkatársai [2000] a pantoténsav gyenge UV-elnyelését és az ebből adódó szelektivitási problémákat diódasoros detektor használatával küszöbölték ki, több hullámhosszon (200, 205, 240 nm) történő detektálással és spektrumanalízissel. Az általuk kidolgozott módszerrel és a hagyományos mikrobiológiai módszerrel (*L. plantarum*) kapott eredmények között nem volt szignifikáns különbség.

Az előző fejezetekben bemutatott B-vitaminokhoz hasonlóan a B₅-vitamin is detektálható **fluorimetriásan** származékképzést követően. Pakin és munkatársai [2004] élelmiszerek teljes pantoténsav-tartalmát oszlop utáni kétlépéses származékképzéssel határozták meg. Az eljárás során a pantoténsav először lúgos hidrolízissel β -alaninná alakul, ami 2-merkaptoetanol jelenlétében orto-ftaldialdehiddel reagálva fluoreszcens 1-alkiltio-2-alkilizozindolt képez. A teljes pantoténsav kinyeréséhez pepszint, panteteinázt és lúgos foszfátot használtak. A mintatisztítást erős anion- és erős kationcserélő szilárdfázisú extrakcióval végezték. A módszer, alacsony kimutatási határának köszönhetően alkalmas bármely élelmiszer pantoténsav-tartalmának meghatározásához.

A B₅-vitamin gyenge UV abszorbanciájának és a bonyolult származékképzést igénylő fluorimetriás detektálásának köszönhetően, meghatározásakor egye inkább előtérbe kerül a **tömegspektrometriás** (MS) rendszerek alkalmazása. Mittermayr és munkatársai [2004] dúsított élelmiszerek B₅-vitamin-tartalmát HPLC-MS kapcsolt technikával határozták meg. Az MS detektáláshoz **elektroporlasztásos** ionizációt (electrospray ionization, ESI) alkalmaztak. Az élelmiszerek szabad pantoténsav-tartalmát vizes oldatuk hőkezelésével nyerték ki.

Rychlik és munkatársai [2003a] **izotóphígításon** alapuló HPLC-MS módszert dolgoztak ki, ahol belső standardként [¹³C, ¹⁵N] pantoténsavat használtak.

3.8.3.1.5 B₆-vitamin

HPLC-s technikák használata lehetőséget nyújt a piridoxin (PN), a piridoxal (PL), a piridoxamin (PM), és 5'-foszfát észterek (PNP, PLP, PMP), valamint a glikolizált piridoxin (PN-glükozid) szelektív meghatározására. Az alkalmazott mintaelőkészítéstől függően a minta teljes vagy biológiailag felvehető B₆-vitamin-tartalma egyaránt meghatározható.

Az [EN 14164:2002] szabvány az élelmiszerek **biológiailag hasznosítható B₆-vitamin-tartalmának** meghatározását írja le, így a benne foglalt mintaelőkészítési eljárás nem terjed ki a glikozidos formák meghatározására. A szabványban leírt módszer a felvehető B₆-vitamin-tartalmat piridoxin formájában határozza meg. Ebben az esetben az extrakció egy savas hidrolízisből és egy enzimatisztításból áll, mely során a foszfát észterek defoszforilálását főként takadiasztáz enzimmel végzik [ESTEVE, 1998; VANSCHOONHOVEN, 1994]. A folyamat során Fe²⁺ jelenlétében glioxilsavval a piridoxamin piridoxállá, majd a piridoxál lúgos közegben nátriumborohidriddel piridoxinná alakul át.

Egy másik szabványban [MSZ EN 14663:2006] leírt mintaelőkészítés az élelmiszerminták **teljes B₆-vitamin-tartalmának** (beleértve a glikozidos formákat is) meghatározását szolgálja. A

savas hidrolízist egy defoszforilációs és egy deglikolizációs lépés követi savas foszfatáz, illetve β -glükózidáz felhasználásával. A két mintaelőkészítéssel kapott eredmények különbsége adja meg a minta PN-glükózid tartalmát.

A B₆-vitamin vizsgálatának egy másik alternatívája az egyes **vitamerek**, illetve a **PN-glükózid szelektív** meghatározása a foszforilált és a glükózidos formák megtartásával. Ebben az esetben olyan mintaelőkészítés szükséges, mellyel a különböző vitamerek eredeti formájukban vonhatók ki a mintából. Ehhez legelterjedtebben perklórsavat [ARGOUDELIS, 1997; TOUKAIRINODA, 1989], és metafoszforsavat [ANG, 1988] használnak.

A B₆-vitamerek elválasztására a fordított fázisú [ESTEVE, 1998; SIERRA, 1997; VINAS, 2004], fordított fázisú ionpár [ADDO, 1988; SAMPSON, 1995], illetve ioncserélő [VANDERSLICE, 1981] kromatográfia egyaránt alkalmas. A komponensek **fluoreszcenciás detektálása** a gyakorlatban sokkal inkább elterjedt, mint az UV detektálás [ARGOUDELIS, 1997; EKANAYAKE, 1988; ESTEVE, 1998; SIERRA, 1997]. A vitamerek és foszfátészterek természetes fluoreszcenciával rendelkeznek, melynek intenzitása pH függvényében változik. Alacsony pH-n a PLP fluoreszcenciás intenzitása a többi B₆-vegyülethez képest jelentősen gyengébb. A foszforilált formák meghatározásakor azonban ez az intenzitásbeli különbség javítható oszlop utáni nátrium-biszulfit használatával [ARGOUDELIS, 1997; EKANAYAKE, 1988; SIERRA, 1997]. A B₆-vitamerek szabad formában történő meghatározásakor az effluens dikáliumhidrogénfoszfáttal történő semlegesítése javít a szelektivitáson, kiküszöbölve az esetleges interferenciákat [SIERRA, 1997; VANSCHOONHOVEN, 1994].

3.8.3.1.6 B₉-vitamin

Az élelmiszerek természetes foláttartalma, néhány kivételtől eltekintve (máj, élesztő) nagyon alacsony. Vitamerjei közül főként a THF (tetrahidrofolát), az 5-metil-THF, az 5-formil-THF, a 10-formil-THF, valamint poliglutamát formái találhatók meg az élelmiszerekben.

Kromatográfiás vizsgálatuk során a folátokat és a poliglutamát-folátokat enzimatisz uton monoglutamát formákká, a 10-formil-THF-ot hőkezeléssel 5-formil-THF-á alakítják, így analitikai vonatkozásban a THF, 5-metil-THF, 5-formil-THF formáknak és a folsavnak van jelentősége [BALL, 2006; BLAKE, 2007; QUINLIVAN, 2006]. A különböző, természetes folátformák összetettségéből következően a mintaelőkészítés, és –tisztítás kulcsfontosságú lépések. Az oxidatív veszteség elkerülése érdekében a kivonáshoz használt pufferekhez legtöbb esetben antioxidánsként aszkorbinsavat is adnak, melyet gyakran kombinálnak 2-merkaptóetanollal [PFEIFFER, 1997] vagy dithiothreitollal [LUCOCK, 1993]. A folátveszteség

tovább csökkenthető az extraktum oxigén-mentesítésével, illetve a fény-degradációt megelőző sárga fény használatával [QUINLIVAN, 2006].

Élelmiszerek **teljes foláttartalmának** kinyeréséhez számos esetben **mechanikai feltárással** kombinált **hőkezelést** alkalmaznak, melyek a folátok kötésből történő felszabadítását, valamint a fehérjék denaturálását szolgálják [IWATANI, 2003; MATTILA, 2001]. A folátok felszabadításának egy másik, egyre szélesebb körben elterjedt megoldása az élelmiszerminták **enzimes feltárása** három enzim, úgymint egy proteáz, egy α -amiláz és egy folát-konjugáz (pteroil- γ -glutamil karboxipeptidáz) együttes alkalmazásával [LIM, 1998; PFEIFFER, 1997; RYCHLIK, 2007; YON, 2003]. Dúsított élelmiszerek esetében az alacsony természetes foláttartalomból kifolyólag az enzimes kezelés elhagyható [BALL, 2006].

A mintaelőkészítést követően a monoglutamát formákat főként **fordított fázisú** [BROUWER, 2008; GUJSKA, 2005a; GUJSKA, 2005b; PATRING, 2007] vagy **fordított fázisú ionpár** kromatográfiás elválasztást [BELZ, 1998; OSSEYI, 2001; WILSON, 1984] alkalmazva határozzák meg.

A folátok detektálására egyaránt használnak **UV és fluoreszcens** detektorokat, melyek közül a fluoreszcens módszer az elterjedtebb. Az előbbi főként dúsított élelmiszerek folsavtartalmának meghatározásakor alkalmazzák. [PRIETO, 2006]. A folsav kivételével a folátok rendelkeznek természetes fluoreszcenciás tulajdonsággal. A folsav fluoreszcenciája növelhető **oszlop előtti**, 9-fluorenil-metil-kloroformáttal (FMO-CI) végzett származékképzéssel [GAUCH, 1993], vagy **oszlop utáni** oxidatív hasítással és erős fluoreszcenciával rendelkező pterin fragmens képzésével [HAHN, 1991]. Doherty és Beecher [2003] dúsított élelmiszerek természetes folát- és hozzáadott folsavtartalmát vizsgálták UV és fluoreszcenciás detektálás kombinálásával, mely során a folsavat oszlop után beépített fotokémiai reaktorral alakították fluoreszcenssé.

A legújabb tudományos közlemények egyre nagyobb számban számolnak be LC-MS technikák alkalmazásáról folsav és folátok vizsgálata esetén. Patring és munkatársai [2007] élesztőből LC-MS ESI rendszerrel, míg Brouwer és munkatársai [2008] rizsből LC-MS/MS ESI technikával határozták meg a teljes foláttartalmat monoglutamátok formájában.

3.8.3.1.7 C-vitamin

Az élelmiszerek természetes C-vitamin-tartalmának meghatározásakor a két biológiailag aktív formájának, az aszkorbinsavnak, valamint annak oxidált alakjának a dehidro-aszkorbinsavnak együttes vizsgálata szükséges.

A dehidro-aszkorbinsav instabilitásából kifolyólag a C-vitamin-tartalmat legtöbb esetben **aszkorbinsav formájában** határozzák meg, a dehidro-aszkorbinsav aszkorbinsavvá redukálását követően [FURUSAWA, 2001; HERNANDEZ, 2006; LYKKESFELDT, 2000; ODRIOLAZOLA-SERRANO, 2007; SHEPHARD, 1999]. Redukálószerként főként L-ciszteint [EN 14130:2003], homociszteint [BEHRENS, 1987; BRAUSE, 2003], ditiotreitolt (DTT) [LYKKESFELDT, 1995; ODRIOLAZOLA-SERRANO, 2007] és trisz-[2-karboxietil]-foszfint (TCEP) [FONTANNAZ, 2006] alkalmaznak. Az aszkorbinsav dehidro-aszkorbinsavvá oxidálódása megakadályozható, ha az extrakció során különböző savakat (citromsav, ecetsav, perklórsav, ortofoszforsav) adagolunk a mintához. Erre a célra a metafoszforsav bizonyult a leghatékonyabbnak [DAOOD, 1996; HERNANDEZ, 2006; KALL, 1999]. A C-vitamin aszkorbinsav formájának meghatározásán kívül, a két biológiailag aktív forma együttes [BOGNÁR, 2000; KALL, 1999], vagy az aszkorbinsav oxidációját követően dehidro-aszkorbinsavként [BURINI, 2007] történő meghatározására is számos példát találhatunk a szakirodalomban.

Kisméretű poláris molekulák révén az aszkorbinsav és a dehidro-aszkorbinsav visszatartása hagyományos **fordított fázisú kromatográfiával** igen nehéz feladat, ennek ellenére ez az elválasztástechnikai módszer az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás a C-vitamin meghatározására. Megfelelő visszatartás magas víztartalmú, alacsony pH-jú mozgófázissal biztosítható. Az aszkorbinsav pKa-2 értékénél savasabb tartományban ionvisszaszorított formában van jelen, így javul a visszatartása [FEKETE, 2003; NOVAKOVA, 2008]. Ezért a C-vitamin fordított fázisú kromatográfiás meghatározásához pH szabályozóként perklórsavat [NOVAKOVA, 2008], trifluoroecetsavat [SHEPHARD, 1999], kénsavat [ODRIOLAZOLA-SERRANO, 2007] vagy foszforsavat [IWASE, 2000; KAFKAS, 2006] használnak.

Az aszkorbinsav, és a dehidro-aszkorbinsav meghatározásához az **ionpár kromatográfia** [DAOOD, 1994; KALL, 1999; KARLSEN, 2005; MULLER, 2001; SALMINEN, 2008] és **ionkizárásos kromatográfia** [CHENG, 1999; HERNANDEZ, 2006] alkalmazása is elterjedt. Emellett az aszkorbinsav visszatartása, gyenge sav révén, erős **anioncserélő** állófázison is kielégítő [FARBER, 1983]. Egyszerűségének köszönhetően az elmúlt években a HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) technika is egyre nagyobb népszerűségnek örvend [HEMSTROM, 2006].

Néhány kutatócsoport az aszkorbinsav és a dehidro-aszkorbinsav kvantitatív meghatározásához **belső standardként**, hasonló szerkezeti felépítésükből kifolyólag, hidrokinont [WATSON, 1993] vagy izo-aszkorbinsavat [KUTNINK, 1987] alkalmazott. Használatuk nem szerencsés, mivel tárolás és mintaelőkészítés során oxidációjuk könnyen felléphet. Ezen felül, az izo-aszkorbinsav előfordulhat néhány élelmiszerben is. Belső standardként sokkal inkább hippursavat [CHEN, 2006], nikotinsavat [MAIA, 2007], húgysavat [CAMMACK, 1991], klorogénsavat vagy 4-hidroxi-acetanilidet [NOVAKOVA, 2008] használnak.

Az aszkorbinsav és a dehidro-aszkorbinsav együttes meghatározása, eltérő detektálási tulajdonságukból adódóan analitikai nehézségekbe ütközik. Az aszkorbinsav ugyanis a dehidro-aszkorbinsavval szemben jelentős UV abszorbanciával, és elektrokémiai reakcióval jellemezhető. Míg a dehidro-aszkorbinsav származékképzést követően fluoreszcenciás detektálással határozható meg [BOGNÁR, 2000; KALL, 1999], ami viszont az aszkorbinsavról nem mondható el. Ebből kifolyólag egy detektálási mód alkalmazása a két komponens egymásba átalakítását követően lehetséges, ellenkező esetben két detektálási technika párhuzamos használatára van szükség [KALL, 1999; SIMOES, 2003].

Az aszkorbinsav meghatározásához legelterjedtebben **UV** [HERNANDEZ, 2006; RIZZOLO, 2002], illetve DAD [DAOOD, 1994; FURUSAWA, 2001; KAFKAS, 2006; MULLER, 2001] detektorokat alkalmaznak. Az aszkorbinsav és a dehidroaszkorbinsav együttes UV detektálása a dehidro-aszkorbinsav 4,5-dimetil-1,2-feniléndiaminnal történő derivatizálását követően lehetséges 360 nm-en [GIOIA, 2007].

Az aszkorbinsav viszonylag erős reaktivitásából adódóan könnyen detektálható **elektrokémiai detektorral** amperometriás és coulometriás módban egyaránt [HIDIROGLOU, 1998; IWASE, 2000; SALMINEN, 2008]. A dehidro-aszkorbinsav elektrokémiailag inaktív, így csak aszkorbinsavvá redukálását követően detektálható ily módon.

MS használata C-vitamin meghatározására, érzékenysége és szelektivitása ellenére nagyon ritka. Csak néhány, főként többkomponenses módszereknél fordul elő. Lavoie és munkatársai [2004] a C-vitamin fény hatására keletkező oxidatív bomlástermékeinek vizsgálatára (dehidroaszkorbinsav, 2,3-diketogulin sav) alkalmazott LC-MS technikát elektropray ionizációval negatív módban.

3.8.3.2 Két vitamin együttes meghatározása HPLC technikákkal

A folyadékkromatográfiás technikák a vitaminok egyedi meghatározásán túl lehetőséget nyújtanak egyes vitaminok és vitamerek együttes meghatározására is.

3.8.3.2.1 *Tiamin és riboflavin*

Az élelmiszerek teljes (természetes és hozzáadott) B₁- és B₂-vitamin-tartalmának egyidejű meghatározása a kinyerésükhöz szükséges mintaelőkészítés hasonlóságán (savas hidrolízis, enzimes feltárás) alapszik [MSZ EN 14122:2006; MSZ EN 14152:2004].

A dúsított élelmiszerek, mint például a reggeli gabonapelyhek tiamin- és riboflavin-tartalma származékképzés (derivatizálás) nélkül, egy menetben, **fordított fázisú ionpár kromatográfiával** és **UV** detektálással 254 nm-en meghatározható [KAMMAN, 1980]. Ennek ellenére a legtöbb esetben mégis **fluoreszcenciás** detektálást alkalmaznak a tiamin lúgos kálium-hexaciano-ferrát (III)-tal történő **tiokrómmá** alakítását követően. Az alkalmazott kromatográfiát az határozza meg, hogy oszlop előtti vagy utáni derivatizációra került-e sor. Az **oszlop előtti derivatizáció** a tiokróm és a riboflavin fordított fázisú kromatográfiás elválasztását teszi lehetővé. Az elválasztást követően a detektálást két fluoreszcenciás detektor együttes alkalmazásával [FELLMAN, 1982; REYES, 1989] vagy változtatható hullámhosszú fluoreszcenciás detektorral [SIMS, 1993] oldották meg. A riboflavin és a tiokróm mérésének általában kedveltebb módja a nagyobb érzékenységet biztosító, egymás utáni fluoreszcenciás meghatározás [FERNANDO, 1990; FINGLAS, 1984; HASSELMANN, 1989; TANG, 2006]. **Oszlop utáni derivatizációval** a tiamin és riboflavin fordított fázisú ionpár kromatográfiás elválasztást követően, két fluoreszcenciás detektor együttes alkalmazásával lehetséges [MAURO, 1984; WIMALASIRI, 1985].

3.8.3.2.2 *Riboflavin és piridoxin*

Ayi és munkatársai [1986] egy viszonylag egyszerű módszert dolgoztak ki a riboflavin és a piridoxin együttes meghatározására szója- és tejalapú tápszerekből. A két vitamin természetes fluoreszcenciás tulajdonságát kihasználva egyetlen **fluoreszcenciás** detektort alkalmaztak megfelelő szűrőkkel felszerelve. Gatti és Gioia [2005] B₆-vitamerek (PLP, PL, PN, PM) és a riboflavin együttes meghatározásának módszerét dolgozták ki és alkalmazták gyógyszerkészítményeken, dúsított tejen és anyatejen. Az extrakcióhoz trifluoroecetsavat

használtak, majd fordított fázisú kromatográfiás elválasztást követően fluoreszcenciás detektálást alkalmaztak. A piridoxal-5'-foszfát fluoreszcenciás intenzitását oszlop utáni UV (254 nm) besugárzással növelték. Midttun és munkatársai [2005] emberi vérplazma B₂- és B₆-vitamin szintjének meghatározására egy **LC-MS/MS ESI** módszert dolgoztak ki. Hét B₆- (PN, PL, PM, PNP, PLP, PMP, 4-piridoxik sav) és három B₂- vitamer (riboflavin, FMN, FAD) elválasztásához fordított fázisú ionpár kromatográfiát alkalmaztak. Állófázisként RP C₈-as oszlopot, ionpárképzőként HFBA-t használtak. A mennyiségi meghatározást belső standardok, nevezetesen d₂-piridoxal-5'-foszfát, d₃-piridoxal és d₈-riboflavin segítségével végezték.

3.8.3.2.3 Nikotinamid és piridoxin

Rees és munkatársai [1989] dúsított élelmiszerek nikotinamid- és piridoxin-tartalmának meghatározásához **fordított fázisú ionpár kromatográfiás** módszert dolgoztak ki UV és fluoreszcenciás detektálás kombinálásával. Az extrakció során (melegítés 2 N H₂SO₄-val 30 percig 100°C-on) a nikotinamid egy része (megközelítőleg 6%-a) nikotinsavvá alakult, melyet a standardoldat mintaelőkészítéssel azonos kezelésével korrigáltak.

3.8.3.2.4 Folsav és pantoténsav

Rychlik [2003b] izotóphígításon alapuló **LC/MS/MS ESI** módszert dolgozott ki dúsított élelmiszerek és étrend-kiegészítők folsav- és pantoténsav-tartalmának együttes meghatározásának céljából. Belső standardként [²H₄] folsavat, valamint [¹³C₃, ¹⁵N] pantoténsavat használt. Az elválasztást fordított fázisú kromatográfiával oldotta meg.

3.8.3.3 Három, vagy több vitamin együttes meghatározása HPLC technikákkal

Három vagy több vitamin együttes meghatározása számos komplex analitikai problémát vet fel. Ennek oka egyrészt a vitaminok különböző kémiai és fizikai tulajdonságai (sav-bázis jellemzői), melyek jelentősen megnehezítik egyidejű meghatározásukra alkalmas módszerek kidolgozását. Másrészt az élelmiszereszek összetett mátrixaiban, a vitaminok csupán mikro-komponensekként vannak jelen.

A vízben oldódó vitaminok mérésének hivatalos módszerei gyakran bonyolult és sokszor nem teljesen specifikus mikrobiológiai vizsgálatokon alapulnak. A különböző étrend-

kiegészítők, dúsított élelmiszerek megjelenésével és elterjedésével egyre nagyobb az igény, főként minőségbiztosítási célból, időtakarékos és költséghatékony, többkomponenses módszerek iránt. Erre a célra a különböző HPLC-s módszerek bizonyultak a legalkalmasabbnak.

A többkomponenses módszerek egyik kulcslépése a mintaelőkészítés, mely biztosítja a vitaminok egyidejű kinyerését a vizsgálandó termékből. Az extrakciónak, céljától függően, két megközelítése létezik, az egyik a hozzáadott, a másik a teljes (hozzáadott, természetes) vízben oldódó vitamintartalom kinyerésre fókuszál.

A **hozzáadott** vitamintartalom kinyerése céljából egyszerűbb mintaelőkészítés is elegendő, mivel a hozzáadott komponensek nem kötődnek szorosan a mátrixhoz. Ezzel szemben a **teljes vitamintartalom** meghatározásához a kötésben lévő vitaminokat is fel kell szabadítani.

Ez alapján a gyógyszerkészítmények, étrend-kiegészítők, dúsított élelmiszerek **hozzáadott** vitamintartalmának kivonása egyszerűbb extrakcióval megoldható. Az extrahálószer kiválasztása azonban nagy körültekintést igényel. Több vízben oldódó vitamin együttes meghatározásakor szem előtt kell tartani, hogy oldhatósági és stabilitási tulajdonságaik sok esetben eltérőek, ezért a megfelelő mintaelőkészítés kiválasztása kompromisszumokon alapszik. Ebből a szempontból a legnagyobb kihívást a C- és B-vitaminok együttes meghatározása jelenti.

Például Heudi és munkatársai [2005] a B₉-vitamin kinyerési hatásfokának javítása érdekében nátrium-hidroxid oldatot használtak. Annak ellenére, hogy az extrakciót követően a kivonat pH-ját 7-re azonnal visszaállították, a C-vitamin rövid időn belül mégis elbomlott.

A szakirodalomban több vízben oldódó vitamin együttes kivonásának számos egyéb megoldásával is találkozhatunk, mely során meleg vizet [CHATZIMICHALAKIS, 2004; MARSZALL, 2005], foszfát puffert [CHEN, 2007], ortofoszforsavat [VIDOVIC, 2008], trifluoro-ecetsav oldatot [KLEJDUS, 2004], nátrium-hidroxid oldatot [HEUDI, 2005], ammónium oldatot [CHEN, 2006] alkalmaznak extrahálószerként.

A vitamin- és energiatalok vizsgálata egyszerűbben, gáztalanítást követően közvetlenül elvégezhető [ARANDA, 2006; IIDA, 1990]. Ezzel szemben néhány, főként tejalapú élelmiszer (tej, szójatej, tápszerek, tejpor) esetében a fehérjék kicsapása érdekében triklórecetsavat [ALBALAHURTADO, 1997] alkalmaznak a mintaelőkészítés során.

Az élelmiszerek **teljes** vitamintartalmának meghatározása összetettebb mintaelőkészítést igényel, mely a B-vitaminok esetében savas hidrolízisből és enzimkezelésből áll, [LEBIEDZINSKA, 2007; LEPORATI, 2005; VINAS, 2003] mely a kémiai kötésben lévő formák felszabadítását szolgálja. Ezen extrakciós körülmények között azonban a C-vitamin

elbomlik, így az élelmiszerek teljes B- és C-vitamin-tartalmának együttes meghatározása nem megoldható.

Ndaw és kutatócsoportja [2000] egy enzimkeveréket állított össze, mely a természetes B₁-, B₂- és B₆-vitaminok együttes extrakcióját biztosítja. Az enzimkeverék α -amilázból, papainból (proteáz), savas foszfatazból és β -glükózidázból áll. Az α -amiláz a keményítő lebontását, a papain a fehérjékhez kötött B₁-és B₂-vitaminok felszabadítását, a savas foszfataz a foszforilált formák felszabadítását szolgálja. A β -glükózidáz a teljes B₆-vitamin-tartalom (a glükolizált formáját is beleértve) meghatározásához szükséges.

Három vagy több vízben oldódó vitamin együttes meghatározásának egyik leggyakoribb módja a **fordított fázisú kromatográfia**. Moreno és munkatársai [2000] öt, Chatzimichalakis és munkatársai [2004] hét, Viñas és munkatársai [2003] nyolc B-vitamint határoztak meg fordított fázisú kromatográfiával.

Fordított fázisú kromatográfia használata során sok esetben problémát jelent a polárosabb vitaminok gyenge visszatartása. Ezen komponensek visszatartása **ionpárpépző reagens** használatával (fordított fázisú ionpár kromatográfiával) javítható. A vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása során ionpárpépzőként TFA [CHO, 2000; HEUDI, 2005; KLEJDUS, 2004], trimetilamin [MARSZALL, 2005; ZAFRA-GOMEZ, 2006], hexán-1-szulfonsav [VIDOVIC, 2008], oktán-szulfonsav [ALBALAHURTADO, 1997], dioktil-szulfoszukcinát [WOOLLARD, 2002] és HFBA [CHEN, 2006] egyaránt használható.

A molekulák eltérő sav-bázis tulajdonságából adódóan a legtöbb esetben **gradiens elúciós** program kidolgozása szükséges, bár néhány esetben **izokratikus** megoldással is találkozhatunk [ALBALAHURTADO, 1997; EKINCI, 2005; LEBIEDZINSKA, 2007; MARSZALL, 2005]. Például Ekinci és munkatársai [2005] hat B-vitamin valamint a C-vitamin fordított fázisú kromatográfiás elválasztását egy 40 perces izokratikus módszerrel kiviteleztek.

A vízben oldódó vitaminok együttes meghatározásának legelterjedtebb módja az **UV detektálás egy** [CHATZIMICHALAKIS, 2004; KLEJDUS, 2004], vagy nagyobb szelektivitás érdekében **több** hullámhossz [ALBALAHURTADO, 1997; EKINCI, 2005; MORENO, 2000; VINAS, 2003] alkalmazásával. Emellett **UV-coulometriás** vagy az **UV-fluoreszcenciás** kombinált detektálással is találkozhatunk, melyek alkalmazásával sok esetben jobb érzékenység és nagyobb szelektivitás érhető el. Például Marszall és munkatársai [2005] valamint Lebiedzinska és munkatársai [2007] a tiamint UV, a B₆- és a B₁₂-vitaminokat coulometriás elektrokémiai detektálással mérték. Zafra-Gómez és munkatársai [2006] 10 vízben oldódó

vitamin (B-, és C-vitaminok) vizsgálata során a piridoxint és a riboflavint fluoreszcenciás, a többi vitamint öt különböző hullámhossz alkalmazásával UV-VIS detektálással mérték.

Napjaink egyik legkorszerűbb detektálási módja, a **szerves tömegspektrometria** a vitaminkutatás területén is egyre nagyobb teret hódít magának. A multivitaminos módszerek kidolgozása során is egyre több kutatócsoport választja a HPLC-MS, illetve a HPLC-MS/MS kapcsolt technikákat, jobb szelektivitás és nagyobb érzékenység elérése érdekében.

Elsők között Iida és munkatársai [1990] használtak több vitamin (tiamin, nikotinsav, nikotinamid, pantoténsav, piridoxin) együttes meghatározásához HPLC-MS kapcsolt technikát. Chen és munkatársai [2006] multivitamin tabletták taurin és vízben oldódó vitamintartalmát (B- és C-vitaminok) vizsgálták HPLC-MS ESI technikával. Mennyiségi meghatározáshoz, belsőstandardként hippursavat alkalmaztak. Leporati és munkatársai [2005] olasz és dúsított tészták B-vitamin-tartalmát vizsgálták LC-MS/MS technikával. Méréseik során két, azaz ESI (+ és -) és APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) ionizációs módot alkalmaztak. Chen és munkatársai [2007] LC-UV-(ESI+)-MS/MS kapcsolt rendszeren 25 perces gradiens elúciós módszert dolgoztak ki hét B-vitamin elválasztása.

4 CÉLKITŰZÉSEK

A különböző vitaminkészítmények, étrend-kiegészítők és dúsított élelmiszerek egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek az egészségüket óvni akaró fogyasztók körében. Ezen termékek szélesedő skálájának megjelenése és fokozódó mértékű elterjedése következtében egyre nagyobb hangsúlyt kell fektetni a minőség ellenőrzésre a fogyasztók védelme érdekében. A vízben oldódó vitaminok meghatározását szolgáló szabványos módszerek gyakran bonyolultak, időigényesek, pontatlanok, korszerűtlen technikákon alapulnak, és nem teszik lehetővé a vízben oldódó vitaminok egy menetben történő meghatározását. Doktori munkám célkitűzései ezek alapján a következők:

- Olyan korszerű analitikai módszerek kidolgozása, melyek lehetővé teszik a vízben oldódó vitaminok (C- és B-vitaminok) dúsításhoz legelterjedtebben alkalmazott formáinak szelektív, egy menetben történő, gyors, rutinszerű meghatározását.
- A C- és B-vitaminok egyidejű kinyerését biztosító mintaelőkészítési eljárás kidolgozása és validálása.
- A kidolgozott módszerek alkalmazása a legjelentősebb, kereskedelmi forgalomban elérhető, vízben oldódó vitaminokkal dúsított termékeken.
- Egyes B-vitaminok, vitamereik valamint jellemző származékaik egy menetben történő vizsgálatát szolgáló analitikai eljárás kidolgozása, mely lehetőséget teremt az élelmiszerek természetes, valamint összes B-vitamin-tartalmának meghatározásához.
- Vitaminnal dúsított gabonapehelyben jelenlévő szabad, kötött valamint biológiailag hozzáférhető B-vitamin-formák egymáshoz viszonyított arányának meghatározása.

5 ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1 Vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek

Vizsgálataim során minden esetben analitikai, vagy nagyobb tisztaságú vegyszerekkel és Millipore Milli-Q ELIX 3 típusú készülékkel előállított nagy tisztaságú ioncserélt vízzel ($18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) dolgoztam.

A kromatográfiás módszerfejlesztésekhez különböző mozgófázisokat készítettem, melyekhez kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4) és dikálium-hidrogén-foszfát (K_2HPO_4) sókat (Merck, Darmstadt, Németország), metanolt (MeOH; Carlo Erba Reagents, Milánó, Olaszország), hangyasavat (HCOOH ; Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország), valamint ionpárképzőként trifluoro-ecetsavat (trifluoroacetic acid, TFA; Merck, Darmstadt, Németország) és heptafluoro-vajsavat (heptafluorobutyric acid, HFBA; Fluka Buchs, Svájc) használtam.

Az alkalmazott vitamin standardok közül az L-aszkorbinsavat (C), a riboflavint (B_2), a riboflavin-5'-monofoszfátot (FMN), a nikotinamidot (NA), a nikotinsavat (NS), a pantoténsavat (B_5), a piridoxin-hidrokloridot (B_6 vagy PN), a piridoxál-5'-foszfát-monohidrátot (PLP) és a folsavat (B_9) a Fluka-tól (Buchs, Svájc), a tiamin-hidrokloridot (B_1), a tiamin-monofoszfátot (TMP), a piridoxamin-dihidrokloridot (PM) és a piridoxal-hidrokloridot (PL) a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország) szereztük be.

Belső standardként hippursavat (HP, Sigma-Aldrich) használtam, melynek $1000 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú törzsoldatát meleg vízzel ($\sim 60^\circ\text{C}$) készítettem.

A minták hozzáadott, illetve összes vitamintartalmának kinyerését szolgáló mintaelőkészítések, valamint a standardoldatok elkészítése során használt oldatokhoz a sósavat (HCl), a nátrium-acetátot (NaCH_3COO), az ecetsavat (CH_3COOH), az ammóniát (NH_4OH) (25%), a nátriumhidroxidot (NaOH) a Merck-től (Merck, Darmstadt, Németország), a C-vitamin stabilitását biztosító metafoszforsavat (HPO_3), valamint a dehidro-aszkorbinsavat L-aszkorbinsavvá redukáló L-ciszteint a Sigma-Aldrich-től rendeltük.

Az élelmiszerek kötésben lévő vitamintartalmának felszabadítását Taka-diasztáz (Fluka) és burgonyából kinyert savas foszfatáz ($1,1 \text{ U}/\text{mg}$; Sigma-Aldrich) defoszforiláló hatású enzimek, valamint mandula eredetű β -glükózidáz ($5,2 \text{ U}/\text{mg}$; Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) segítségével végeztem.

5.2 Vitamintartalom meghatározásához alkalmazott analitikai rendszerek

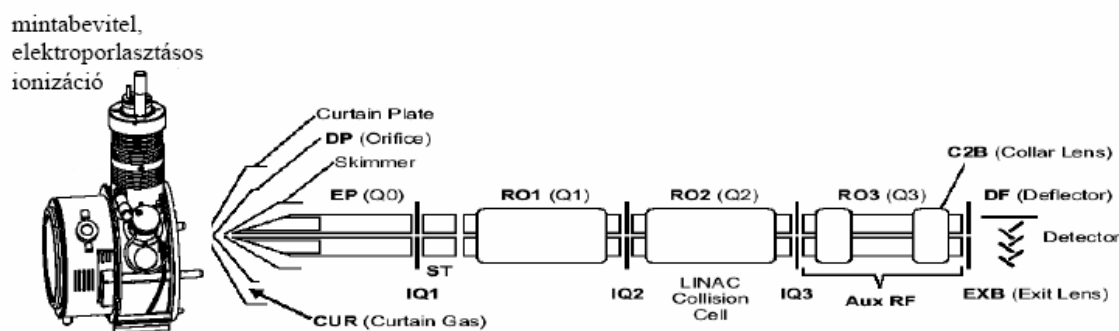
A vízben oldódó vitaminok mérés technikájának kidolgozását két mérőrendszeren végeztem, melyek leírását a következőkben röviden ismertetek.

5.2.1 HPLC-UV-VIS rendszer

Méréseim során a komponensek folyadékkromatográfiás elválasztásához és ultraibolya-láthatófény hullámhossz tartományban (UV-VIS) történő detektálásához légmentesítő egységgel, kétcsatornás pumpával, automata mintaadagolóval (Agilent 1200), kolonna termosztáttal és diódasoros detektorral (DAD) felszerelt Agilent 1100 típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) rendszert (Agilent, Németország) használtam.

5.2.2 HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS rendszer

A komponensek elválasztását és UV-VIS detektálását az 5.2.1. fejezetben bemutatott HPLC-rendszeren végeztem. A kolonnát elhagyó folyadékáramot egy kapilláriscsövön keresztül (0,125 mm belső átmérőjű) egy 3200 Q-TRAP hármass kvadrupol rendszerű és lineáris ioncsapdával felszerelt hibrid tandem tömegspektrométerbe (Applied Biosystem (USA): Applera, Magyarország) vezettem. Ionforrásként TurboIonSpray[®] típusú pneumatikus ESI (Electrospray Ionization) ionforrást alkalmaztam. A porlasztás nitrogén gáz segítségével történt. Az adatok kiértékelését az Analyst szoftver 1.4.2. számú verziójával végeztem. Az ESI-MS/MS felépítése az **1. ábrán** látható.



1. ábra Az ionforrás és a tandem tömegspektrométer kapcsolása

A készülék három kvadrupol tömeg-analizátort tartalmaz, ahol az első hagyományos kvadrupol tömeg-analizátorként funkcionál (Q1), a második (Q2) egy nitrogéngázzal működő ütközési cella, a harmadik (Q3) pedig egy lineáris ioncsapda. Az IQ1-IQ3 a kvadrupolok között elhelyezkedő ionlencsét jelöli.

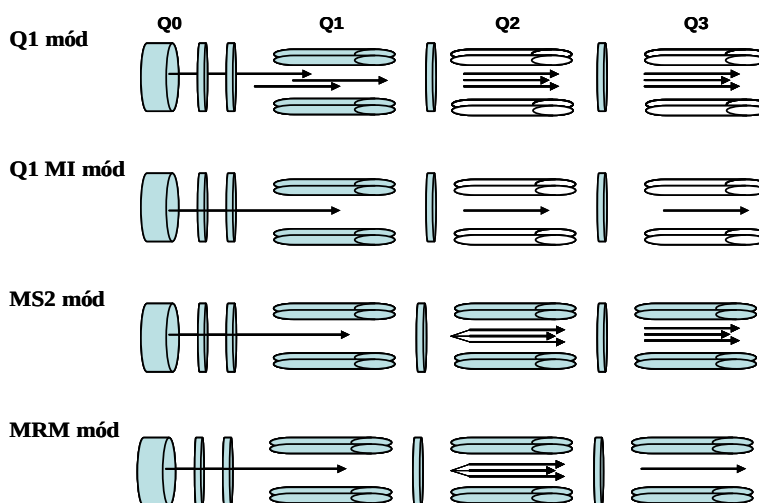
A készülék számos üzemmódja közül munkám során a Q1, aQ1MI, az MRM és az MS2 módokat használtam.

Q1 módban az első kvadrupol az ionforrásban keletkezett molekulaionokat pásztázza. Az adott pásztázási tartományba eső összes tömegre egy ionintenzitás jelet kapunk (2. ábra).

Q1MI (Multiple Ion) módban a Q1 móddal ellentétben az első kvadrupol csak meghatározott számú tömeg (m/z) monitorozását végzi. Így a kapott ionintenzitás jel a megadott tömegre vonatkozik (2. ábra).

MS2 (Product Ion) mód alkalmazásakor mindhárom kvadrupolt használjuk. Az első (Q1) kvadrupol egy megadott komponens (anyaion) kiválasztására szolgál. Kizárólag ez a komponens jut át a Q2-be, ahol nitrogéngázzal ütközve fragmentálódik. Ezt követően a harmadik kvadrupol (Q3) a keletkezett fragmensionokról egy tömegspektrumot vesz fel (2. ábra).

MRM (Multiple Reaction Monitoring) módnál szintén mind a három kvadrupolt használjuk azzal a különbséggel, hogy a harmadik (Q3) kvadrupol ebben az esetben a keletkezett fragmensek közül csak egy bizonyos termékiont szűr ki és juttat tovább a detektorba. Ez a mód ismert célkomponensek mennyiségi meghatározására használható (2. ábra).



2. ábra A tömegspektrométer négy üzemmódjának sematikus ábrája

5.3 Vízben oldódó vitaminok elválasztására kidolgozott módszerek

A vízben oldódó vitaminok elválasztásához a Waters Xterra (C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Waters Corporation, Milford, USA) és a Restek Ultra Aqueous (C₁₈, 150 mm x 3,2 mm, 5 µm; Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) fordított fázisú (Reversed Phase, RP) HPLC oszlopokat használtam. Megóvásuk érdekében minden esetben a kolonnákkal megegyező töltetű előtét oszlopokat alkalmaztam. Mindkét kolonnán két-két módszert dolgoztam ki, melynek paramétereit a **6-7. táblázatokban** foglaltam össze. Mindkét oszloptípusnál az egyik esetben ionpárképző reagenssel segített fordított fázisú kromatográfiát alkalmaztam (RP-IP-HPLC), míg a másik esetben ionpárképző nélkül végeztem az elválasztást. A módszerek részletes tárgyalására az „Eredmények” fejezetben térek ki.

6. táblázat Vízben oldódó vitaminok elválasztására Waters Xterra fordított fázisú analitikai oszlopon (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kidolgozott módszerek

	Módszer I.	Módszer II.
Rendszer	RP-HPLC-UV-VIS	RP-IP-HPLC-UV-VIS
Mozgófázis A	50mM KH ₂ PO ₄ + 50mM K ₂ HPO ₄ (pH7)	0,02 v/v% TFA víz (pH 2,5)
Mozgófázis B	metanol	0,02 v/v% TFA metanol/víz (90/10)
Időartam	28 perc	23 perc
Injektált térfogat	20 µl	20 µl
Áramlási sebesség	1000 µl/perc	1000 µl/perc
Detektálási hullámhosszak	200, 266, 282, 325, 448 nm	266, 285, 448 nm
Komponensek	C, B ₁ , B ₂ , NA, NS, B ₅ , B ₆ , B ₉	C, B ₁ , B ₂ , NA, NS, B ₆ , B ₉

7. táblázat Vízben oldódó vitaminok elválasztására Restek Ultra Aqueous fordított fázisú analitikai oszlopon (150 mm x 3,2 mm, 5 µm) kidolgozott módszerek

	Módszer III.	Módszer IV.
Rendszer	RP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS	RP-IP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS
Mozgófázis A	0,1 v/v% HCOOH víz (pH2,5)	0,05 v/v% HFBA víz
Mozgófázis B	0,1 v/v% HCOOH metanol	0,05 v/v% HFBA metanol
Időartam	30 perc	20 perc
Injektált térfogat	10 µl	10 µl
Áramlási sebesség	500 µl/perc	500 µl/perc
Detektálási hullámhosszak	266, 290 nm	266, 290 nm
Ionizációs mód	ESI pozitív, negatív	ESI pozitív, negatív
Detektálási mód	MRM	MRM
Komponensek	C, B ₁ , B ₂ , NA, NS, B ₅ , B ₆ , B ₉	B ₁ , B ₂ , NA, NS, B ₆ , PL, PM, TMP, FMN, PLP

5.4 Munkám során használt standardoldatok

A kromatográfiás módszerek kidolgozása, és alkalmazása során különböző módon elkészített standardoldatokat használtam, melynek okára az „Eredmények” fejezetben térek ki.

A **Módszer I.** kidolgozása során az aszkorbinsavat ($1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) 1mM HCl oldatban, a folsavat ($50\mu\text{g}/\text{cm}^3$) 0,1 M NaOH oldatban, a többi vitamint, azaz a tiamint ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), a nikotinsavat ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), a nikotinamidot ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), a pantoténsavat ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), a piridoxint ($200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), valamint a riboflavint ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) vízben oldottam fel. A többkomponenses munkaoldatokat ezekből a törzsoldatokból készítettem a kezdeti eluens összetételnek megfelelő, azaz pH7-es foszfát puffer felhasználásával.

A **Módszer II.** kidolgozásánál alkalmazott standard törzsoldatok, az aszkorbinsav kivételével, megegyeznek a Módszer I-nél használtakkal. Az aszkorbinsavat ebben az esetben 2 v/v%-os HPO_3 oldatban oldottam fel. A többkomponenses standardoldatokat is 2 v/v%-os HPO_3 oldattal készítettem.

A **Módszer III.** esetében a tiamin, a nikotinamid, a nikotinsav, a pantoténsav és a piridoxin közös törzsoldatát ($1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) készítettem el. Egy 10 cm^3 térfogatú mérőlombikba a vitaminokból 10-10 mg-ot mértem be és oldottam fel vízben. Ezt követően az oldathoz 12 μl ecetsavat adtam, majd a mérőlombikot vízzel jelre töltöttem.

A riboflavin és a folsav közös törzsoldatát ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) a következő módon készítettem el. Egy 100 cm^3 térfogatú főzőpohárba 10 mg riboflavint és 10 mg folsavat mértem be. A standardokhoz 50 cm^3 vizet és 1 cm^3 25 % -os ammónia oldatot adtam. Mágneses keverővel addig kevertettem, amíg a vitaminok teljesen fel nem oldódtak. Ezt követően az oldat pH-ját hangyasavval hétre állítottam, majd egy 100 cm^3 térfogatú mérőlombikba átmosva vízzel jelre töltöttem.

Az aszkorbinsav törzsoldatát ($1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) és a már összes vitamint tartalmazó munkaoldatokat ebben az esetben is 2 v/v%-os HPO_3 oldattal készítettem.

Módszer IV. kidolgozásánál a tiamin, a nikotinsav, a nikotinamid, a piridoxin, a piridoxamin, a piridoxal, a piridoxal-5'foszfát-monohidrát, a riboflavin-5' monofoszfát valamint a tiamin-monofoszfát $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú törzsoldatait 0,02 M töménységű ecetsav oldattal készítettem.

A riboflavin ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) törzsoldatát a Módszer III-nál leírtakkal megegyező módon állítottam elő.

A többkomponenses munkaoldatok elkészítéséhez szintén 0,02 M koncentrációjú ecetsavoldatot használtam.

A standardoldatokat minden esetben borostyán színű mérőlombikban készítettem, és borostyán színű üvegedényben 4 °C-on tároltam. A törzsoldatokat hetente, a munkaoldatokat naponta készítettem.

5.5 Vízben oldódó vitamintartalom meghatározásához végzett mintaelőkészítések

Doktori munkám során kereskedelmi forgalomban lévő termékeket, úgymint multivitamin tablettát, vitaminokkal dúsított teljes kiőrlésű reggeli gabonapelyhet, gyümölcslevet és instant kakaóport vizsgáltam.

A szilárd mintákat őrlő mozsárral vagy konyhai darálóval porítottam és homogenizáltam. Vizsgálataimhoz a homogén por- és folyadékmintákat használtam. A mintákat 4°C-on, fénytől elzárva tároltam.

5.5.1 Hozzáadott vitamintartalom meghatározásához végzett mintaelőkészítések

Vitamintabletták, valamint funkcionális élelmiszerek C- és B-vitamin-tartalmának egy menetben történő kinyeréséhez Cho és munkatársai [2000] által publikált sósavas extrakciót, valamint az EN 14130:2003 számú szabványban leírt metafoszforsavas mintaelőkészítést vettem alapul.

5.5.1.1 Sósavas mintaelőkészítés

Tizenöt cm³ térfogatú centrifugacsőbe (Falkon) mg pontossággal 1 g homogenizált mintát mértem be, melyet 1 mM-os sósavval 10 cm³-re töltöttem. A vitaminok kinyerését a minta összerázását (VWR labordancer-S40 kémcsőrázó) követően 10 perces ultrahangos (Realsonic cleaner, Magyarország) kezeléssel segítettem elő. Az extrakciót követően a mintákat 20 percig (6000 rpm) centrifugáltam (Hermle Z206A, Németország), majd a felülúszókat cserélhető 0,45 µm pórusátmérőjű cellulózészter membránlappal ellátott fecskendőszűrővel (Millipore, Tullagreen, Írország) leszűrtem. A kromatográfiás vizsgálatokhoz az így kapott szűrleteket használtam.

5.5.1.2 Metafoszforsavas mintaelőkészítés

A darált, homogenizált szilárd mintákból mg pontossággal 1 g-ot, a folyadék halmazállapotú mintákból 5,0 cm³-t mértem be 15 cm³ térfogatú centrifuga csőbe, majd 15 cm³-ig 2 v/v %-os metafoszforsav oldattal jelre töltöttem. Az extrahálás elősegítése érdekében a manuálisan összerázott mintákat 10 percre ultrahangos fürdőbe helyeztem. Ezt követően a mintákat az előzőekben leírt módon centrifugáltam és szűrtem. A szűrletekből 5 cm³-t sötét üvegedénybe pipettáztam (Socorex), melyekhez 2,5 cm³ 4 m/m %-os L-cisztein oldatot adtam. Az így kapott oldatok pH-ját 12,5 v/v %-os ammónia oldattal 7 és 7,2 közötti értékre állítottam (Hanna instruments pH212-típus). Öt perc mágneses kevertetést követően az oldatok pH-ját 20 m/m %-os metafoszforsav oldattal 2,5 és 2,8 közötti értékre állítottam vissza. A kívánt pH elérése után az extraktumokat vízzel 10 cm³-re jelre töltöttem, majd 0,22 µm-es pórusátmérőjű cellulózészter membránszűrővel (Millipore, Tullagreen, Írország) leszűrtem. Az így nyert oldatokat használtam kromatográfiás vizsgálataimhoz.

5.5.2 Teljes vitamintartalom meghatározáshoz végzett mintaelőkészítés

Az élelmiszerminták összes B₁-, B₂- és B₆- vitamin-tartalmának meghatározáshoz az [MSZ EN 14122:2006], az [MSZ EN 14152:2004], valamint az [MSZ EN 14663:2006] számú szabványokban leírt mintaelőkészítési eljárásokat vettem alapul. A B₁- és a B₂-vitaminok kinyerése hasonló módon történik, így extrakciójuk egy menetben elvégezhető.

A három vitamin mintaelőkészítésének első három lépése megegyezik. Ezek alapján első lépésként 5-5 g mintát mértem be 100 cm³ térfogatú Erlenmeyer lombikokba, melyekhez 50 cm³ 0,1 M HCl oldatot adtam. Majd a mintákat óraüveggel lefedve 60 percre 100 °C-os vízfürdőbe helyeztem. Ezt követően a mintaelőkészítések további lépései már eltérőek.

A B₁- és B₂- vitaminok esetében a minták pH-ját szobahőmérsékletre való hűtésük után 2,5 M nátrium-acetát oldattal 4-re állítottam. Majd az extraktumokhoz 500 mg 10 cm³ vízben feloldott taka-diasztáz enzimet adtam. Az így kapott oldatokat parafilmmel letakarva 24 órán keresztül 37 °C-ra felfűtött horizontális rázógéppben inkubáltam. A 24 óra elteltével a mintákat szobahőmérsékletre hűtöttem, majd 100 cm³ térfogatú mérőlombikba átmosva 0,02 M töménységű ecetsavoldattal jelre töltöttem. Ezután a mintákat 15 percig 6000 rpm fordulatszámon centrifugáltam és a felülúszókat 0,45 µm-es pórusátmérőjű cellulózészter membránszűrővel leszűrtem. Ezeket a szűrleteket használtam fel méréseimhez.

A B₆-vitaminra vonatkozó szabvány alapján a vízfürdő után szobahőmérsékletre hűtött mintákat 100 cm³ térfogatú mérőlombikba átmostam, majd vízzel jelre töltöttem. Ezt követően a mintákat 6000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltam. A felülúszókból 12,5 cm³-t főzőpohárba pipettáztam, majd pH-ját nátrium-acetát oldattal (2,5 M) 4,8-ra állítottam. Ezt követően az extraktumokhoz 1-1 cm³ savas foszfatáz (29 mg/cm³) és β-glükozidáz (6 mg/cm³) enzimoldatot adtam. Ezután a B₁- és B₂-vitaminokhoz hasonló módon a mintákat 24 órán keresztül inkubáltam. Szobahőmérsékletre hűtés után az extraktumok pH-ját sósavoldattal (0,1 M) 3-ra állítottam, majd 50 cm³ térfogatú centrifuga csőbe átmosva 25 cm³-re vízzel jelre töltöttem. Végül 0,45 μm-es pórusátmérőjű cellulózészter membránszűrővel leszűrtem. Ezeket a szűrleteket használtam fel méréseimhez.

6 EREDMÉNYEK

A vízben oldódó vitaminok meghatározását szolgáló, mikrobiológiai vagy fizikai-kémiai technikákon alapuló, úgynevezett hivatalos módszerek számos szempontból korszerűtleneknek tekinthetők, és így nem minden esetben felelnek meg az irányukban támasztott elvárásoknak. A jelenleg elfogadott AOAC és nemzetközi szabványok sok esetben időigényes, bonyolult mintaelőkészítést írnak elő, nem teszik lehetővé több vízben oldódó vitamin egy menetben történő meghatározását. Főként a mikrobiológiai módszerekre jellemző, hogy nagy hibaszázalékkal dolgoznak, mely egyrészt a komponensek mátrixtól történő elválasztásának hiányából adódó keresztreakciókból, másrészt az egyes vitamerekkel szembeni egyenlőtlen válaszreakciókból ered. Az elmúlt években közlésre került többkomponenses módszerek jelentős része a B-vitaminok csoportjára fókuszál, és csak néhány publikáció született olyan módszerekről, melyek lefedik a vízben oldódó vitaminok teljes skáláját, beleértve a C-vitamint is. Jelen dolgozat célja egy olyan több komponenses, a B-vitaminok és a C-vitamin együttes meghatározását lehetővé tevő korszerű analitikai módszer kidolgozása volt, mely a vitaminkészítmények, illetve a vitaminokkal dúsított élelmiszerek megbízható, rutin vizsgálatát szolgálja.

6.1 Komponensek kiválasztása

A vizsgálat tárgyát képező komponenscsoport összeállításakor arra törekedtem, hogy olyan vízben oldódó vitaminok, illetve vitamerek alkossák, melyek a vitaminkészítmények és vitaminnal dúsított élelmiszerek gyakori összetevőiként kiemelkedő gyógyszer- és élelmiszeripari jelentőséggel bírnak. Ennek függvényében a **8. táblázatban** felsorolt vízben oldódó vitaminokra, illetve vegyületeire esett a választásom.

8. táblázat A vizsgálat tárgyát képező vízben oldódó vitamin vegyületek

Vitaminok	Vitamin vegyületek
B₁	tiamin-hidroklorid
B₂	riboflavin
B₃	nikotinamid, nikotinsav
B₅	D-pantotenát
B₆	piridoxin-hidroklorid
B₉	folsav
C	L(+)-aszcorbinsav

A vízben oldódó vitaminok közül a biotint a legtöbb élelmiszer az emberek szükségleteinek megfelelő mennyiségben tartalmazza, ezáltal biotinhoány szinte soha nem alakul ki, így a csecsemőtápszerektől eltekintve az élelmiszerek biotinnal történő dúsítása nem jellemző. Ebből kifolyólag az általam vizsgált analit-készlet részét sem képezi.

A B₃-vitamin kivételével vizsgálataim a vízben oldódó vitaminok dúsításhoz legelterjedtebben használt formáira fókuszált. A vizsgálandó komponensek között a B₃-vitamin mindkét, dúsításhoz használt formája szerepel, annak ellenére, hogy főként nikotinamidként kerül az egyes élelmiszerekbe. Azért döntöttem mindkét vitamér vizsgálata mellett, mert ezen vitamin két jellemző formájának együttes meghatározása a többi vitamin számos vitamérjével szemben egyszerűbben megoldható. A többi vízben oldódó vitamin vitamérjének vizsgálata túlmutat a jelenlegi tanulmány célján.

6.2 Vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása RP-HPLC-(UV-VIS) rendszerrel

A szakirodalom alapján, a vízben oldódó vitaminok egyenkénti, valamint egymás melletti meghatározásának legelterjedtebb módja a fordított fázisú, illetve a fordított fázisú ionpár kromatográfia UV-VIS detektálással. Az eddig publikálásra került többkomponenses módszereket alapul véve, első ízben egy egyszerűbb, ionpárképző nélküli, fordított fázisú kromatográfia kidolgozása mellett döntöttem az elválasztást követő UV-VIS detektálással.

Az irodalmi áttekintésben már említésre került, hogy az élelmiszerek (beleértve a vitaminnal dúsítottakat is) B₁₂-vitamin-tartalma alacsony a többi vitaminhoz képest, így az UV detektálás nem biztosít megfelelő érzékenységet kimutatásához. Ebből kifolyólag a vizsgálandó komponensek körét B₁-, B₂-, NS, NA, B₅-, B₆-, B₉-, C-vitaminokra szűkítettem.

A vizsgálat tárgyát képező nyolc vízben oldódó vitamin együttes meghatározása számos analitikai probléma áthidalását követeli meg. A megoldandó problémák egy része ezen vegyületek eltérő fizikai, kémiai tulajdonságaikból ered.

6.2.1 Standardoldatok

Már a standardoldatok elkészítése is nagymértékű körültekintést igényel, az egyes komponensek eltérő oldhatósága, illetve nagyfokú instabilitása miatt. A standardoldatok elkészítésére nem áll rendelkezésünkre egységes módszer, a szakirodalomban számos

megoldással találkozhatunk. A standard törzsoldatok készítése során a riboflavin és a folsav okozta a legtöbb problémát, ami abból adódott, hogy ez a két vegyület nagyon rosszul oldódik vízben. Végül a riboflavin $30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú vizes oldatát tudtam elkészíteni. A folsav jobb oldódását lúgos közegben (0,1 M NaOH) értem el, bár ilyen körülmények között is csak $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ töménységű oldatának elkészítése volt lehetséges. Az aszkorbinsavnak híg savas (1mM HCl) törzsoldatát készítettem el, stabilitásának növelése érdekében.

Az egyes komponensek oldhatóságát, stabilitását, valamint a szakirodalom kínálta lehetőségeket figyelembe véve a standard törzsoldatokat az „Anyag és módszer” fejezetben leírtak alapján készítettem el.

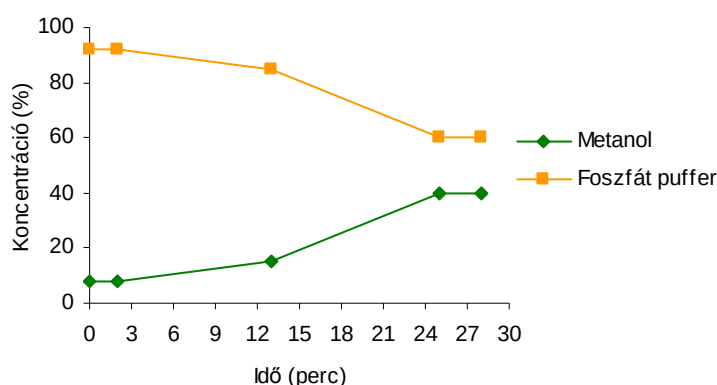
6.2.2 Kromatográfiás módszerfejlesztés

A komponensek fordított fázisú kromatográfiás elválasztásának kidolgozását egy 250 mm hosszúságú, 4,6 mm átmérőjű és $5 \mu\text{m}$ szemcseméretű állófázison (Waters Xterra) végeztem. Az eddigiekben publikálásra került egyszerűbb, többkomponenses módszereket alapul véve, mozgófázisnak pH 7-es foszfát puffert (50mM) és metanolt választottam [EKINCI, 2005; VINAS, 2003]. A mozgófázis kiválasztását követően felvettem az egyes vitaminok abszorbancia spektrumát. Az abszorbancia spektrumok alapján öt különböző hullámhosszat választottam a komponensek érzékenyebb, illetve szelektívebb detektálása érdekében. A B₁-, B₂-, B₃- és C-vitaminok maximális abszorbanciája 250 és 270 nm közé esik, így ezen vitaminok detektálására egy kompromisszumos hullámhosszat a 266 nm-t választottam, mely a C-vitamin elnyelési maximuma is egyben. A B₂-vitaminnak színes (sötét sárga) vegyület révén a látható hullámhossz tartományban is van jellemző elnyelése, így a B₂-vitamin szelektívebb meghatározásához a 448 nm-t is felvettem a detektálási hullámhosszak közé. A B₉-vitamin detektálásához a 282 nm-t, míg a B₆-vitaminhoz a 325 nm-t választottam. A pantoténsav (B₅) karakterisztikus kromofor csoport hiányában csak nagyon gyenge elnyeléssel rendelkezik a 200 nm körüli tartományban. Így UV detektálása nem szerencsés az oldószer, illetve az egyéb mátrix komponensek zavaró hatása miatt. A fentiekben leírt kromatográfiás körülmények között mégis lehetőség nyílik a 200 nm-en történő detektálására a foszfát puffer 200 nm alatti (195 nm) UV cut-off* hullámhossza révén.

* Egy mozgó fázis UV cut-off értékén azt a hullámhosszt értjük, ahol az oldószer abszorbanciája egységnyi. Illetve ahol az oldószer transzmittanciája nagyobb, mint 90% [FEKETE, 2003]

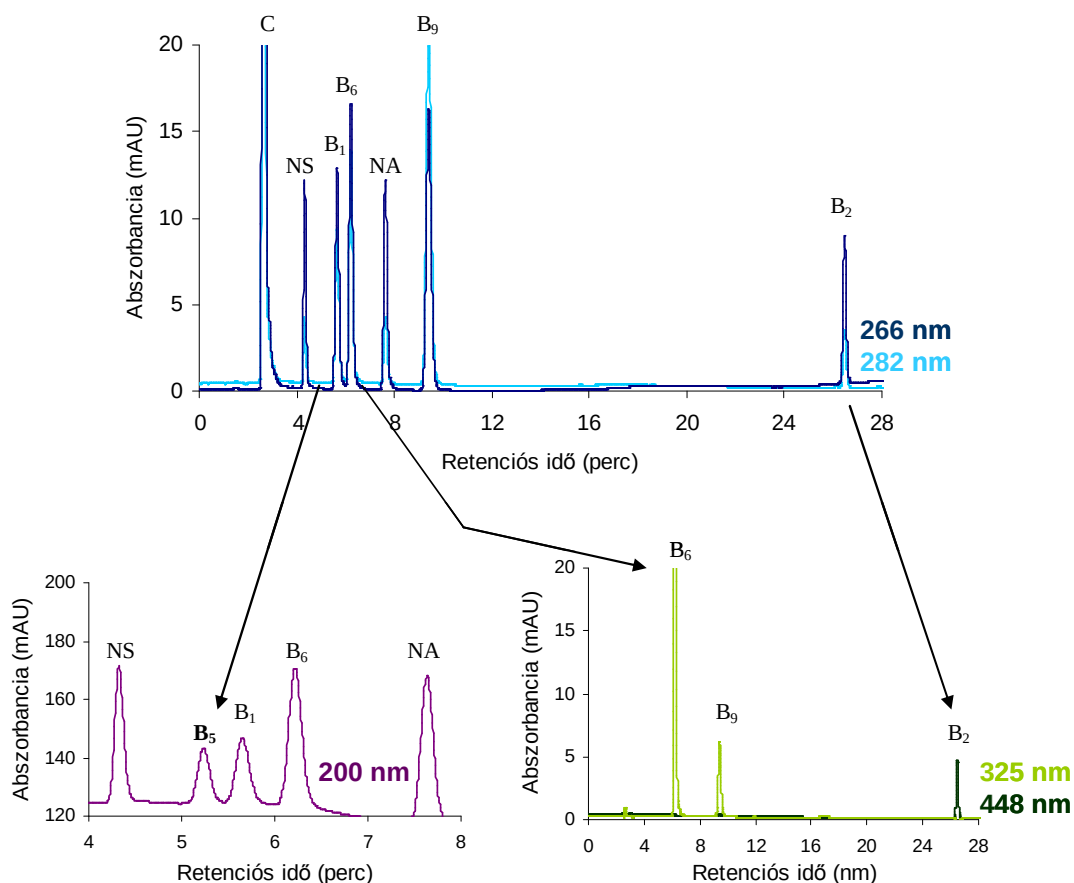
6.2.2.1 Elválasztás kidolgozása

Kezdetben Ekinci és Kadakal [2005] nyomán a vizsgált vegyületeket, egyszerűbb izokratikus módon próbáltam elválasztani egymástól, de ezt a komponensek sokfélesége nem tette lehetővé. Alacsonyabb metanol tartalom mellett (20%) az apolárisabb természetű riboflavin és folsav nagy retenciókkal és széles csúcsalakkal eluálódtak. Az eluens erősség növelésével a többi polárisabb komponens visszatartása csökkent, valamint romlott a felbontás. A nyolc komponens alapvonalig történő elválasztását számos variáció kipróbálása után végül egy négy lépcsős, 28 perc időtartamú gradiens elúciós program kidolgozásával valósítottam meg (**3. ábra**), 1000 µl/perc-es áramlási sebesség, és 20 µl injektálási térfogat mellett.



3. ábra Négy lépcsős gradiens elúciós program (áramlási sebesség: 1000µl/perc)

A vízben oldódó vitaminok kromatográfiájának kidolgozásakor a mozgófázis pH-ja kulcsfontosságú szerepet tölt be, ugyanis a pH jelentős mértékben befolyásolja az egyes komponensek állófázison való visszatartását. A fentiekben bemutatott gradiens elúcióhoz használt mozgófázis 7-es pH-ja a bázikusabb vegyületek, mint például a tiamin (B_1) visszatartásához kedvezőbb feltételeket biztosít, ugyanis a bázikus vegyületek a $pH=pK_a+2$ értéknél lúgosabb tartományban ionvisszaszorított formában vannak jelen. Így a tiamin, melynek pK_a értéke 4,8, a 7-es pH-jú közegben ionvisszaszorított formában van jelen. Ez a forma apolárisabb természetű, ezáltal nagyobb a visszatartása fordított fázisú analitikai oszlopon. A bázikus tiaminnal ellentétben az aszkorbinsav (C) gyenge sav révén, ugyanezen körülmények között polárisabb, ionos formában van jelen, melynek következtében kicsi a visszatartása. Így az aszkorbinsav a kolonna holt idejéhez közel, 2,6 percnél eluálódott (**4. ábra**).



4. ábra Vízben oldódó vitaminok standardoldatának különböző hullámhosszon felvett kromatogramjai (C 63,5 µg/ml; B₁, B₅, NS, NA 6,25 µg/ml; B₆ 12,5 µg/ml; B₉ 3,1 µg/ml; B₂ 1,8 µg/ml)

A **4. ábrán** a nyolc vizsgált komponens standardoldatának különböző hullámhosszokon felvett kromatogramjai láthatók. A **3. ábrán** bemutatott gradiens elúciós programmal a vizsgált vitaminok elúciós sorrendje a következő volt: C, NS, B₅, B₁, B₆, NA, B₉, B₂. A **4. ábrán** megfigyelhetjük az öt detektálási hullámhossz használatakor tapasztalt érzékenység-, valamint szelektivitásbeli különbségeket az egyes vitaminok esetében. A B₉- és B₆-vitaminoknak a B₁-, B₂-, B₃- és C-vitaminok detektálására választott 266 nm-en is van elnyelése, így ha a minta nagy mennyiségben tartalmazza ezeket a vitaminokat, akkor elegendő ennek az általános detektálási hullámhossznak a használata. Az élelmiszerek többsége azonban a folsavat (B₉) csak igen alacsony koncentrációban tartalmazzák, ezért a jobb kimutatási határ elérése érdekében a B₉-vitamin detektálása az abszorbancia maximumán, azaz 282 nm-en kedvezőbb. A B₆-vitamin esetében 325 nm hullámhosszon detektálva a nagyobb érzékenység mellett jobb szelektivitás érhető el. A B₂-vitamin detektálása sok esetben a 448 nm-en eredményesebb, a nagyobb

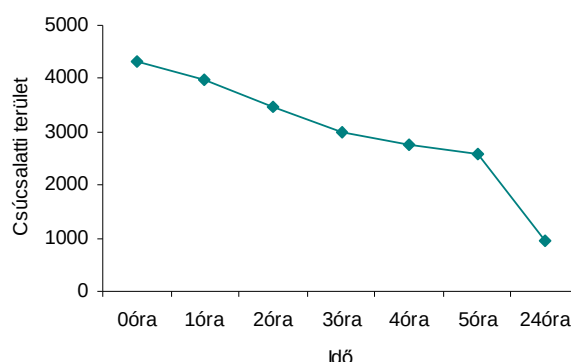
jelintenzitást mutató 266 nm-rel szemben. Ugyanis a 448 nm hullámhosszal nagyobb szelektivitás érhető el, mivel csak kevés komponensnek van ezen a hullámhosszon jelentős fényelnyelése. A B₅-vitamin detektálása egyedül 200 nm körüli hullámhosszon lehetséges, mint ahogy ezt a **4. ábra** is mutatja. A kidolgozott módszer megfelelő retenciós ablakok alkalmazásával akár változtatható hullámhosszúságú detektorral is megvalósítható.

Különböző koncentrációjú, mind a nyolc vitamint magába foglaló standardoldatok elkészítéskor a hígításokat az eluensként is használt pH 7-es foszfát pufferrel végeztem. Ezen oldatok mérésekor a töményebb oldatoknál a B₁- és a B₆-vitaminok koelúcióját tapasztaltam. További vizsgálatok elvégzését követően fény derült e jelenség okára, miszerint abban az esetben, ha a többkomponenses standardoldat tartalmazza a B₉-vitamin lúgos oldatát, a foszfát puffer veszít puffer kapacitásából és a megváltozott ionizációs viszonyok okozták a két komponens retenciós idejében bekövetkezett változást. Ez a jelenség kivédhető megfelelő arányú foszfát puffer alkalmazásával. Méréseket végeztem a standardoldat ideális foszfát puffer tartalmának meghatározására, mely eredményeként azt kaptam, hogy a retenciós idők csúszásának kiküszöböléséhez a standardoldat foszfát puffer koncentrációja nem lehet 10,25 mM-nál kisebb. A későbbiekben az oldatokat ennek figyelembevételével készítettem el.

6.2.3 Stabilitás vizsgálat

További kísérleteim a többkomponenses, illetve az egykomponenses standardoldatok stabilitásának vizsgálatára terjedtek ki. A mind a nyolc vitamint tartalmazó foszfát pufferes (pH7) standardoldatot óránként újra mértem öt alkalommal, valamint huszonnégy óra elteltével. A törzsoldatokból egy nap elteltével új többkomponenses oldatot készítettem és mértem meg. A C-vitamin kivételével a vizsgált vitaminok huszonnégy óra elteltével is stabilak maradtak, mind a többkomponenses, mind a törzsoldatokban, tehát az egyes alkalommal mért csúcs alatti területeik között nem volt szignifikáns különbség. Azonban a C-vitaminról nem mondható el ugyanez. A többkomponenses oldatnál már a nap folyamán egy-egy óra elteltével is a C-vitamin jelentős bomlása volt megfigyelhető, öt óra elteltével 40%-al, míg huszonnégy óra alatt 80%-al csökkent a csúcs alatti terület (**5. ábra**). A törzsoldat aszkorbinsavtartalma 35%-al csökkent huszonnégy óra leforgása alatt.

A C-vitamin rohamos bomlását ideiglenesen a standardoldatok elkészítést követő azonnali mérésével kerültem ki. A szakirodalomban is találhatunk utalást a C-vitamin instabilitása okozta nehézségekről a C-vitamint is magába foglaló többkomponenses módszerek esetén [HEUDI, 2005]. Azonban konkrét megoldást egyik publikáció sem kínál fel.



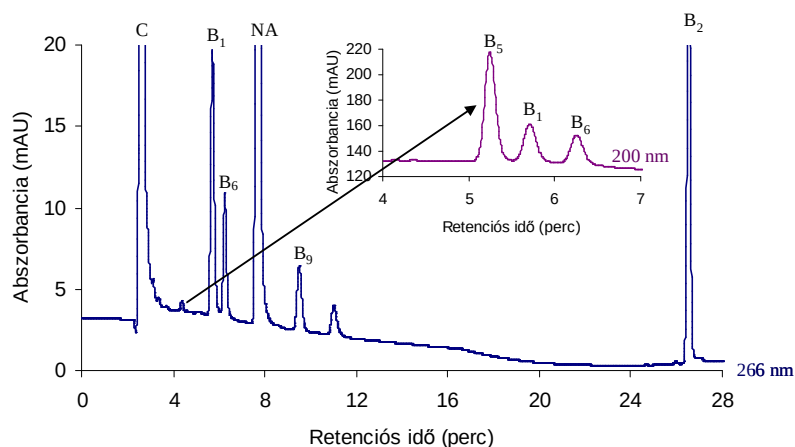
5. ábra C-vitamin 24 óra alatt bekövetkező bomlása a többkomponenses foszfát puffer (pH7) standardoldatban

6.2.4 A módszer alkalmazása élelmiszermintán

A kidolgozott módszert egy vitaminokkal és ásványi anyagokkal dúsított gabonapelyhen próbáltam ki. A mintaelőkészítést az „Anyag és módszer” fejezetben szemléltetett savas extrakció alapján végeztem el. A fentiekben leírt módszer azonban, az adott kromatográfiás körülmények között összetettebb mátrix esetén nem tette lehetővé a vizsgált vitaminok mátrixkomponensektől való elválasztását, illetve a komponensek többségének detektálásához használt 266 nm nem biztosít elegendő szelektivitást.

6.2.5 A módszer alkalmazása étrend-kiegészítőn

Habár a módszer komplex élelmiszerminták vizsgálatát nem teszi lehetővé, egyszerűbb mátrixok rutin vizsgálatához, gyors, olcsó megoldást biztosít. Egyszerűbb mátrixként egy multivitamin tablettát választottam, melynek a kromatogramja a **6. ábrán** látható. A vitaminkészítmények a dúsított élelmiszereknél jóval magasabb koncentrációban tartalmazzák az egyes vitamin komponenseket, ebből kifolyólag a 266 nm általános hullámhosszként a pantoténsav kivételével megfelelő érzékenységet biztosít a vizsgált vitaminok méréséhez. Így a vitamin készítmények méréséhez elegendő két hullámhossz a 266 és a 200 nm használata. A vizsgált vitamintabletta a 8 komponensből csak hetet tartalmazott, mert a B₃-vitamin nikotinamid formájában volt jelen a készítményben.



6. ábra Multivitamin tabletta kromatogramjai 266 és 200 nm detektálási hullámhosszokon

Doktori munkámat a továbbiakban, a fentiekben tárgyalásra került kísérlet sorozat során felmerülő analitikai problémák megoldásával folytattam, melyek összefoglalva a következők:

- 1) Standardoldatok készítése során felmerült problémák:
 - a) A riboflavin és a folsav feloldásának nehézsége.
 - b) A C-vitamin bomlása a törzsoldatban, illetve a többkomponenses oldatban.
- 2) A kidolgozott kromatográfia gyenge pontjai:
 - a) A C-vitamin rossz visszatartása
 - b) A mátrix komponensek és a vizsgált vitaminok koelúciója
 - c) A szerves pH 7-es foszfát puffer hátrányai:
 - i) A szerves só a szerves oldószer hatására kicsapódhat, mely egyrészt a rendszer eltömődését (szelepek, kapilláris csövek) okozhatja, másrészt a kolonnán kirakódva ronthatja a visszatartást és a felbontást.
 - ii) A 7-es pH kedvezőtlen a mikrobiológiai stabilitás szempontjából.
- 3) Az alkalmazott mintaelőkészítés nem biztosítja a B- és C-vitaminok együttes meghatározását:
 - a) C-vitamin bomlása
 - b) A mátrixkomponensek okozta interferencia az elválasztás során.

6.3 Vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása ionpárképző használatával RP-IP-HPLC-(UV-VIS) rendszerrel

Az előző fejezetben bemutatásra került RP-HPLC módszer a C-vitaminra gyakorolt gyenge visszatartása következtében nem tette lehetővé a C- és B-vitaminok egyidejű meghatározását. Ebből kitűnik, hogy a vízben oldódó vitaminok együttes meghatározásának kritikus pontját a C-vitamin jelenti. A C-vitamin B-vitaminokkal történő együttes meghatározásának korlátai két problémakörből erednek. Az egyik problémakör a C-vitamin nagyfokú instabilitásából eredő gondokat, míg a másik a kromatográfiás elválasztásának nehézségeit öleli fel. A két terület közül először a C-vitamin instabilitásából eredő problémák feltárását mutatom be.

6.3.1 A C-vitamin stabilitásának problémái

Az aszkorbinsav szerkezeti felépítéséből adódóan a leginstabilabb vízben oldódó vitamin. Ezt az egyes vitaminok stabilitásának vizsgálatára irányuló kísérletem eredményei is alátámasztják (5. ábra). A törzs- és többkomponenses standardoldatokban egyedül a C-vitamin koncentráció csökkenése volt számottevő. Az aszkorbinsav bomlását vizes közegben számos környezeti tényező előidézheti, mint például annak magas pH-ja, a megnövekedett hőmérséklet, a fény, valamint oxidáló ágensek jelenléte [NOVAKOVA, 2008]. Ezen tényezők kizárásával, mérséklésével lassítható az aszkorbinsav bomlási folyamata.

Az aszkorbinsav törzsoldatát az eddigiekben Cho [2000] nyomán 1mM töménységű sósavoldat felhasználásával készítettem, míg a többkomponenses standardoldatok hígításához az eluensként is alkalmazott foszfát puffert használtam. Ezt követően, az oldatokat a fény és a hőmérséklet degradációs hatásának kizárása érdekében 4 °C-on fénytől elzárva tároltam.

Az aszkorbinsav bomlása a többkomponenses standardoldatban volt a legnagyobb mértékű, mely a foszfát puffer (pH 7) használata által bekövetkező pH emelkedéssel hozható összefüggésbe.

Azonban, a C-vitamin stabilitásának fenntartásához szükséges tényezők (alacsony pH, alacsony hőmérséklet, fény kizárás) fennállása ellenére az aszkorbinsav bomlása a törzsoldatban is megfigyelhető volt.

A felmerült stabilitási problémák kivédésére, a C-vitamin meghatározására fókuszáló tanulmányokat alapul véve [FONTANNAZ, 2006; HIDIROGLOU, 1998; KABASAKALIS,

2000; RIZZOLO, 2002] a továbbiakban mind az aszkorbinsav törzsoldat, mind a többkomponenses standardoldatok elkészítéséhez a stabilizátorként is funkcionáló metafoszforsavat (HPO_3) alkalmaztam, az „Anyag és módszer” fejezetben feltüntetett módon. A metafoszforsav mellett, hogy megvédi az aszkorbinsavat az oxidációtól, megfelelő stabilitási viszonyokat teremt a B-vitaminok számára is.

6.3.2 A C- és B-vitaminok együttes kromatográfiás meghatározásának problémái

A C-vitamin meghatározásának legyszerencsebb módja az ionkizárásos kromatográfia lenne, erős kationcserélő kolonna alkalmazásával. Azonban kationcserélő kolonna használata nem tenné lehetővé a savas és a bázikus tulajdonságú vitaminok együttes meghatározását. A legideálisabb körülményeket fordított fázisú állófázissal lehet biztosítani polaritásukban és bázicitásukban ilyen nagymértékben különböző vegyületek együttes meghatározásához. Ebből kifolyólag a korábbiakban alkalmazott állófázist (Waters XTerra C_{18} 4,6 mm x 250 mm, 5 μm) megtartva, a mozgófázis változtatásával próbáltam a C-vitamin visszatartásán javítani.

Az aszkorbinsav megfelelő visszatartása fordított fázisú analitikai oszlopon semleges formájának fenntartásával érhető el. Kettő körüli pH értékű mozgófázis alkalmazásával ez a feltétel teljesíthető, mivel az aszkorbinsav $\text{pK}_a(4,2) - 2$ értékénél savasabb közegben apolárisabb ionvisszaszorított állapotban van jelen. A mozgófázis pH értékének csökkentése azonban a bázikus vegyületek visszatartásának romlását vonja maga után, mivel savas közegben a bázikus vegyületek a polárisabb ionos formájukban vannak jelen.

A fentiek alapján a C- és B-vitaminok megfelelő elválasztása, illetve visszatartása céljából a foszfát puffert trifluor-ecetsav (TFA) tartalmú mozgófázisra cseréltem fel. A TFA részlegesen ionizálódó erős savként kitűnő pH stabilizátor, így a pH alacsonyan tartásával biztosítja a savas tulajdonságú komponensek, valamint az állófázis fennmaradó szilanol csoportjai ionvisszaszorított állapotának fenntartását, elősegítve ezzel visszatartásukat.

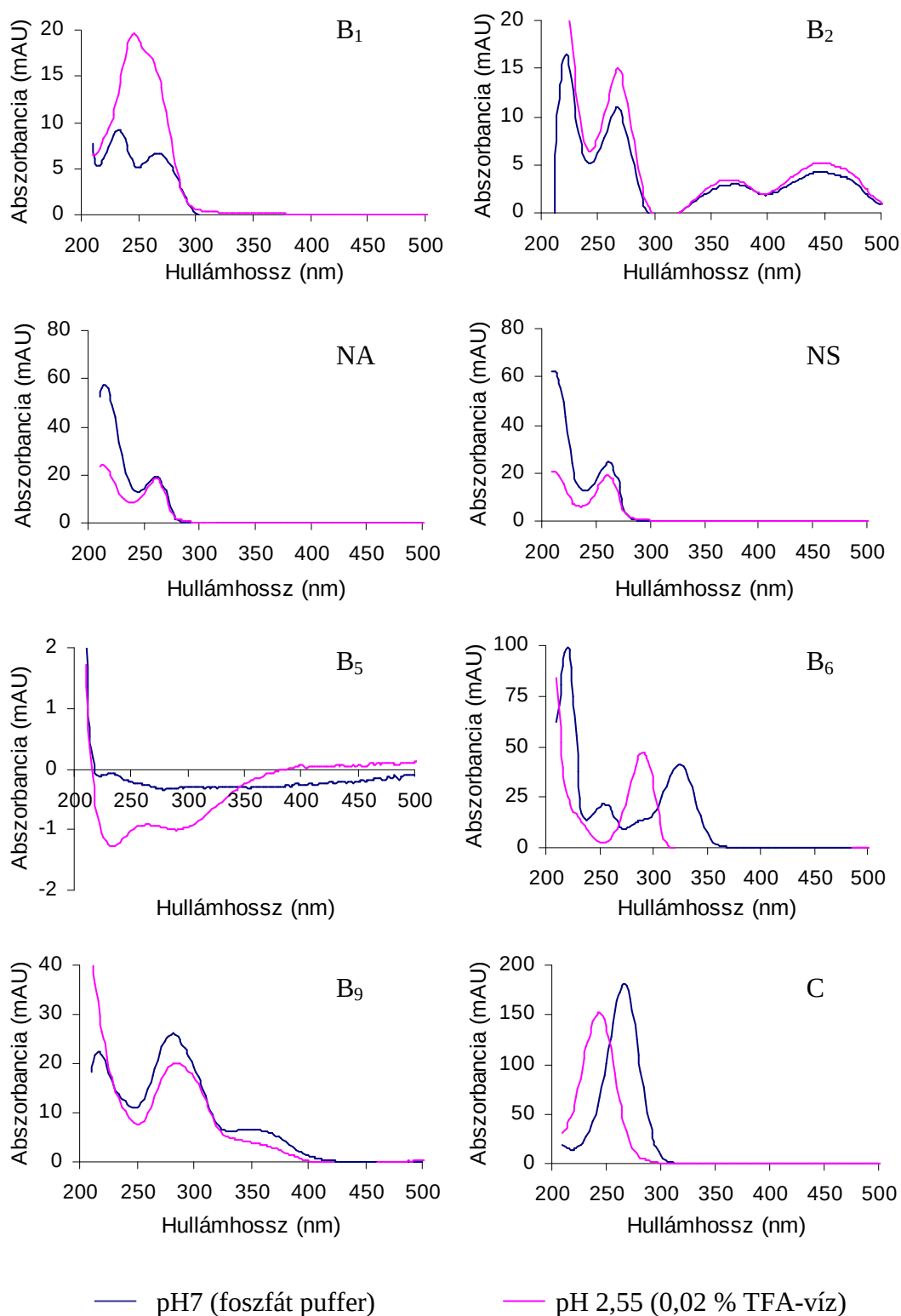
Ezen felül a TFA ionpárképzőként hatással van a bázikus komponensek visszatartására is. A pozitív töltésű bázikus vitaminok a TFA karboxil csoportjával kölcsönhatásba lépve apolárisabb karakterű ion-asszociátumot képeznek a mozgófázisban, és ily módon már megkötődnek az állófázison.

Továbbá a TFA az állófázis felületének megváltoztatásával is javítja az elválasztást. Tehát a TFA pH stabilizátor és ionpárképző tulajdonságából adódóan lehetőséget nyújt az eltérő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező vízben oldódó vitaminok meghatározására.

A TFA a vizsgált komponensek retenciójára gyakorolt pozitív hatásán kívül számos más előnnyel rendelkezik az eddig használt foszfát pufferrel szemben. Használatával az alacsony pH biztosításának köszönhetően a mozgófázis mikrobiológiai stabilitása fenntartható, illetve elkerülhetők a szervesetlen só kiválása okozta problémák. Amíg a foszfát puffer nagymértékben csökkent a kolonna élettartamát, addig a TFA okozta állófázis erózió elhanyagolható.

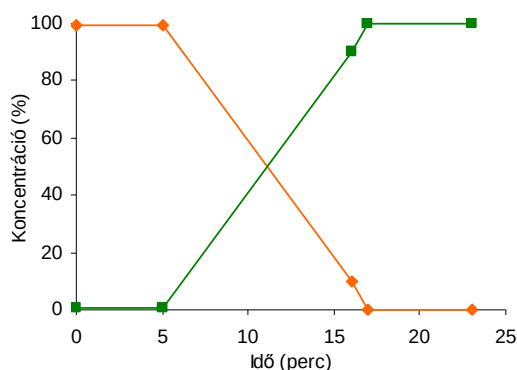
A fordított fázisú ionpár kromatográfiában a hőmérsékletváltozás befolyásolja az egyensúlyi folyamatokat, a felületi töltéssűrűséget, ezért az állandó visszatartás és szelektivitás biztosítása érdekében, oszloptermosztát segítségével az álló és a mozgófázis hőmérsékletét 30°C-ra állítottam be.

A mozgófázis cseréje a vizsgált vitaminok abszorbancia spektrumának újrafelvételét tette szükségessé, mivel az egyes komponensek fényelnyelési maximuma a pH függvényében változik. A különböző pH értékek hatását az egyes vitaminok abszorbanciájára a **7. ábra** szemlélteti. A komponensek fényelnyelési maximumának eltolódása ellenére nem került sor jelentős változtatás az eddig alkalmazott detektálási hullámhossz összeállításban. A C-, B₁-, B₂-, B₃-vitaminok fényelnyelési maximuma változatlanul a 250-270 nm közötti tartományba esett, így detektálásukat továbbra is a 266 nm-en végeztem. A B₂-vitamin szelektívebb meghatározását biztosító 448 nm is az összeállítás része maradt. A B₆-vitamin abszorbancia spektrumának jelentős változása következtében az eddig alkalmazott 325 nm helyett az új abszorbancia maximumához közeli 285 nm-t választottam, mely egyben a B₉-vitamin fényelnyelési maximuma is. A TFA foszfát pufferhez képesti magasabb UV cut-off értéke (210 nm) nem teszi lehetővé a B₅-vitamin 200 nm körüli hullámhosszon történő meghatározását. Így a továbbiakban a vizsgálandó komponens készletet hét komponens a C-, B₁-, B₂-, NS, NA B₆-, és a B₉-vitaminok alkotják, melyek detektálására a 266, a 285 és a 448 nm hullámhosszokat választottam.



7. ábra Vízben oldódó vitaminok abszorbanca spektruma két különböző pH-jú közegben (pH 7 foszfát pufferben és pH 2,55 0,02 v/v% TFA tartalmú vizes oldatban)

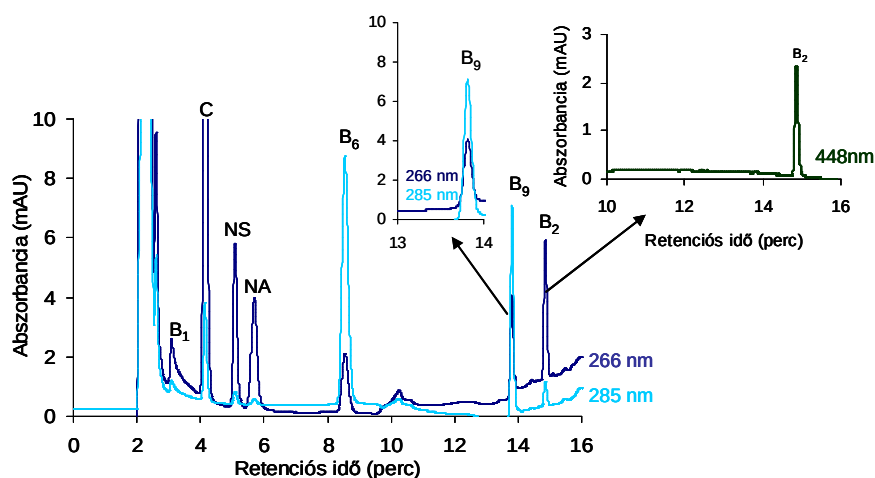
A detektálási hullámhosszak kiválasztását követően a vizsgált molekulák elválasztását lehetővé tevő gradiens elúciós programot dolgoztam ki, mely során a két mozgófázis víz (A) és metanol/víz 90/10 arányú elegye (B) volt. Mindkét mozgófázis 0,02 v/v % TFA-t tartalmazott, mely az A mozgófázis 2,5 pH értékét biztosította. A kezdeti eluens összetétel 0,5%-ban tartalmazta a B mozgófázist. A 23 perces gradiens elúciós program során a B eluens elérte a 100 %-ot. A kromatográfia végére egy 10 perces regenerációs szakaszt építettem be (**8. ábra**).



8. ábra Gradiens elúciós program (A: 0,02 v/v% TFA víz, B: 0,02 v/v% TFA metanol/víz 90/10 arányú elegye, áramlási sebesség:1000 µl/perc)

A gradiens program 1000 µl/perc áramlási sebesség mellett 16 perc alatt biztosította a komponensek elválasztását. Az injektálási térfogat 20 µl volt. A **9. ábrán** a többkomponenses standardoldat három hullámhosszon felvett kromatogramjai láthatók.

A vizsgált komponensek elúciós sorrendje a következő: B₁-, C-, NS, NA, B₆-, B₉-, B₂-vitaminok.



9. ábra Vízben oldódó vitaminok standardoldatának különböző hullámhosszon felvett kromatogramjai (C 10 µg/ml; B₁, NS, NA 1 µg/ml; B₆ 2 µg/ml; B₉ 0,5 µg/ml; B₂ 0,3 µg/ml)

A savas pH a vártaknak megfelelően megnövelte a C-vitamin visszatartását és így 4,1 perces retenciós idejével elválik a holtterfogatall eluálódó oldószer csúcsától. A B₁-vitamin azonban az ionpárhépző használata ellenére holtidőhöz közeli retenciós idővel eluálódott, melynek következtében nem vált el teljes mértékben az oldószer csúcsától, valamint a nem megfelelő retenció mellett, a kiszélesedő csúcsalakja is problémát jelentett. Elkenődött csúcsalakja (peak tailing), a pozitív töltésű aminocsoportja és az állófázis felületén szabadon maradt, nem semlegesített, negatív szilanol csoportok között fellépő ioncserés kölcsönhatások következtében kialakult másodlagos retenció eredménye. Ebből kifolyólag a B₁-vitamin mennyiségi meghatározása az adott kromatográfiás körülmények között nem lehetséges. A **9. ábrán** látható, hogy a 285 nm detektálási hullámhosszon a B₆- és a B₉-vitamin nagyobb jelintenzitást, míg a 448 nm-en a B₂-vitamin jobb szelektivitást mutat a 266 nm-hez képest.

6.3.3 A kidolgozott RP-IP-HPLC módszer alkalmazása élelmiszermintákon

A kromatográfia kidolgozását követően, a módszert élelmiszerminták mérésére alkalmaztam.

6.3.3.1 Mintaelőkészítés

A C-vitamin gyors bomlása a standardoldatokon kívül a mintaelőkészítés során is komoly problémát jelent. Ebből kifolyólag a minták C-vitamin-tartalmának megőrzése céljából az élelmiszerek C-vitamin-tartalmának meghatározására kidolgozott Európai Szabvány [EN 14130:2003] által előírt mintaelőkészítést vettem alapul, és terjesztettem ki a B-vitaminok csoportjának meghatározására. Erre azért nyílt lehetőség, mert a dúsított élelmiszerek hozzáadott vitamintartalma nem kötődik szorosan a mátrixkomponensekhez, ebből kifolyólag a B-vitaminok összetett, savas hidrolízisből és enzimikus feltárásból álló mintaelőkészítése felváltható egy egyszerűbb extrakcióval. További kísérleteim során ezen mintaelőkészítés alkalmasságát vizsgáltam dúsított élelmiszerek C- és B-vitamin-tartalmának együttes meghatározására. Az Európai Szabványban [EN 14130:2003] leírt mintaelőkészítés két fő lépésből, egy extrakciós és egy redukciós lépésből áll. Az extrakció az L(+)- aszkorbinsav oxidációjának megelőzése érdekében a standardoldatokhoz is használt metafoszforsav (2 m/v%) oldattal történik. A redukciós lépés L-cisztein, mint redukáló ágens felhasználásával az L-dehidro-aszkorbinsav redukálódását biztosítja, mely lehetővé teszi a C-vitamin aszkorbinsav formában történő

meghatározását. A mintaelőkészítés menetének részletes leírása az „Anyag és módszer” fejezetben tekinthető meg.

6.3.3.2 Élelmiszerminták mérése

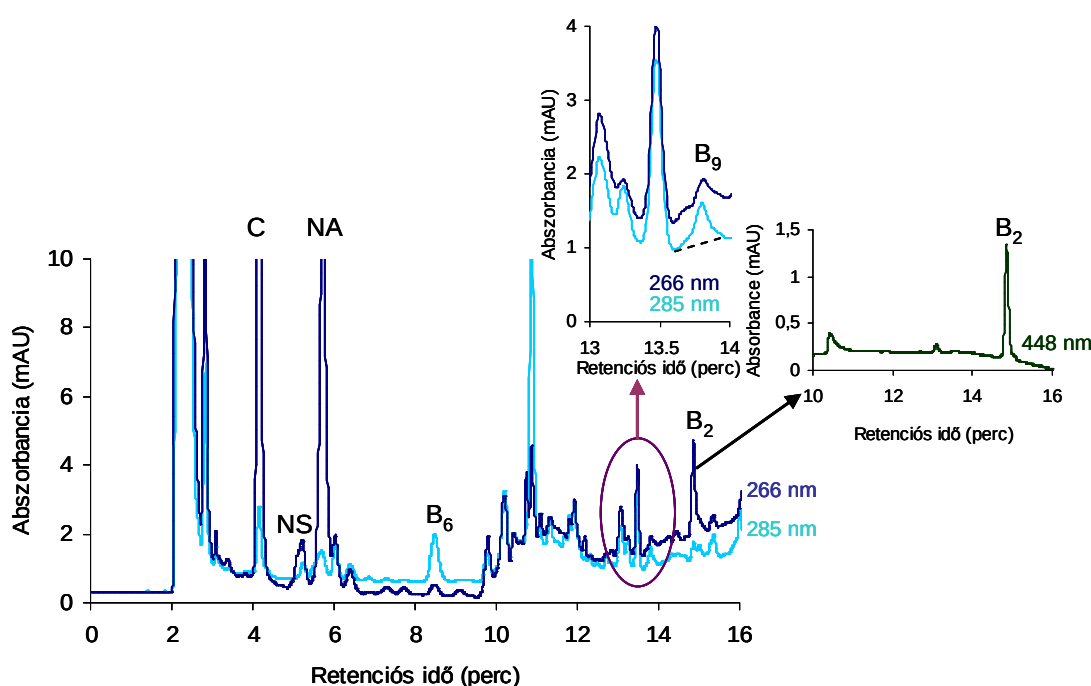
Az előbbieken bemutatott mintaelőkészítést, valamint a kidolgozott kromatográfiás módszert három kereskedelmi forgalomban lévő, vitaminokkal dúsított élelmiszerterméken alkalmaztam. Egy reggeli gabonapehely, egy gyümölcsle, valamint egy instant kakaópor C-, B₂-, B₃-, B₆-, és B₉-vitamin-tartalmát határoztam meg. Azért esett ezekre a mátrixokra a választásom, mert ezek az élelmiszer típusok alkotják a dúsított élelmiszerek gerincét.

A komponensek minőségi azonosítását retenciós idejük alapján végeztem, melyet standard addíciós módszerrel is megerősítettem. További minőségbiztosítási eszközként a vizsgált komponensek csúcstisztaságát a diódasoros detektor nyújtotta lehetőségek kihasználásával ellenőriztem. A diódasoros detektor lehetővé teszi a kromatográfiás futás teljes ideje alatti UV-VIS spektrum felvételt. Így az idő (t), abszorbancia (A) és hullámhossz (λ) adathármasból megjeleníthető a kromatogram háromdimenziós képe, melyből megbecsülhetők az „elbújó” csúcsok előfordulása (**II. melléklet**). Az on-line spektrumfelvétel az alapja a kiértékelő szoftver automatikus csúcstisztaság vizsgálatának is, mely az eluálódó csúcs három vagy több pontjában felvett spektrumait veti össze, amit egy matematikai összefüggés alapján számszerűsítve a hasonlósági faktorral jelöl. A hasonlósági faktor értéke 0 és 1000 közé eshet a hasonlóság mértékétől függően. A kérdéses kromatográfiás csúcs tisztasága megfelelő, ha a hasonlósági faktor 995-nél nagyobb [STAHL, 2003].

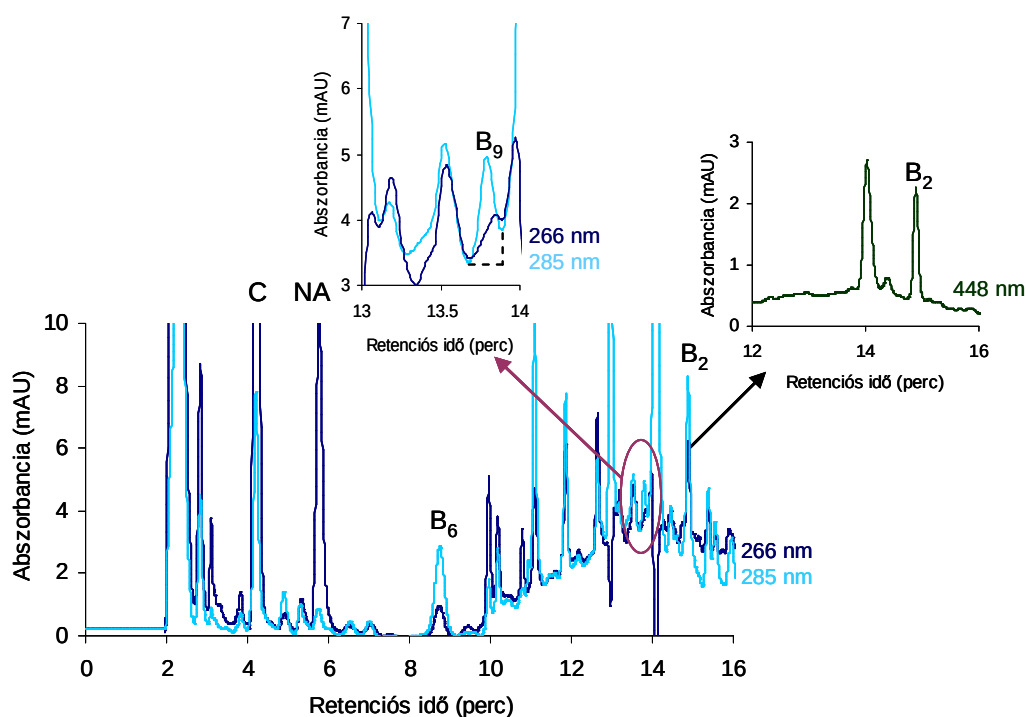
Az előbbieken leírt kromatográfiás körülmények megfelelő feltételeket biztosítottak mind a három élelmiszer mátrixnál a dúsításhoz legelterjedtebb használt vitaminformák, úgymint az aszkorbinsav (C), a riboflavin (B₂), a nikotinamid (NA), a piridoxin (B₆) és a folsav (B₉) esetében (**10-12. ábra**).

A reggeli gabonapehely mintában (**10. ábra**) mind a hat vizsgált komponens megtalálható volt. Az instant kakaópor nem tartalmazott B₂-vitamint (**11. ábra**). A gyümölcsleben a dúsításhoz használt vitaminformák voltak jelen (**12. ábra**). A reggeli gabonapehelyben és az instant kakaóporban a B₃-vitamin dúsításhoz gyakrabban használt formája a nikotinamid mellett a nikotinsav is kimutatható volt. A nyomokban jelenlévő nikotinsav származhat egyrészt a nikotinamid tárolás során bekövetkező átalakulásából, valamint felszabadulhatott a termékek

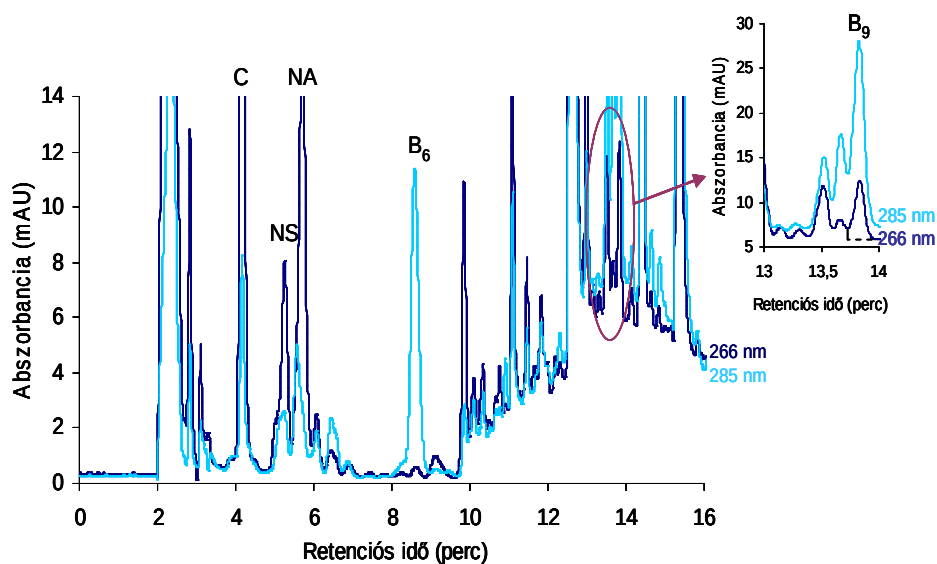
természetes nikotinsav készletéből. A nikotinsav (NS) megfelelő elválasztása a mátrix egyéb alkotóelemeitől nem volt megoldható. Mindkét mintánál egy mátrixkomponenssel együtt eluálódott, mely a kimutatási határ romlását okozhatja. A 266 nm a C-, a B₆-vitamin és a nikotinamid meghatározásához megfelelő szelektivitást és érzékenységet biztosított mindhárom mintánál. A B₂-vitamin vizsgálatához a 266 nm-hez képest kisebb intenzitású 448 nm bizonyult hatékonyabbnak nagyfokú szelektivitásának köszönhetően. A B₉-vitamin detektálásához választott 285 nm csak a gabonapehely és a gyümölcslé esetében nyújtott kielégítő szelektivitást. Az instant kakaó vizsgálatokor a 266 nm kisebb érzékenységet, de jobb szelektivitást mutatott. Ebből kifolyólag a továbbiakban a kakaó B₉-vitamin-tartalmának meghatározását a 285 nm helyett a 266 nm-en végeztem.



10. ábra Reggeli gabonapehely kromatogramjai 266, 285 és 448 nm detektálási hullámhosszokon



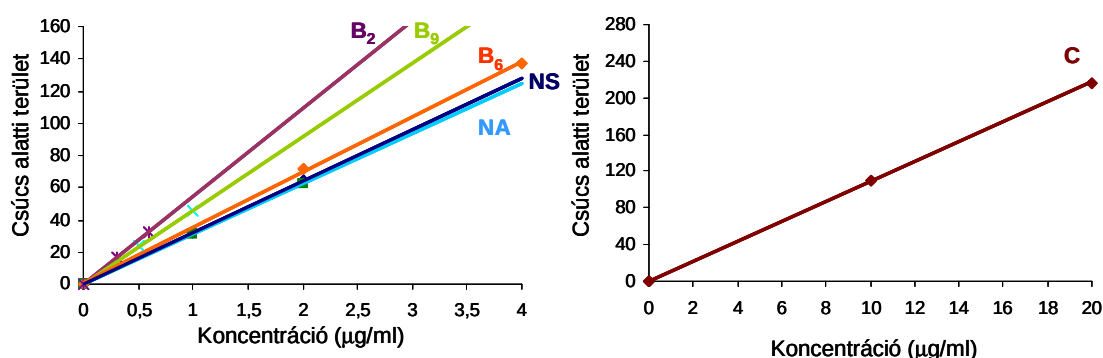
11. ábra Gyümölcslé kromatogramjai 266, 285 és 448 nm detektálási hullámhosszokon



12. ábra Instant kakaópor kromatogramjai 266 és 285 nm detektálási hullámhosszokon

A komponensek mennyiségi meghatározása céljából kétféle kalibrációs technikát alkalmaztam és hasonlítottam össze. A minták hozzáadott vitamintartalmát külső és mátrixhoz illesztett (standard addíció) kalibrációs egyenesek segítségével is meghatároztam.

A kalibrációs egyenesek pontjait az analitikai mintákban várható koncentrációk alapján állapítottam meg. A három pontból álló külső kalibrációs egyenesek, ezek alapján a következő koncentráció tartományokat fedték le az egyes vitaminok esetében: B₂: [0-0,6 µg/ml]; NS, NA: [0-2 µg/ml], B₆ [0-1 µg/ml], B₉[0-1 µg/ml], C [0-20 µg/ml]. A **13. ábrán** a B- és a C-vitaminok kalibrációs egyenesei láthatók. A jobb átláthatóság érdekében a C-vitamin kalibrációs egyenesét az eltérő skálabeosztás miatt külön koordináta rendszerben ábrázoltam. Mind a hat vegyület esetében a vizsgált koncentráció tartományban a koncentráció és a csúcs alatti terület összefüggés lineáris volt ($R^2 > 0,999$).



13. ábra Vízben oldódó vitaminok kalibrációs egyenesei

(266nm: NS, NA, C, 285 nm: B₆, B₉, 448nm: B₂)

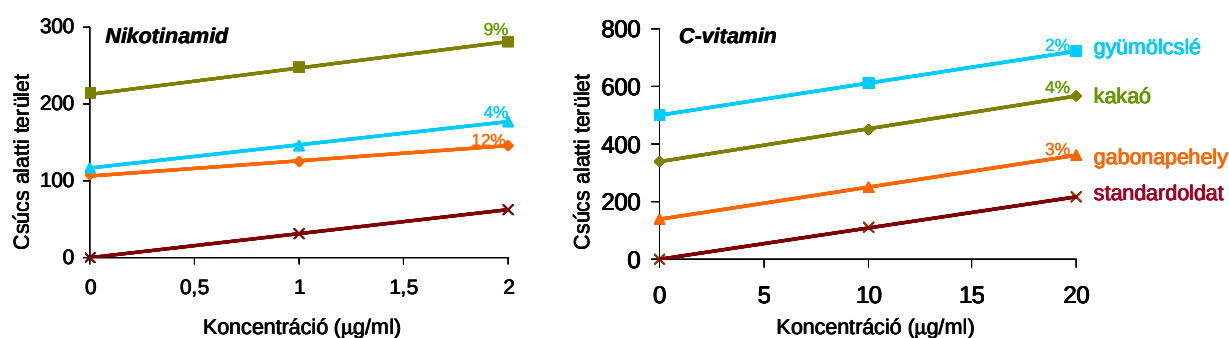
A komponensek mennyiségi meghatározása során figyelembe kell venni a különböző mátrixok esetleges zavaró hatását, mivel ha a mátrix valamilyen irányú torzító hatása érvényesül az egyes komponensek esetében, a külső kalibrációs technika használatával hibát követünk el a mennyiségi meghatározás során. A mátrix zavaró hatásának kiszűrése és kiküszöbölése érdekében standard addíciós kalibrációs technikát alkalmaztam. A mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenesek szintjei megegyeztek a külső kalibrációs egyenes pontjaival. A nullás pontnak a mintakivonatok saját vitamintartalma felelt meg. A kivonatokhoz a standardoldatokat oly módon adtam hozzá, hogy a külső kalibrációnak megfelelő koncentráció szinteket érjem el, melyek a következők: B₂: (0,3 µg/ml, 0,6 µg/ml); NS, NA: (1 µg/ml, 2 µg/ml), B₆ (2 µg/ml, 4 µg/ml), B₉ (0,5 µg/ml, 1 µg/ml), C (10 µg/ml, 20 µg/ml). Az ily módon nyert kalibrációs egyenesek szintén lineárisak voltak ($R^2 < 0,995$).

Abban az esetben, ha nem lép fel mátrixhatás, akkor a mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenesek meredekségei megegyeznek a külső kalibrációs egyenesek meredekségeivel. A mátrix okozta zavaróhatást elhanyagolhatónak vettem, ha a két kalibrációs egyenes meredeksége közötti

különbség 20% alatt maradt. Ebben az esetben a mennyiségi meghatározáshoz használható a külső kalibrációs technika.

A **9. táblázat** tartalmazza a két kalibrációs technikával nyert kalibrációs egyenesek meredekségeit, a meredekségek közti eltérést százalékban kifejezve, valamint a minták mindkét kalibrációs technikával számított vitamintartalmát. A két kalibrációs egyenes meredeksége közötti eltérés minden esetben 20 % alatt maradt. A külső kalibrációs egyenes meredekségéhez képesti legnagyobb eltérést (12%) a nikotinamid gabonapehely mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenesénél tapasztaltam. Ez a meredekségek közötti 12%-os eltérés a minta számított vitamintartalmában 14 %-os eltérést eredményezett. A **14. ábra** a C-vitamin és a nikotinamid példáján bemutatva grafikus módon szemlélteti a három mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenesek külső kalibrációhoz viszonyított eltérését.

Az eredmények alapján tehát elmondható, hogy a három mátrix (gyümölcslé, kakaó, gabonapehely) zavaró hatása a vizsgált komponensek esetében elhanyagolhatónak tekinthető, mely lehetővé teszi a külső kalibrációs technika alkalmazását.



14. ábra A nikotinamid és a C-vitamin külső (standardoldat) kalibrációs egyenesei, valamint a három különböző mátrixhoz illesztett (gyümölcslé, kakaópor, gabonapehely) kalibrációs egyenesaik a külső kalibrációs egyenes meredekségéhez képesti százalékos eltérések értékeinek feltüntetésével

A továbbiakban a C-vitamin stabilitásának megőrzése érdekében alkalmazott mintaelőkészítés alkalmasságát vizsgáltam a dúsított-élelmiszerek C-, és B-vitamin együttes meghatározására. Ennek érdekében először a mintaelőkészítés során bekövetkező vitaminvesztés mértékét határoztam meg, melynek céljából **vi sszanyerési kísérleteket** végeztem, az alábbi módon.

A metafoszforsavas extrakciót megelőzően a bemért gabonapehely, gyümölcslé, valamint instant kakaópor mintákhoz ismert koncentrációjú standard törzsoldatokat adtam. A törzsoldatok

elkészítésénél arra törekedtem, hogy a metafoszforsavtól eltérő oldószerek aránya a lehető legkisebb legyen. Ennek függvényében a kalibrációhoz használt törzsoldatoktól eltérően három törzsoldatot készítettem. A B₂-vitamin vizes (50 µg/ml), valamint a B₉-vitamin (30 µg/ml) nátriumhidroxidos oldata megegyezett a kalibrációhoz használtakkal. Az eddigiektől eltérő módon a C-, NA, NS, B₆-vitaminokból többkomponenses metafoszforsavas (2 m/m%) standard törzsoldatot készítettem, melyben a C-vitamin 1000 µg/ml, a NS és a NA 100 µg/ml, a B₆-vitamin 200 µg/ml koncentrációban volt jelen. Azért döntöttem e vitaminok közös standard törzsoldatának elkészítése mellett, hogy ezzel is csökkentsem az extrakcióhoz használt metafoszforsav (2 m/m%) koncentráció változásának mértékét.

Ezt követően a mintákhoz 500-500 µl-t adtam a három standard törzsoldatból. Ezt a térfogatot úgy állapítottam meg, hogy a mintaelőkészítés során fellépő hígulásokkal számolva az injektálásra kerülő minta általam hozzáadott vitaminkoncentrációja a kalibrációs egyenes első pontjával egyezzen (B₂: 0,3 µg/ml, NS, NA: 1 µg/ml, B₆ 2 µg/ml, B₉:0,5 µg/ml, C:10 µg/ml).

A standardoldatok mintához adását követően az „Anyag és módszer” fejezetben leírtak alapján elvégeztem a mintaelőkészítést. Ahhoz, hogy a mintaelőkészítés során fellépő veszteségeket meg tudjam állapítani, kontrol, azaz standardoldatok hozzáadása nélküli mintakivonatokat elkészítésére is szükség volt. A kontrol mintákhoz a metafoszforsavas extrakciót megelőzően 500-500 µl nátrium hidroxidot (0,1 M) és vizet adtam. Erre azért volt szükség, hogy a kontrol minták oldószer összetétele megegyezzen a standardoldatokat tartalmazó mintákéval, ezzel biztosítva az összehasonlítás pontosságát.

A minták vitamintartalmát a külső kalibrációs egyenesek segítségével határoztam meg. Ezt követően a **2. egyenletbe** behelyettesítve kiszámoltam a visszanyerés mértékét százalékban kifejezve, melyeket a **9. táblázatban** tüntettem fel.

2. egyenlet

$$\text{Visszanyerés (\%)} = \frac{C(\text{minta+standard}) - C(\text{kontrol minta})}{C(\text{standard})} \times 100$$

C (minta+standard): Standardoldatokat tartalmazó minta vitamintartalma (mg/100g)

C (kontrol minta): Kontrol minta vitamintartalma (mg/100g)

C (standard): A mintákhoz adott vitaminmennyiség (mg) 100g mintára kifejezve

A három mátrixnál az egyes komponensek visszanyerési százaléka, a nikotinamid kivételével 96 és 109 % közé esett. A visszanyerés értéke egyedül a nikotinamidnál volt 96 %

alatti. A nikotinamid gabonapehelyhez adott mennyiségének 88%-át nyertem vissza, mely az előzőekben már említésre kerül mátrixhatással magyarázható. Mivel a mintaelőkészítés lépései során fellépő veszteség minden vitamin esetében 20 % alatt maradt, úgy ítéltm, hogy az eredetileg C-vitaminra kidolgozott mintaelőkészítés kiterjeszthető dúsított élelmiszerek esetén a B-vitaminok csoportjának mérésére.

A gabonapehely, a gyümölcsle és az instant kakaópor általam meghatározott vitamintartalma, néhány kivételtől eltekintve összhangban van a csomagolásukon feltüntetett értékekkel (**9. táblázat**). Néhány komponens esetében az általam mért értékek nagyobbak bizonyultak a csomagoláson feltüntetettekénél. Ez az eltérés egyes esetekben abból fakadhat, hogy az élelmiszergyártók számolva a tárolás során fellépő veszteségekkel a legtöbb esetben többlet mennyiséget adnak a termékekhez, hogy azok még hosszabb tárolást követően is tartalmazzák az egyes vitaminokat a csomagoláson feltüntetett koncentrációban. A folsav esetében azonban ez az eltérés mindhárom mátrixnál számottevőnek (100-2000 %) bizonyult. Így ennél a vitaminnál nagy valószínűséggel valamilyen analitikai problémával kell számolnunk, mely eredhet koelúcióból, a kimutatási határ közelében lévő mérésből, vagy ezek összegződéséből.

A visszanyerési és a mátrixhatás vizsgálatok eredményei arra mutatnak, hogy az eredetileg C-vitaminra kidolgozott extrakciós eljárás kiterjeszthető a vizsgált B-vitaminokra, ezzel megoldást találva a C-vitamin mintaelőkészítés során fellépő bomlásának minimalizálására. Az ionpárképző használata megnövelte a C-vitamin retenciós idejét a fordított fázisú kromatográfiához képest, ezzel lehetőséget teremtve valódi minták mérésére.

A kiterjesztett mintaelőkészítést és a kidolgozott RP-IP-HPLC módszert sikeresen alkalmaztam különböző élelmiszermátrixok C-, NA, B₂-, és B₆-vitamin-tartalmának meghatározására. Azonban a mozgófázis TFA tartalmának következtében megnövekedett UV cut-off értéke nem tette lehetővé a B₅-vitamin meghatározását. Továbbá a módszer hátrányaként meg kell még említenem a B₁-vitamin csúcsalak, valamint visszatartási, a nikotinsav szelektivitásbeli, valamint a B₉-vitamin érzékenységi problémáit. A B₁-vitamin visszatartása a mozgófázis TFA koncentrációjának optimalizálásával javítható.

Időközben lehetőségem nyílt tömegspektrométer használatára. Így az egyes komponensek esetében felmerülő szelektivitási, visszatartási és érzékenységi problémák együttes megoldása céljából a kromatográfiás módszer tömegspektrométerre való átültetése mellett döntöttem, melynek részletes tárgyalására a következő fejezetben kerül sor.

9. táblázat A reggeli gabonapehely, az instant kakaópor, és a gyümölcsle mérési eredményei (érzékenység, koncentráció, visszanyerés)

		<i>C</i>	<i>NS</i>	<i>NA</i>	<i>B₆</i>	<i>B₉</i>	<i>B₂</i>
Reggeli gabonapehely							
<i>Detektálási hullámhossz</i>	(nm)	266	266	266	285	285	448
<i>Külső kalibrációs egyenes meredeksége</i>		11,42	24,1	24,7	32,35	44,6	23,5
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenes meredeksége</i>		11,1	24,8	21,7	31,25	44,2	23,33
<i>A kalibrációs egyenesek meredeksége közötti eltérés</i>	%	3	3	12	3	0,8	0,7
<i>Külső kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	88,8	5,53	33,08	4,69	0,68	2,41
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	91,48	5,38	37,67	4,86	0,72	2,44
<i>A csomagoláson feltüntetett koncentráció</i>	(mg/100g)	102	-	31	3,4	0,34	2,7
<i>Visszanyerés</i>	(%)	97	103	88	97	99	99
Instant kakaópor							
<i>Detektálási hullámhossz</i>	(nm)	266	266	266	285	266	448
<i>Külső kalibrációs egyenes meredeksége</i>		10,8	31,3	31,25	34,32	21,3	27
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenes meredeksége</i>		11,2	33,4	34,2	35,6	21,26	27,6
<i>A kalibrációs egyenesek meredeksége közötti eltérés</i>	%	4	7	9	4	0,2	2
<i>Külső kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	75,4	7,75	16,4	1,87	3,35	<kh.
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	72,5	7,27	15	1,88	3,57	<kh.
<i>A csomagoláson feltüntetett koncentráció</i>	(mg/100g)	43	-	14	1,2	0,18	-
<i>Visszanyerés</i>	(%)	104	107	109	104	100	105
Gyümölcslé							
<i>Detektálási hullámhossz</i>	(nm)	266	266	266	285	285	448
<i>Külső kalibrációs egyenes meredeksége</i>		10,8	31,3	31,2	34,3	45,8	27
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenes meredeksége</i>		11	28	29,9	35,5	49,6	26,3
<i>A kalibrációs egyenesek meredeksége közötti eltérés</i>	%	2	10	4	3	8	2
<i>Külső kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100ml)	33,2	<kh.	2,68	1,02	0,43	0,3
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100ml)	32,7	<kh.	2,8	1,01	0,4	0,3
<i>A csomagoláson feltüntetett koncentráció</i>	(mg/100ml)	30	-	4,5	0,6	0,05	0,4
<i>Visszanyerés</i>	(%)	102	109	96	104	108	98

6.4 Vízben oldódó vitaminok meghatározása RP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel

A vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása során felmerülő érzékenységi, szelektivitási és detektálási problémák áthidalásának legígéretesebb megoldását egy tömegspektrometriás detektáláson alapuló folyadékkromatográfiás módszer kidolgozásában láttam. Ebből kifolyólag lágy ionizációs technikán alapuló HPLC-ESI-MS/MS kapcsolt rendszeren kidolgoztam egy új többkomponenses módszert, melynek alkalmasságát vizsgáltam vízben oldódó vitaminok meghatározására. Doktori munkám részeként az MS és UV-VIS detektálás között összehasonlító vizsgálatokat is végeztem. E területen végzett munkám első részeként továbbfejlesztettem a korábbiakban alkalmazott standardkészítési módszereket is. A végzett módosításokra az alábbiakban részletezett okok miatt volt szükség.

6.4.1 Standardoldatok készítése

Az eddigiekben a B₂-vitamin 30 µg/ml koncentrációjú vizes oldatát, a B₉-vitaminnak 50 µg/ml koncentrációjú lúgos oldatát alkalmaztam törzsoldatként, melyek sok esetben túl hígnak bizonyultak. Töményebb standardoldatuk elkészítésére egyrészt azért van szükség, hogy ezzel is növeljük stabilitásukat, másrészt a standard addíció során töményebb standardoldatok használatával csökkenthető a mintakivonat hígulása. A mintaoldat hígulásának minimális szintre csökkentése egyrészt azért lényeges, hogy elkerüljük a C-vitamin esetlegesen fellépő bomlását, melyet az extrakcióhoz használt metafoszforsavas oldat koncentráció változása idézhet elő. Másrészt a minták alacsony vitamintartalmának tovább hígítása ellehetlenítheti egyes vitaminok mintából történő meghatározását.

A B₂- és a B₉-vitamin oldhatósága javítható a pH emelésével. Chen és munkatársai [2006] által publikált standardkészítési eljárást alapul véve, a két vitamin bemérését követően a vizes közeg pH-ját 11 körüli értékre növeltem ammónia oldattal. A megnövelt pH mellett már 100 µg/ml koncentrációjú oldat elkészítése is lehetségessé vált. Azonban a B₂- és B₉-vitamin magas pH mellett veszít stabilitásából, ezért oldódásukat követően az oldat pH-ját a lehető legrövidebb időn belül 7 körüli értékre kell visszaállítani. A pH csökkentéséhez hangyasav oldatot alkalmaztam. A komponensek stabilitásának megőrzése szempontjából a pH 7 alatti tartomány még kedvezőbb lenne. Azonban a pH tovább csökkentése a vegyületek kicsapódását

eredményezi. A fény degradációs hatásának csökkentése érdekében a standardoldatok készítéséhez és tárolásához borostyán színű üvegeszközöket használtam.

Irodalmi adatokra támaszkodva a B₁-, B₃-, B₆-vitaminok stabilitásának növelése érdekében vizes oldatuk pH értékét ecetsav hozzáadásával csökkentettem, mivel ezek a vegyületek savas közegben jobban ellenállnak a környezeti hatásoknak. Továbbá az eddigiekben használt törzsoldatok koncentrációját egy nagyságrenddel növeltem (1000 µg/ml), szintén stabilitásuk fokozása miatt. A standardoldatok készítésének részletes leírása az „Anyag és módszer” fejezetben található meg.

6.4.2 RP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS módszer kidolgozása

Az élelmiszer analitika terén a vízben oldódó vitaminok együttes tömegspektrometriás meghatározása még gyerekcipőben jár, így a szakirodalomban csak kevés információ áll ezen a téren rendelkezésünkre. Ezért ebben a fejezetben részletesen kitérek a detektálási paraméterek optimalására, az elválasztás kidolgozására, a módszer validálására, valamint az MS és UV-VIS detektálás közötti különbségek tárgyalására.

6.4.2.1 Detektálási paraméterek optimalása

A detektálási paraméterek optimalás tekintetében két fő csoportra különíthetők. Az egyik csoportot az **ionforrás paraméterek** alkotják, melyek optimális értékei az alkalmazott folyadékkromatográfiás (LC) körülményektől (mozgófázis összetétel, áramlási sebesség) függően változnak. A másik csoportba a **komponensfüggő paraméterek** tartoznak, melyeket az LC körülmények nem befolyásolnak, azonban minden komponens esetében eltérőek, így azokat minden vizsgálandó molekulára külön optimalni kell. Az optimalandó paramétereket és mértékegységeiket, illetve az angol elnevezésükből származó rövidítésüket a **10. táblázatban** tüntettem fel.

10. táblázat ESI-MS/MS detektálás esetén optimalizálható paraméterek angol nevükből származó rövidítései és mértékegységeik feltüntetésével

<i>Ionforrás paraméterek</i>		<i>Komponensfüggő paraméterek</i>	
Ionforrás feszültség - <i>IS</i>	(V)	Deklaszter potenciál - <i>DP</i>	(V)
Függöny gáz - <i>CUR</i>	(psi)	Ütközési cella belépő potenciál - <i>CEP</i>	(V)
Porlasztó gáz - <i>GS1</i>	(psi)	Ütközési energia - <i>CE</i>	(eV)
Száritó gáz - <i>GS2</i>	(psi)	Ütközési cella kilépési potenciál - <i>CXP</i>	(V)
Hőmérséklet - <i>TEM</i>	(°C)	Belépési potenciál - <i>EP</i>	(V)
Porlasztó kapilláris pozíciója	(mm)		

6.4.2.1.1 Ionforrás paraméterek

Először az ionforrás paraméterek optimalizálását végeztem el piridoxinnal Q1 módban. Az irodalmi adatok alapján pozitív ionizációt alkalmaztam. Az optimalizáláshoz 0,1% HCOOH metanol /0,1% HCOOH víz 10/90 arányú elegyét használtam, mely a piridoxint 1µg/ml koncentrációban tartalmazta. Az oldatot infúziós technikával 500 µl/perc áramlási sebességgel juttattam az ionforrásba. A későbbiekben a paramétereket a kidolgozásra került kromatográfiás módszerhez hangoltam. Az optimalizált ionforrás paramétereket a **11. táblázat** tartalmazza. A porlasztógáz az egyenletes folyadék permet kialakításában játszik szerepet. A száritó gáz és a hőmérséklet a keletkezett folyadékcseppek elpárologtatását segíti elő. A legjobb érzékenység a mozgófázis teljes elpárolgása esetén érhető el. A rossz hatásfokú porlasztás az érzékenység csökkenését, míg az erős gázáram és a magas hőmérséklet a jel/zaj arány növekedését eredményezheti. A függönygáz feladata az esetlegesen keletkező nagyobb folyadékcseppek MS-be jutásának megakadályozása ezzel kiküszöbölve, illetve csökkentve az ionoptika elszennyeződését.

11. táblázat Optimált ionforrás paraméterek

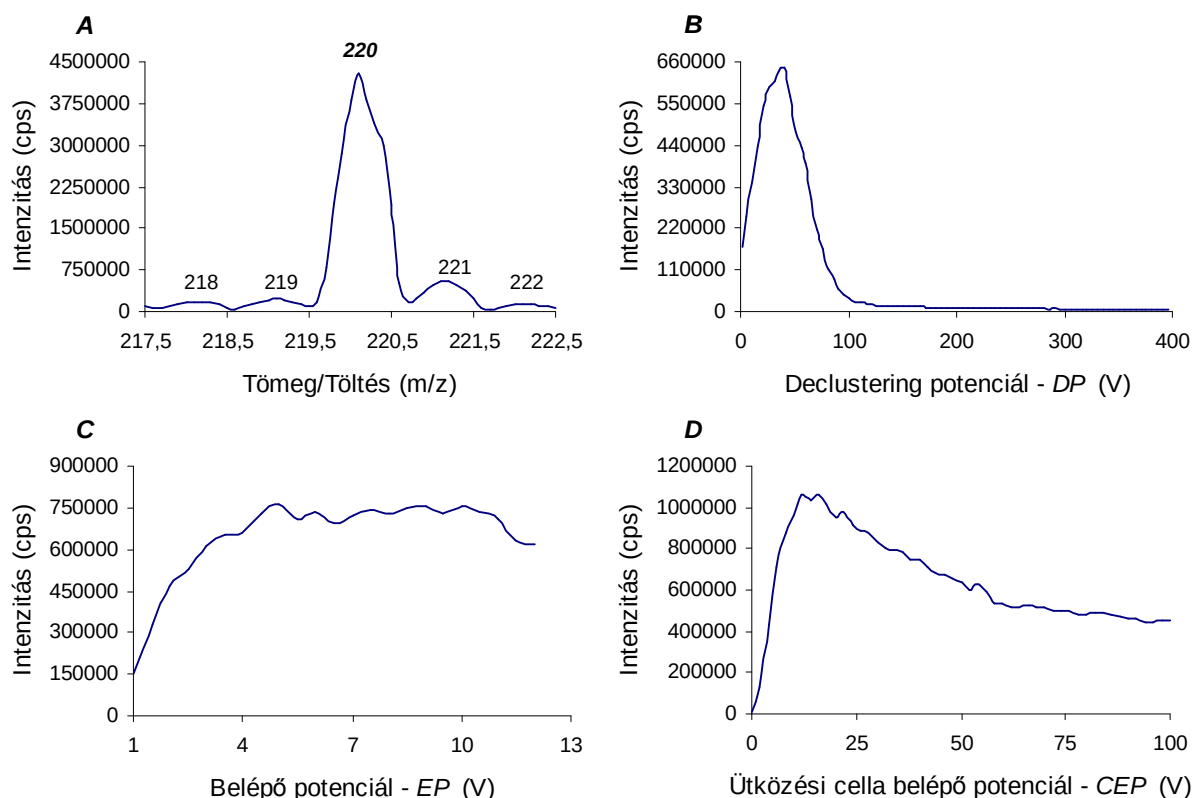
<i>Ionforrás paraméterek</i>	<i>Optimált érték</i>
Ionforrás feszültség - <i>IS</i> (V)	±4500
Függöny gáz - <i>CUR</i> (psi)	10
Porlasztó gáz - <i>GS1</i> (psi)	40
Száritó gáz - <i>GS2</i> (psi)	20
Hőmérséklet - <i>TEM</i> (°C)	300

6.4.2.1.2 *Komponensfüggő paraméterek*

A komponensfüggő paraméterek optimálása során első lépésként felvettem a vizsgált komponensek Q1 tömegspektrumát pozitív és negatív ionizációs módban egyaránt, és ezek alapján kiválasztottam az egyes komponensek anyaionjait (kiindulási ionjait).

Ezt követően a készülék nyújtotta automata optimálás lehetőségét kihasználva meghatároztam az egyes anyaionok fragmentációjával keletkező két legintenzívebb termékiont, valamint a keletkezésükhöz szükséges komponensfüggő paraméterek optimális értékeit. Az optimálást az egyes vitaminok 1 µg/ml koncentrációjú oldataival végeztem, melyek elkészítéséhez 0,1% HCOOH metanol /0,1% HCOOH víz 10/90 arányú elegyét használtam. Az oldatokat infúziós technikával 5 µl/perc áramlási sebességgel jutattam az ionforrásba. A paraméterek optimálását pozitív és negatív módban egyaránt elvégeztem.

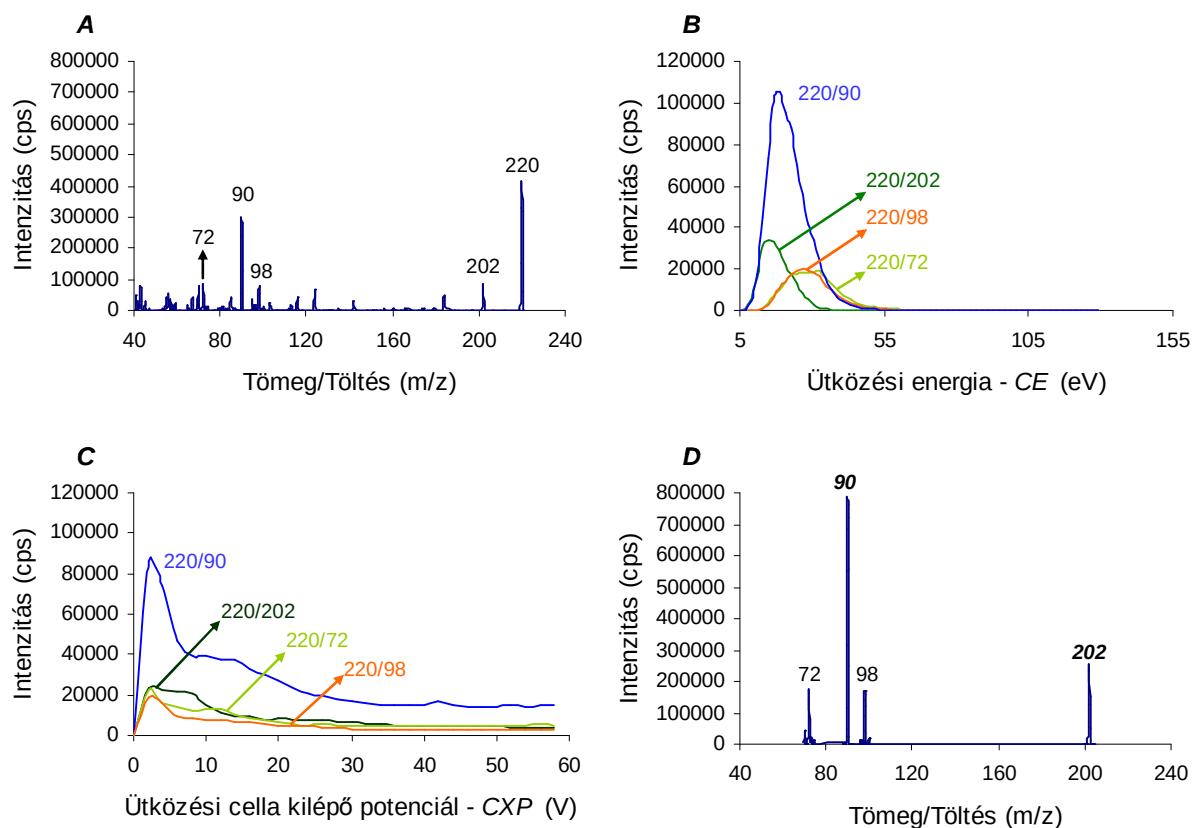
Az automata optimálás során először a cél komponens Q1 spektrumának felvételére került sor (**15/A. ábra**). Ezt követte Q1MI módban a DP, EP és CEP paraméterek függvényében az anyaion intenzitásának vizsgálata (**15/B, C, D. ábra**). Az ionizációs módtól függően a DP ($\pm$) 0-400 V, az EP ($\pm$) 0-12 V, a CEP ($\pm$) 0-188 V közötti tartományba eshet. A DP a skimmer és az orifice kónuszok közötti potenciálkülönbséget jelöli, melynek feladata az ionforrásban az anyaionhoz kötődő oldószer maradványok minimális szintre csökkentése. Túl nagy DP alkalmazása a vizsgálandó molekula ionforrásban bekövetkező hasadását eredményezheti, csökkentve ezzel a Q1-be jutó anyaionok számát. Az EP a Q0 és a föld közötti potenciálkülönbséget jelöli, melynek feladata az ionok összetartása és keresztül vezetése a relatív magas nyomású Q0 régió. Az EP kihat az összes ionpálya feszültségére. A CEP a Q0 és az IQ2 között fellépő potenciálkülönbség, mely a kívánt ion ütközési cellába való bejutását szabályozza. Optimális CEP esetén az anyaion bejutásának határfoka a legnagyobb, megnövelve ezzel a fragmentálható ionok mennyiségét.



15. ábra A pantoténsav Q1 spektruma (**A**), valamint anyaionjának (220 m/z) intenzitása különböző deklasztering potenciál (**B**), belépő potenciál (**C**), illetve ütközési cella belépő potenciál (**D**) értékek mellett Q1MI módban

A DP, EP és CEP paraméterek optimálása után a legnagyobb intenzitást biztosító értékeik beállítása mellett MS2 módban kiválasztásra került a négy legintenzívebb termékion, mely a célkomponenst jellemzi (**16/A. ábra**). Ezt követte MRM módban az ütközési energia (CE) hatásának vizsgálata a kiválasztott négy termékion intenzitására nézve (**16/B. ábra**). A CE a Q0 és a Q2 közötti potenciál különbséget, és egyúttal azt az energiamennyiséget jelöli, mellyel a kiindulási ion (anyaion) felgyorsítása történik a Q2 ütközési cellába érkezésekor, ahol a gáz molekulákkal összeütközve fragmentálódik. Az egyes fragmensek intenzitásmaximuma különböző ütközési energián van. A CXP egyes fragmensek intenzitására gyakorolt hatásának vizsgálata szintén MRM módban történt (**16/C. ábra**). A CXP a keletkezett fragmensek gyorsítására szolgál a Q3-ban. Optimális értékeinek beállításával a fragmensek a legnagyobb hatásfokkal érik el a Q3-at, majd a detektort. Végül az összes komponensfüggő paraméter optimális értékének beállításával a vizsgált komponens MS2 módban felvett spektruma alapján kiválasztható a két legintenzívebb termékion (**16/D. ábra**), melyek alapján a komponensek meghatározása történik [MANUAL, 2005]. A továbbiakban az egyes komponensek

meghatározását szolgáló anyaiion, termékion átmeneteket a következő módon fogom jelölni: anyaiion / termékion (pl.:220/90).



16. ábra A pantoténsav anyaiionjának (220 m/z) termékionjai 50 eV ütközési energia mellett MS2 módban (**A**); A négy legintenzívebb termékion (90, 202, 98, 72) intenzitása különböző ütközési energia (**B**) és ütközési cella kilépő potenciál (**C**) mellett MRM módban; A négy termékion intenzitása az optimált CE és CXP értékek mellett MS2 módban (**D**)

A komponensfüggő paraméterek optimalizálását az összes vizsgálandó komponens esetében elvégeztem, és további munkám során a **12. táblázatban** feltüntetett beállításokat, illetve átmeneteket alkalmaztam. A komponensek meghatározását MRM módban végeztem. Minden vitamin esetében két anyaiion/termékion átmenetet monitoroztam. A két átmenet alkalmazásának magyarázata a későbbiekben kerül tárgyalásra.

12. táblázat A vizsgált vízben oldódó vitaminok anyaion/termékion átmenetei, valamint, meghatározásukhoz szükséges komponensfüggő paraméterek optimális értékei

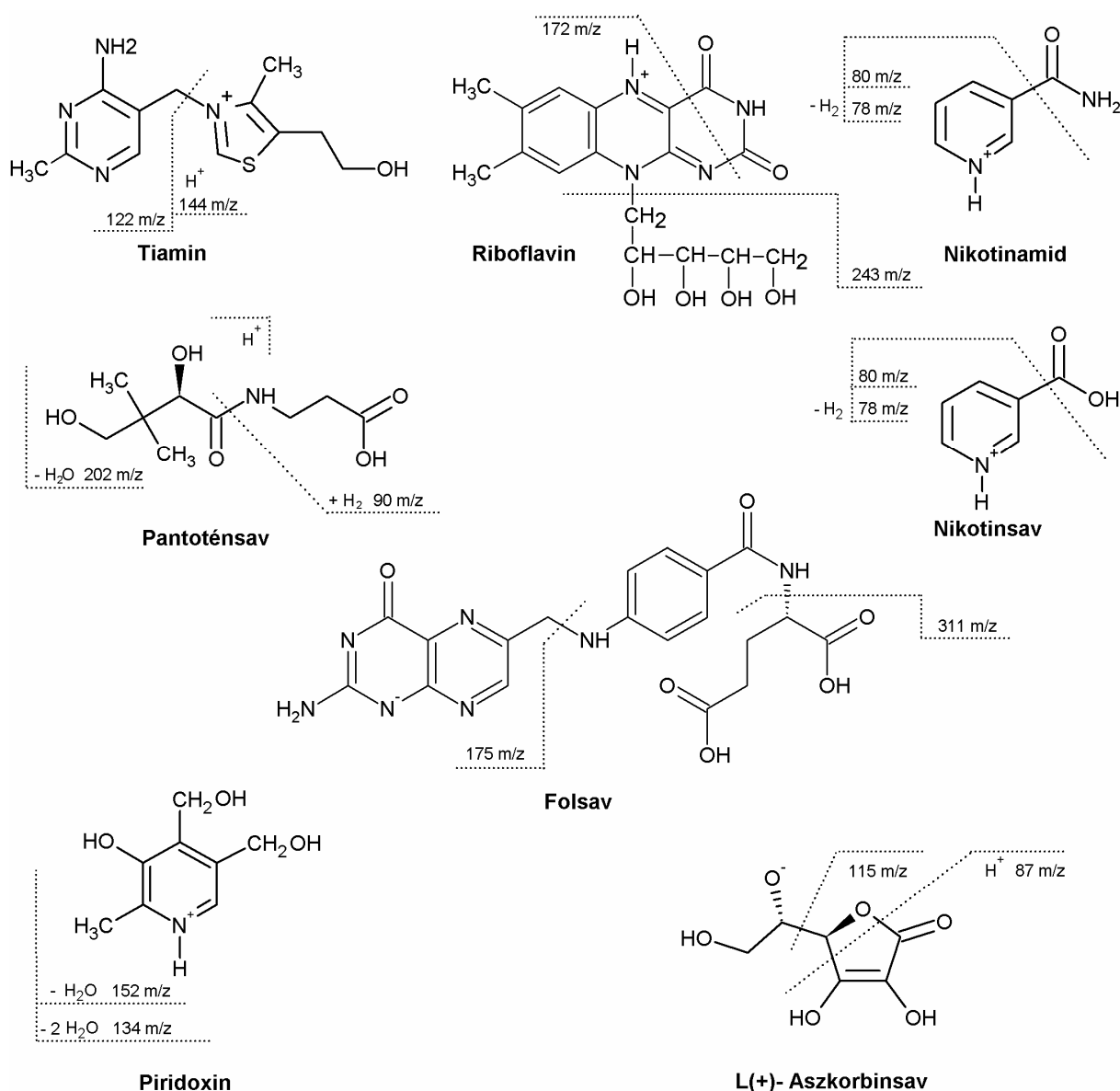
<i>Komponensek</i>	<i>Átmenetek</i>	<i>DP</i> (V)	<i>EP</i> (V)	<i>CEP</i> (eV)	<i>CE</i> (V)	<i>CXP</i> (V)
<i>Tiamin (B₁)</i>	265/122	26	4,5	16	21	4
	265/144	26	4,5	16	19	4
<i>Riboflavin (B₂)</i>	377/243	71	9	16	31	4
	377/172	71	9	16	51	4
<i>Nikotinsav (NS)</i>	124/80	41	4,5	12	29	4
	124/78	41	4,5	12	29	4
<i>Nikotinamid (NA)</i>	123/80	46	9,5	10	27	4
	123/78	46	9,5	10	29	4
<i>Pantoténsav (B₅)</i>	220/90	36	9	14	19	4
	220/202	36	9	14	15	4
<i>Piridoxin (B₆)</i>	170/152	26	8,5	12	19	4
	170/134	26	8,5	12	27	4
<i>Fólsav (B₉)</i>	440/311	-55	-5,5	-20	-32	-4
	440/175	-55	-5,5	-20	-44	-4
<i>Aszkorbinsav (C)</i>	175/115	-30	-5	-10	-16	0
	175/87	-30	-5	-10	-26	0

6.4.2.1.3 A vízben oldódó vitaminok anyaionjainak keletkezése, illetve azok feltételezett fragmentálódása

Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy a folsav és az aszkorbinsav kivételével a vizsgált vitaminmolekulák pozitív módon ionizálódtak jobban. A B₁-vitamin molekula önmagában pozitív töltéssel rendelkezik, így anyaionja az [M]⁺. A B₂-, B₃-, B₅-, B₆-vitaminok egy proton felvételével ionizálódnak, egyszerűen pozitív anyaionokat képezve [M+H]⁺. A B₉-, és a C-vitamin negatív módon rendelkezett nagyobb intenzitással, ezért anyaionjaiknak az egy proton leadásával keletkező [M-H]⁻ egyszerűen negatív kiindulási ionokat választottam.

A **17. ábra** az optimális komponensfüggő paraméterek beállítása mellett keletkező feltételezett termékionokat szemlélteti. A tiamin (B₁) két legjellemzőbb termékionja a molekula kettéhasadásával keletkező pirimidin gyűrűt (122 m/z) és tiazol gyűrűt (144 m/z) tartalmazó molekularészletek. A riboflavin (B₂) legnagyobb hányadban keletkező fragmense (243 m/z) a ribitil-oldallánc elvesztésével jön létre, míg a második legintenzívebb termékion (172 m/z) az izoalloxinváz felhasadásának eredménye. A két B₃-vitamer anyaionjaiból azonos tömegű fragmensek (80m/z, 78m/z) keletkeznek. A nikotinamidból izocianát csoport lehasadásával, míg a nikotinsavból vélhetően széndioxid semleges veszteséssel jön létre a mindkét molekulát jellemző

80 m/z fragmens. A pantoténsav legintenzívebb fragmense az amidkötés felszakadásával keletkező protonálódott β -alanin rész (90 m/z), míg a másik termékionja (202 m/z) egy vízmolekula semleges veszteségével jön létre. A piridoxin fragmensei egy (152 m/z), illetve két (134 m/z) vízmolekula semleges veszteségével keletkeznek. A folsav egyik fragmensét (311 m/z) az L-glutaminsav leszakadását követően fennmaradó pteroesav váz alkotja. A másik jellegzetes fragmense a pteroesav vázából leszakadó biciklikus pterin gyűrű alkotta molekularész (175 m/z). Az aszkorbinsav fragmensei oldalláncának leszakadásával (115 m/z), illetve ciklikus vázának felhasadásával (87 m/z) keletkeznek.



17. ábra Vízben oldódó vitaminok anyaionjának feltételezett fragmentálódása MRM módban az alkalmazott tömegspektrométer beállítások mellett

6.4.2.2 A vízben oldódó vitaminok elválasztásának kidolgozása

A 6.3.3. fejezetben bemutatásra került fordított fázisú ionpár kromatográfiás módszer nem tette lehetővé a B₁-, B₅-, B₉-vitamin valamint a nikotinsav megfelelő UV detektáláson alapuló meghatározását, melynek okai röviden összefoglalva a következők voltak. A mozgófázisok 0,02% TFA tartalma nem biztosította a B₁-vitamin megfelelő visszatartását, így az a holtterefogattal eluálódott. Az ionpárképzőként alkalmazott TFA magas UV cut-off értéke mellett a B₅-vitamin UV detektálással nem volt kimutatható. A nikotinsav elégtelen elválasztása a mátrixkomponensektől megnehezítette mennyiségi meghatározását. A módszer érzékenysége nem volt elegendő a vizsgált minták alacsony B₉-vitamin-tartalmának méréséhez. A B₁-vitamin visszatartása a TFA mennyiségének optimalizálásával valószínűleg javítható lett volna, azonban a TFA nagymértékben rontja a vitaminok ionizációját ezért a TFA elhagyásával egy új MS kompatibilis módszer kidolgozása mellett döntöttem.

Mivel az eddigiekben alkalmazott XTerra analitikai oszlop ionpárképző használata nélkül nem biztosít megfelelő visszatartást a vizsgált vízben oldódó vitaminok mindegyikének, ezért egy más jellegű C₁₈-as állófázisra cseréltem. A választásom a Restek Ultra Aqueous C₁₈-as (3,2 x 150 mm, 5 µm) analitikai oszlopra esett. Azért döntöttem emellett az állófázis mellett, mert ennek az oszlopnak magas a víz toleranciája, akár 100 % víztartalom mellett is megfelelően működik. Ez azért lényeges, mert a polárisabb komponensek visszatartása a mozgófázis víztartalmának növelésével is javítható.

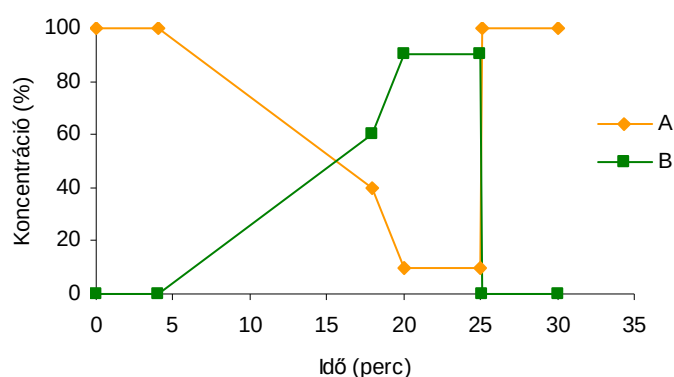
A savas karakterű vegyületek, úgymint a C-vitamin visszatartásának fokozása érdekében ebben az esetben is alacsony pH értékű mozgófázis használata szükséges, ami biztosítja ionvisszaszorított állapotuk fenntartását. A mozgófázisok kiválasztásakor azt is szem előtt kellett tartanom, hogy „ESI-MS kompatibilisek” legyenek, illetve, hogy minél kevésbé rontsák a vizsgált komponensek ionizációját. Mindezeket figyelembe véve mozgófázisoknak meghagytam az eddigiekben alkalmazott vizet és metanolt, de az alacsony 2,5 körüli pH-t hangyasav hozzáadásával értem el. Így az elválasztás kidolgozásához a következő két eluenst használtam: 0,1 % HCOOH/víz (A) és 0,1% HCOOH/metanol (B).

Az UV detektornál szelektívebb ESI-MS/MS alkalmazásánál a komponensek meghatározásához előzetes kromatográfiás elválasztás nem feltétlenül szükséges. A különböző anyaiion/termékion átmenetek monitorozása a legtöbb esetben lehetővé teszi a koeluálódó komponensek minőségi és elvileg mennyiségi meghatározását. Azonban az ESI-MS/MS technika sokkal érzékenyebb a mátrix jelenlétére, mint az eddigiekben alkalmazott UV-VIS detektor. Ugyanis a mátrixkomponensek zavarhatják a vizsgált komponensek ionizációját, mely

az érzékenység romlását vonhatja maga után. Ebből kifolyólag törekedni kell az analitok egymástól, valamint a mátrixkomponensektől való bizonyos mértékű, ha nem is alapvonalig történő elválasztására.

6.4.2.2.1 Gradiens program kidolgozása

Számos változtatást követően a **18. ábrán** bemutatott gradiens elúciós program biztosította a nyolc vizsgált komponens megfelelő visszatartását, illetve elválasztását.



18. ábra Vízben oldódó vitaminok elválasztására kidolgozott gradiens elúciós program (A: 0,1 % HCOOH/ víz; B: 0,1 % HCOOH/metanol, áramlási sebesség:500 µl/perc)

A gradiens program kidolgozása során törekedtem a korán eluálódó vitaminok minél nagyobb visszatartásának elérésére. A legkritikusabb C-vitamin legnagyobb visszatartását a mozgófázis szerves oldószer tartalmának a lehetséges legkisebb szintre csökkentésével értem el. Így a C-vitamin legnagyobb mértékű visszatartása (2,8 perc) a mozgófázis 99,9% víztartalma mellett volt. Azért volt szükséges a kezdeti mozgófázis 0,1 % szerves oldószer tartalmára, hogy a módszer elején már mind a két pumpa működjön, mert az elválasztás során üzembe lépő pumpa zavarokat okozhat.

A gradiens program egy négy perces izokratikus szakasszal kezdődik (99,9% A, 0,1% B), mely biztosítja a vizsgált vitaminok elválasztását az extrakcióhoz használt oldószertől, valamint a mátrix polárisabb komponenseitől, továbbá lehetővé teszi a C-, és a B₁-vitaminok elválását. A következő 14 percben a mozgófázis szerves oldószer aránya lineárisan emelkedett 60%-ig. A gradiens program 500 µl/perc áramlási sebesség mellett 17,8 perc alatt biztosította a nyolc komponens elválasztását. A vitaminok elúcióját követően egy öt perces, izokratikus (90% B) regeneráló szakaszt építettem be, mely az állófázis felszabadulását szolgálja az apoláris

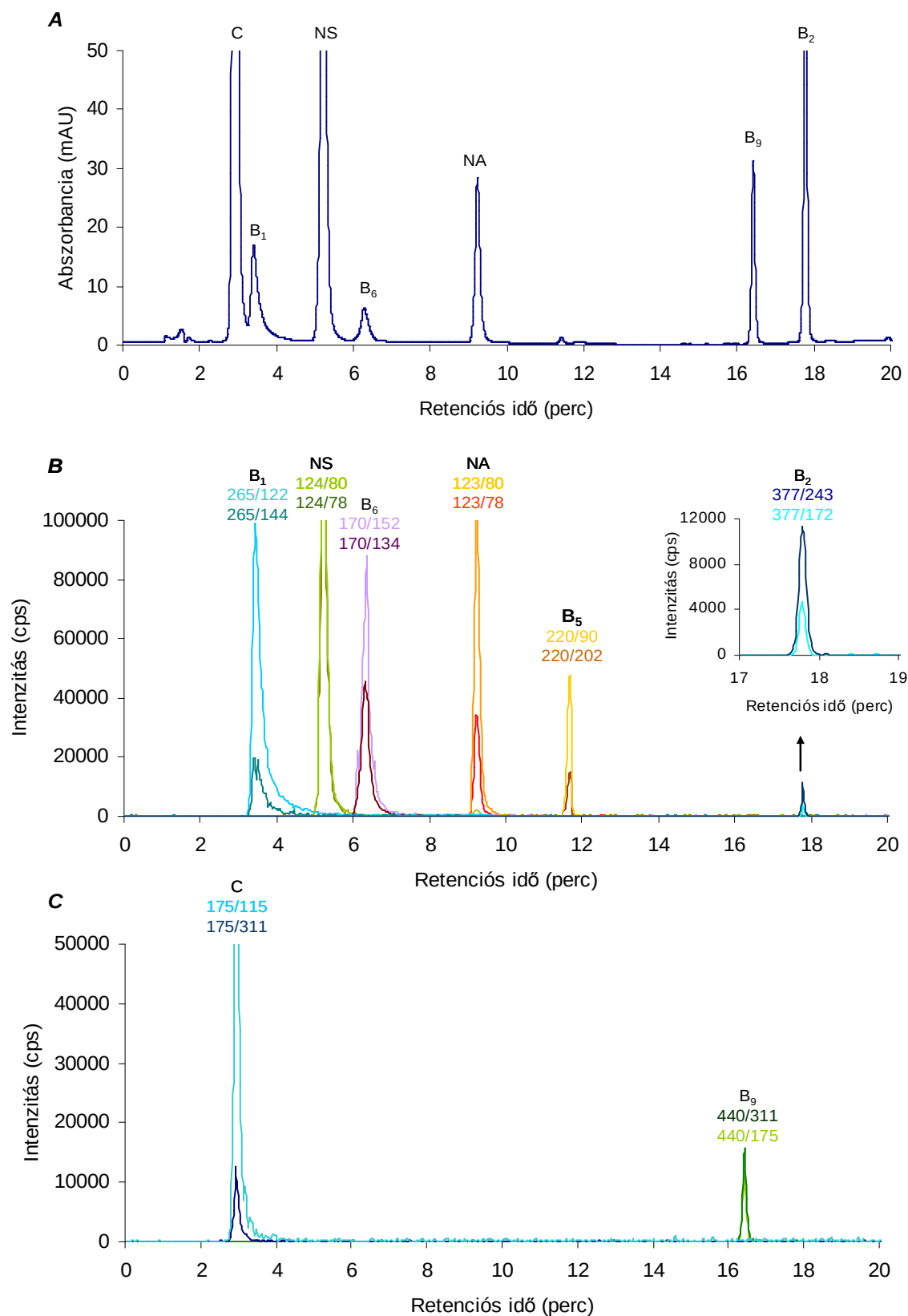
mátrixkomponensektől. A program a kezdeti eluens összetétel öt perces áramoltatásával zárul, ami a kezdeti egyensúly visszaállítását biztosítja a következő injektálást megelőzően.

A vitaminok detektálásához UV detektort és tömegspektrométert egyaránt alkalmaztam. A két készüléket egy kapilláris cső segítségével sorba kötöttem. Az elválasztást követően az effluens először az UV detektor celláján halad keresztül, majd azt elhagyva a kapilláris csövön keresztül jut a tömegspektrométer ionforrásába. Az UV detektálást a korábbiakban felvett spektrumok alapján 266 és 290 nm-en végeztem.

Az alkalmazott kromatográfiás körülmények mellett a vitaminok elúciós sorrendje a következő volt: C, B₁, NS, B₆, NA, B₅, B₉, B₂. A vitaminok retenciós idejét a **14. táblázatban** tüntettem fel. A **19. ábrán** a vitaminok standardoldatának UV (266nm), illetve MRM pozitív és negatív módban felvett kromatogramjai láthatók. A jobb áttekinthetőség érdekében a pozitív és negatív ionizációs módban felvett kromatogramokat külön ábrázoltam.

Az első szembetűnő különbség a két különböző detektálási technikával felvett kromatogramok között, hogy az UV kromatogramon az MRM kromatogramokkal szemben a nyolc vizsgált komponensből csak hét látható. Ennek az az oka, hogy az alkalmazott kromatográfiás körülmények között a vegyületeket fényelnyelésén alapuló UV-VIS detektor nem tette lehetővé a karakterisztikus kromofor csoporttal **nem** rendelkező B₅-vitamin kimutatását. A tömegspektrométer, mely a molekulákat ionizálásukat követően tömeg/töltésük alapján detektálja, lehetővé tette az eddigiekben nehézségekbe ütköző B₅-vitamin meghatározását is.

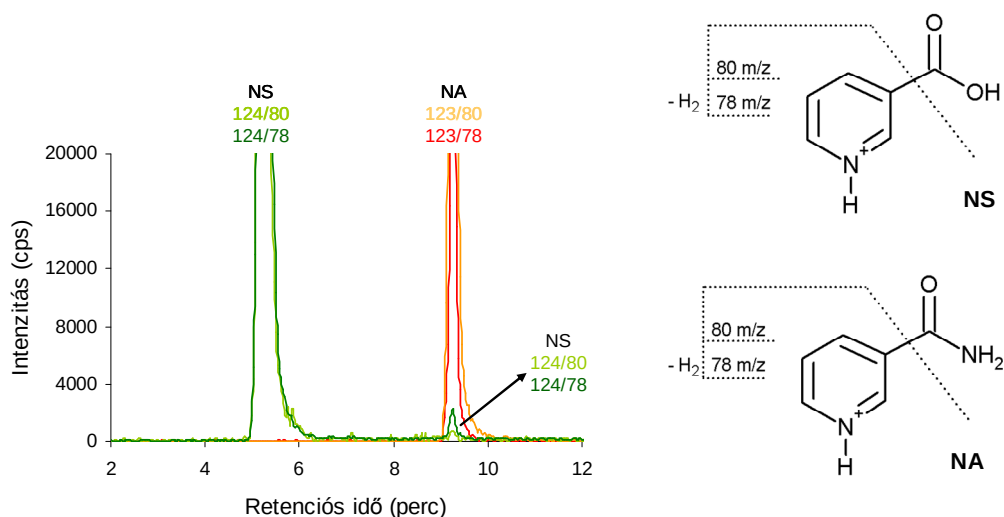
A következő szembetűnő különbség az UV és az MRM kromatogramok között, hogy az MRM kromatogramoknál minden analithoz két kromatográfiás csúcs tartozik. A két kromatográfiás csúcs a komponensek mennyiségi és minőségi meghatározását szolgáló két anyaion/termékion átmenet monitorozásából adódik. Az intenzívebb anyaion/termékion átmenetek a vitaminok mennyiségi meghatározását szolgálják. A második legjellemzőbb anyaion/termékion átmenet a minőségi azonosítás során fellépő hibák kiküszöböléséhez szükséges. Ugyanis előfordulhat, hogy egy mátrixkomponens a vizsgált vitaminok valamelyikéhez hasonló módon fragmentálódik, ugyanazt az anyaion/termékion átmenetet képezve, mely téves azonosításhoz vezethet. Azonban egy második fragmension monitorozásával a tévedés valószínűsége csökkenthető. A két fragmension egy időben történő eluálódása biztosítja a vizsgált komponens azonosságát.



19. ábra A vízben oldódó vitaminok standardoldatának UV detektorral 266 nm-en (A), valamint tömegspektrométerrel MRM pozitív (B) és MRM negatív (C) módban felvett kromatogramjai (C: 100 µg/ml, NS: 50 µg/ml, B₁, B₂, NA, B₅, B₆, B₉: 10 µg/ml)

Az egymáshoz nagyon hasonló fragmentációs viselkedést mutató vitaminok esetében a két átmenet monitorozása ellenére fennállhat a helytelen azonosítás veszélye. A következőben a helytelen azonosításból eredő hibalehetőséget a nikotinsav és a nikotinamid példáján mutatom be.

A nikotinsav és a nikotinamid molekulaszervezete és ebből adódóan a molekulatömege is nagyon hasonló. Pozitív ionizációs módban a nikotinsavból keletkező egyszeresen protonált ion tömege 124 amu, míg a nikotinamidé 123 amu. Továbbá hasonló fragmentációs viselkedésük folytán a két legintenzívebb termékionjuk megegyezik. A komponensfüggő paraméterek optimalizálása során mindkét molekula esetében a 80 és a 78 m/z volt a két legintenzívebb termékion. A nagyfokú hasonlóság önmagában még nem okozna problémát, azonban, ahogy azt a **20. ábra** is mutatja a nikotinsav mindkét átmenete a kromatográfia során a nikotinamiddal megegyező retenciós időben másodszor is megjelenik.



20. ábra Nikotinsav (50 µg/ml) és nikotinamid (10 µg/ml) MRM kromatogramja

Ennek a jelenségnek a lehetséges magyarázata az anyaionok és a fragszionok szerkezetét vizsgálva a nikotinamid molekuláját alkotó elemek természetes izotópeloszlásában keresendő.

Abban az esetben, ha a nikotinamid m/z 123 izotópnak előfordulási valószínűségét 100%-ra normalizáljuk, akkor 7% a valószínűsége annak, hogy a molekulatömege 124 m/z izotóptömegű, illetve 0,4%, hogy 125 m/z lesz. Mivel a két komponens fragsion ionjai megegyeznek, a legvalószínűbb, hogy az a szén, melyhez az aminocsoport kötődik, ¹³C izotóp formájában van jelen. Ennek a molekulatípusnak az előfordulási valószínűsége azonban kisebb az átlagosan számolttól. Ebben az esetben a nikotinamid anyaionja megegyezik a nikotinsav anyaionjával, mely elválasztás hiányában téves azonosításhoz vezethet. Ez a tévedés megfelelő kromatográfias

elválasztással megelőzhető. Tehát a komponensek megfelelő elválasztása a mátrix zavaró hatásának csökkentése mellett, a helyes azonosítás elkerülhetetlen feltétele. A komponensek kromatográfiás elválasztása és két jellemző fragmensionjuk egyidejű monitorozása biztosítja a helytelen azonosításból eredő hiba elkerülését.

6.4.2.3 Teljesítményjellemzők meghatározása

A kromatográfiás elválasztás kidolgozását követően UV és ESI-MS/MS detektálás alkalmazása mellett meghatároztam a módszer teljesítményjellemzőit (kimutatási határ, linearitás, érzékenység, ismételhetőség).

A kimutatási határ és a linearitás vizsgálathoz standardoldatokat készítettem a B-vitaminok esetében 0-10 µg/ml, a C-vitamin esetében 0-100 µg/ml koncentráció tartományban. A C-vitamin esetében azért vizsgáltam a B-vitaminoknál szélesebb koncentráció tartományt, mert a vitaminnal dúsított termékek többségében egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben van jelen.

6.4.2.3.1 Kimutatási határ vizsgálat

Az egyes vízben oldódó vitaminokra vonatkozó kimutatási határokat, illetve a mennyiségi meghatározásuk alsó határait a **13. táblázatban** foglaltam össze. A kimutatási határokat és a mennyiségi meghatározás alsó határait szilárd mintára, illetve folyékony halmazállapotú mintára vonatkoztatva is megadtam, mivel a két eltérő halmazállapotú mintatípus eltérő mintaelőkészítési folyamatot igényel. Az eltérő mintaelőkészítésből adódik, hogy a folyékony halmazállapotú minták esetében alacsonyabb kimutatási határ érhető el.

ESI-MS/MS esetében a kimutatási határok az intenzívebb, azaz a mennyiségi meghatározást szolgáló anyaiion/termékion átmenetekre adtam meg. A minőségi azonosítást szolgáló anyaiion/termékion átmenetek gyengébb intenzitásából kifolyólag előfordulhat olyan eset, amikor az intenzívebb átmenet még a kimutatási határ fölött van, de a gyengébb intenzitású, már a kimutatási határ alá esik. Ebben az esetben a minőségi azonosítás az intenzívebb átmenet és a retenció idő alapján történik.

A két detektálási mód közül a legtöbb vitamin esetében ESI-MS/MS detektálással szignifikánsan jobb kimutatási határ érhető el. Ez alól kivételt képeznek a C-, a B₂- és a B₉-vitaminok. A C-vitamin esetén UV detektálással jelentős, több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb kimutatási határ érhető el. Ez a nagy különbség a két detektálási mód között a C-vitamin rossz ionizációjával magyarázható. A B₂- és a B₉-vitaminok kimutatási határa a két detektálási móddal nem mutat lényeges különbséget, közel azonosnak mondható.

Nikotinsav (NS) esetén ESI-MS/MS detektálással negyedére csökken a kimutatási határ az UV detektálással elért értékhez képest, míg a nikotinamid (NA) a B₁- és a B₆-vitaminok esetében több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb kimutatási határt biztosít.

13. táblázat A HPLC módszer vízben oldódó vitaminokra vonatkozó kimutatási határai, valamint mennyiségi meghatározás alsó határai ESI-MS/MS valamint UV detektálással

	MS/MS						UV					
	Kimutatási határ			Mennyiségi meghatározás alsó határa			Kimutatási határ			Mennyiségi meghatározás alsó határa		
	ng/ml ^a	mg/100g ^b	mg/100ml ^c	ng/ml ^d	mg/100g ^e	mg/100ml ^f	ng/ml ^a	mg/100g ^b	mg/100ml ^c	ng/ml ^d	mg/100g ^e	mg/100ml ^f
C	519	1,04	0,208	1731	3,46	0,692	69	0,14	0,03	229	0,46	0,09
B₁	7	0,01	0,003	25	0,05	0,010	104	0,21	0,04	345	0,69	0,14
B₂	11	0,02	0,005	36	0,07	0,018	17	0,03	0,02	58	0,12	0,07
NS	13	0,03	0,001	45	0,09	0,004	55	0,11	0,02	182	0,36	0,07
NA	3	0,01	0,001	10	0,02	0,003	52	0,10	0,02	173	0,35	0,08
B₆	3	0,01	0,017	9	0,02	0,055	57	0,11	0,02	190	0,38	0,07
B₉	41	0,08	0,004	138	0,28	0,014	53	0,11	0,01	176	0,35	0,02
B₅	3	0,01	0,001	9	0,02	0,003	-	-	-	-	-	-

^a A zaj szórásának háromszorosa osztva a kalibrációs egyenes meredekségével.

^b A kimutatási határ szilárd mintára vonatkoztatva.

^c A kimutatási határa folyadék halmazállapotú mintára vonatkoztatva.

^d A zaj szórásának tízszerese osztva a kalibrációs egyenes meredekségével.

^e A mennyiségi meghatározás alsó határa szilárd mintára vonatkoztatva.

^f A mennyiségi meghatározás alsó határa folyadék halmazállapotú mintára vonatkoztatva.

6.4.2.3.2 Ismételhetőség, linearitás, érzékenység vizsgálat

Az injektálás ismételhetőségének vizsgálatát a B-vitaminok esetében 2 µg/ml, a C-vitamin esetében 14 µg/ml koncentrációjú standardoldatokkal végeztem. A standardoldatokat három ismétlésben injektáltam. A csúcs alatti területekből számított RSD% érték jellemzi az injektálás ismételhetőségét. A két detektálási móddal nyert csúcs alatti területekből számolt RSD% értékeket a **14. táblázatban** tüntettem fel. Az injektálás ismételhetősége UV detektálás esetében jobbnak bizonyult. Az UV detektáláshoz tartozó RSD% értékek 0,2-1,2 %, míg ESI-MS/MS detektálás esetén 2,2-8,8% között alakultak. Az RSD% értékek alapján elmondható, hogy a vízben oldódó vitaminok mérése esetén az UV detektálás robosztusabb.

A három injektálásból a retenciós idők eltolódásának mértékét is meghatároztam RSD% értékben kifejezve (**14. táblázat**). A két rendszer összekapcsolása során nem keletkezett holtterfogat, így nem jelentkezett retenciós idő eltolódás a két detektálás között. Egy injektáláson belül a két detektálási móddal kapott retenciós idők megegyeztek. Az RSD% értékek 0,02-0,51%

közé estek, tehát a vizsgált komponensek retenció idejének csúszása elhanyagolható, lehetőséget nyújtva ezzel a komponensek azonosítására.

14. áblázat A HPLC módszer lineáris tartománya, az injektálás ismételhetősége, valamint az egyes komponensek retenció ideje ESI-MS/MS valamint UV detektálással

MS/MS				UV			Retenciósidő
Koncentráció tartomány	R ²	Injektálás ismételhetősége	Koncentráció tartomány	R ²	Injektálás ismételhetősége		
µg/ml		RSD% (n=3) ^a	µg/ml		RSD% (n=3) ^a		
						perc (RSD%)	
C	0,5-100	0,9600	8,8	0,07-100	0,9997	0,6	2,88 (0,22)
B ₁	0,007-10	0,9999	2,4	0,10-10	0,9988	1,9	3,27 (0,51)
B ₂	0,01-10	0,9999	6,7	0,02-10	0,9999	0,7	17,6 (0,02)
NA	0,003-10	0,9955	4,7	0,05-10	0,9999	0,2	9,14 (0,17)
NS	0,01-5	0,9929	4,3	0,05-10	0,9997	0,6	5,19 (0,23)
B ₆	0,003-10	0,9956	2,2	0,06-10	1,0000	0,5	6,16 (0,35)
B ₉	0,05-10	0,9999	4,2	0,05-10	0,9999	0,5	16,3 (0,04)
B ₅	0,003-10	0,9997	2,9	-	-	-	11,7 (0,06)

R^2 A kalibrációs egyenes illeszkedésének szorossága

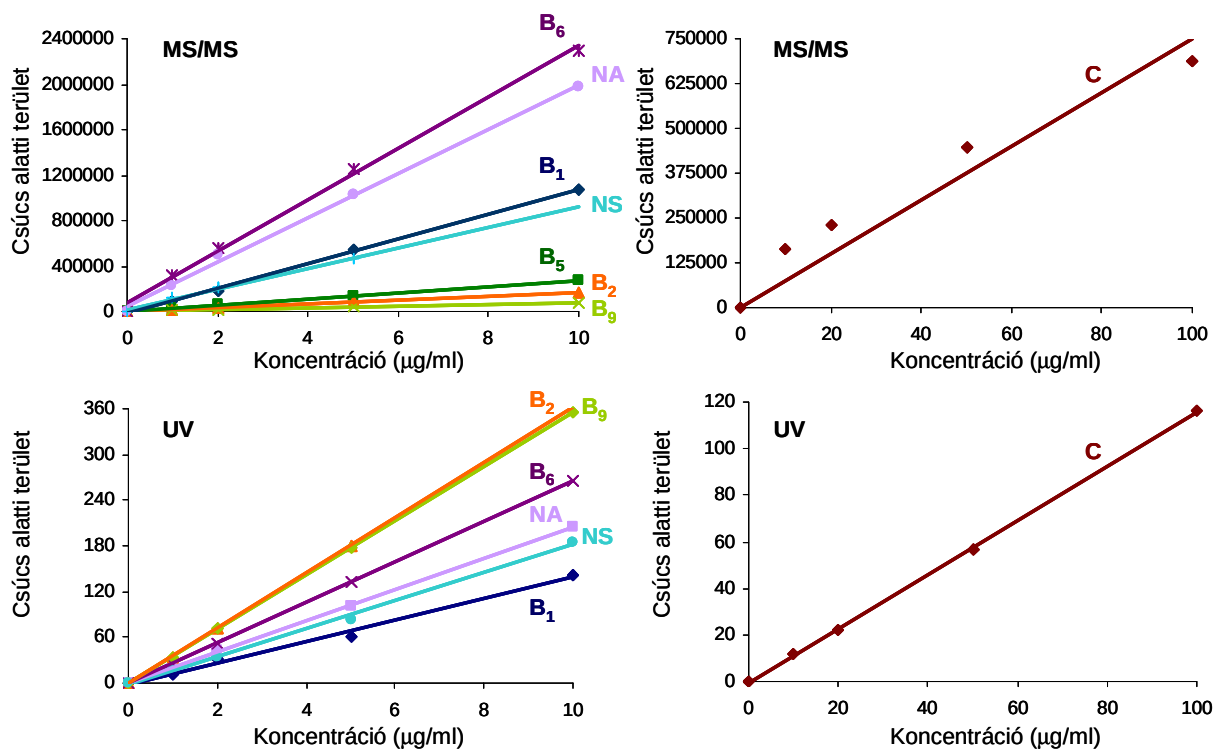
^a Az RSD% értékek standard oldatokra vonatkoznak (C-vitamin 14 $\mu\text{g/ml}$, a többi komponens 2 $\mu\text{g/ml}$)

A kidolgozott HPLC módszer vízben oldódó vitaminokra vonatkozó lineáris tartományának és érzékenységeinek meghatározásához ESI-MS/MS és UV detektálás alkalmazásával minden vitamin esetében öt pontból álló kalibrációs egyenest vettem fel (B-vitaminok: 0, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$, C-vitamin: 0, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). A kalibrációs egyeneseket a **21. ábra** szemlélteti. A C-vitamin kalibrációs egyeneseit az eltérő tengelybeosztás miatt külön koordináta rendszerben ábrázoltam.

Az egyes vízben oldódó vitaminok esetén a nikotinsav kivételével a koncentráció és a csúcs alatti terület között lineáris volt az összefüggés. A nikotinsav lineáris tartományának felső határa ESI-MS/MS detektálással 10 $\mu\text{g/ml}$ helyett 5 $\mu\text{g/ml}$ volt. A vizsgált komponensek lineáris tartományait és az egyenlőség szorosságát kifejező R^2 értékeket a **14. táblázatban** foglaltam össze. Az ESI-MS/MS detektálással felvett kalibrációs egyenesek R^2 értékei 0,96-0,9999 közé, míg UV detektálás esetén 0,9988-1 közé esett. A kalibrációs egyenesek illeszkedése közötti különbségek a két detektálás fentiekben említett robusztusságbeli eltéréseivel magyarázható.

A detektálási rendszer érzékenysége alatt az egységnyi koncentráció változás hatására bekövetkező jelváltozást értjük, ami nem más, mint a kalibrációs egyenes meredeksége. A két detektálási rendszer eltérő érzékenységet mutat az egyes vitaminok esetében. Az egyes komponensek érzékenységbeli sorrendjét a **21. ábra** grafikusán szemlélteti. A legszembetűnőbb különbség a B₂- és a B₉-vitaminok esetében tapasztalható. Amíg UV detektálás esetében ennek a

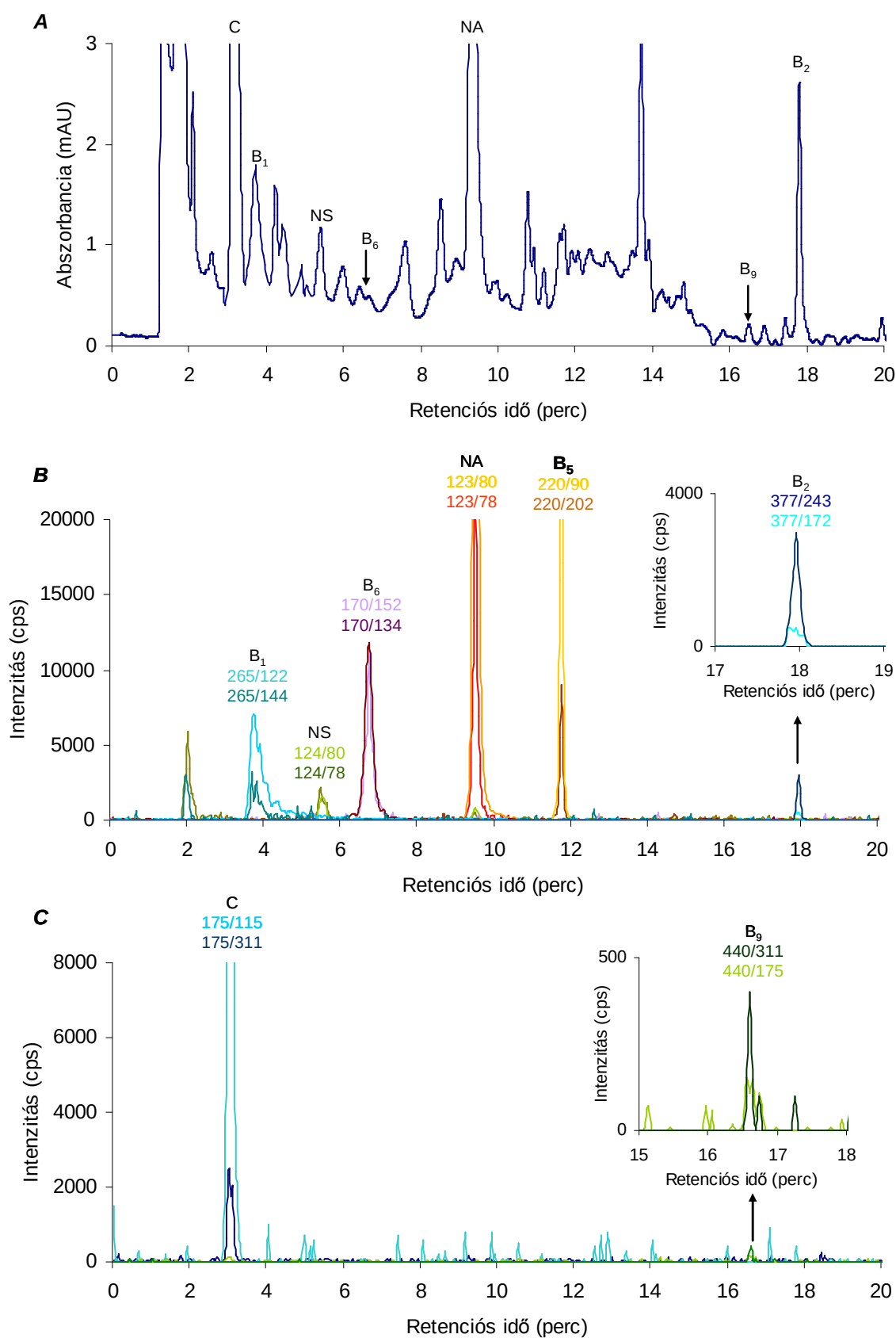
két komponensnek a legjobb az érzékenysége, addig ESI-MS/MS detektálással a legrosszabb. Itt megjegyezendő, hogy főként a tömegspektrométer esetében az egyes komponensek érzékenysége jelentősebben változhat, ami a detektor amortizációjából, illetve elszennyeződéséből ered.



21. ábra Vízben oldódó vitaminok kalibrációs egyenesei ESI-MS/MS és UV detektálással

6.4.3 A módszer alkalmazása élelmiszermintákon

A teljesítményjellemzők meghatározását követően a módszert dúsított élelmiszereken alkalmaztam. Vizsgáltam a mintamátrix jelenlétének zavaró hatását, valamint a két detektálási mód szelektivitásbeli különbségét, melyet a következőkben a reggeli gabonapehely példáján mutatok be. A gabonapehely mintaelőkészítését az „Anyag és módszer fejezetben” leírtak alapján végeztem el. Vitamintartalmát az előzőekben részletezett HPLC-UV-ESI-MS/MS módszerrel határoztam meg. A gabonapehely UV és MRM kromatogramjai a **22. ábrán** láthatók.



22. ábra Reggeli gabonapehely extraktum UV detektorral 266 nm-en (A), valamint tömegspektrométerrel MRM pozitív (B) és MRM negatív (C) módban felvett kromatogramjai

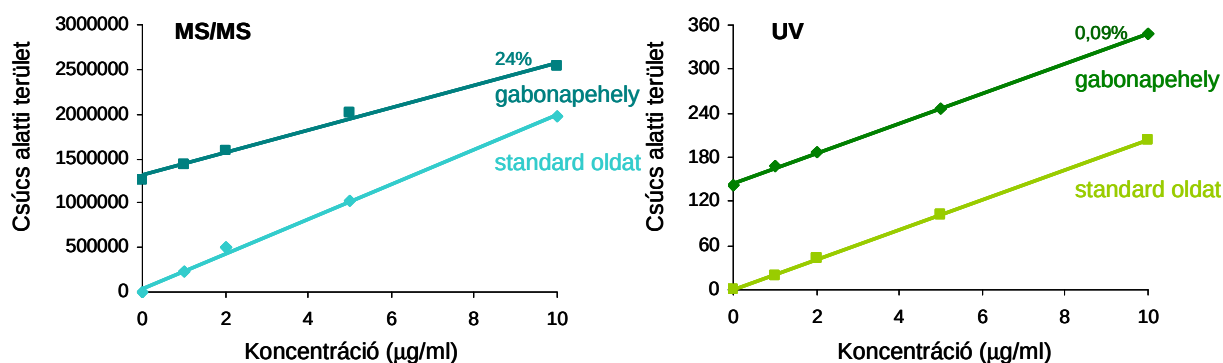
6.4.3.1 Szelektivitás vizsgálat

A gabonapehely UV és MRM kromatogramjai között szembetűnő a különbség. Amíg UV detektálással (266nm) a vizsgált komponensek mellett számos mátrix komponens is megjelenik (**22/A. ábra**), addig az MRM kromatogramokon mindössze egy mátrixeredetű „hamis” csúcs látható 2 perces retenciós idővel (**22/B. ábra**). Ez a szelektivitásbeli különbség a két detektálási mód működési elvéből ered.

Mivel a vízben oldódó vitaminok többségének meghatározásához használt 266nm-en számos más komponens is rendelkezik fényelnyeléssel, ezért fennáll a koelúció veszélye, mely nehézségeket okozhat a kvalitatív meghatározás során. Ezzel szemben ESI-MS/MS detektálásnál a komponensek koelúciója nem okoz ilyen jelentős szelektivitásbeli problémát. Például jelen esetben, amíg 266 nm-en a nikotinamid részleges koelúciója figyelhető meg egy mátrixkomponenssel (**22/A. ábra**), addig az MRM mód tiszta csúcsot biztosít (**22/B. ábra**) a mennyiségi meghatározáshoz.

6.4.3.2 Mátrixhatás vizsgálat

A gabonapehely vitamintartalmának kvantitatív meghatározását megelőzően a 6.3.3.2. fejezetben leírtakhoz hasonló elven standard addíciós technikát alkalmaztam az esetlegesen fellépő mátrixhatás kiszűrése és kiküszöbölése érdekében. Az egyes vitaminok esetén a mátrixhoz illesztett valamint a külső kalibrációs egyeneseket összevetve meghatároztam a meredekségük közti különbséget, melynek eredményeit százalékban kifejezve a **15. táblázatban** foglaltam össze. UV detektálásnál a meredekségek közötti különbségek 0,09-2,4 %, míg ESI-MS/MS detektálás esetén 3-36% közé estek. Ezek az értékek azt tükrözik, hogy feltételezhetően a tömegspektrométer ionforrása érzékenyebben reagál a mátrix jelenlétére, mint az UV detektor. Így például a nikotinamid esetében, amíg UV detektálásnál nem, addig ESI-MS/MS detektálásnál már számolni kell a mátrix zavaró hatásával (**23. ábra**).



23. ábra A nikotinamid UV és ESI-MS/MS detektálással felvett külső, valamint mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenesei a meredekségek közötti különbségek százalékos értékével

Mivel az UV detektálással felvett kalibrációs egyenesek meredekségeinek különbsége minden vitaminnál 20% alatt maradt, ezért UV detektálás esetén úgy ítélt meg, hogy nem szükséges mátrixhoz illesztett kalibráció használata, a mennyiségi meghatározás külső kalibráció alapján is elvégezhető. Azonban ESI-MS/MS detektálásnál a nikotinsav és a nikotinamid esetében a meredekségek közti különbség meghaladta a 20%-ot. Így, e két komponens, illetve a vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása esetén tömegspektrométer alkalmazása mellett mátrixhoz illesztett kalibráció készítése szükséges a mátrix torzító hatásának kivédése érdekében.

6.4.3.3 Mennyiségi meghatározás

A gabonapehely vízben oldódó vitamintartalmát külső és mátrixhoz illesztett kalibrációval egyaránt meghatároztam, melynek eredményeit a csomagoláson feltüntetett értékekkel együtt a **15. táblázatban** foglaltam össze.

A továbbiakban a két detektálási mód összehasonlításához az előzőekben említett okokból kifolyólag a mátrixhoz illesztett kalibrációval kapott értékeket vettem alapul.

A vártakkal ellentétben a két detektálási móddal kapott eredmények nem minden vitaminnál egyeztek. Amíg az aszkorbinsav, a nikotinamid és a piridoxin esetében az eredmények közötti különbség elhanyagolható (<20%), addig a többi komponensnél ez az eltérés 30% feletti.

A nikotinsav, a B₉- és a B₂-vitamin esetében az ESI-MS/MS detektálással kapott eredmények tekinthetők megbízhatóbbaknak, ami ezen komponensek mintában való alacsony koncentrációjából fakad. Ugyanis az UV detektorral szemben a tömegspektrométer optimális mérési tartománya a ng/ml-es koncentráció szintbe tartozik. Így a kisebb koncentrációban

jelenlévő vitaminok (ng/ml) tömegspektrométerrel, a magasabbak (µg/ml) UV detektorral mérhetők nagyobb megbízhatósággal. Ezt az is alátámasztja, hogy az ESI-MS/MS detektálással meghatározott B₉-, és B₂-vitamin-tartalom közelebb áll a csomagoláson feltüntetett értékekhez, mint az UV detektorral mérték.

Ez alól kivételt képez a tiamin, ahol az MS-es, illetve az UV-val mért értékek között szembetűnő, közel 60%-os az eltérés. Ebben az esetben az alacsony koncentráció ellenére az UV-val mért érték közelebb áll a csomagoláson feltüntetettéhez. Erre a nagymértékű eltérésre pontos magyarázatot nem találtam, nagy valószínűséggel valamilyen kromatográfiás eredetre vezethető vissza.

Következtetésképpen elmondható, hogy a B₁-vitamin kivételével a vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása során a nagyobb koncentrációban jelenlévő komponenseknél az UV detektálás, míg a kisebb koncentrációban jelenlévőknél az ESI-MS/MS detektálás a megbízhatóbb.

15. táblázat Vitaminnal dúsított reggeli gabonapehely kétféle kalibrációs technikával, ESI-MS/MS és UV detektálással meghatározott, valamint a csomagoláson feltüntetett vízben oldódó vitamintartalma

		<i>Reggeli gabonapehely</i>							
		<i>C</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>NS</i>	<i>NA</i>	<i>B6</i>	<i>B9</i>	<i>B5</i>
		<i>MS/MS</i>							
<i>Anyion/termékion átmenet</i>	(m/z)	175/87	265/122	377/243	124/80	123/80	170/152	440/175	220/90
<i>Külső kalibrációs egyenes meredeksége</i>		7163	250769	68408	11377	200469	236054	18120	60876
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenes meredeksége</i>		5950	207143	55377	7270	151429	248500	15457	59286
<i>A kalibrációs egyenesek meredeksége közötti eltérés</i>	%	17	17	19	36	24	5	15	3
<i>Külső kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	117	5,2	2,2	1,2	25	4,4	0,27	12,9
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	141	6,3	2,7	1,8	33	4,2	0,32	13,2
<i>A csomagoláson feltüntetett koncentráció</i>	(mg/100g)	102	2,4	2,7	-	31	3,4	0,34	10
		<i>UV</i>							
<i>Detektálási hullámhossz</i>	(nm)	266	266	266	266	266	290	290	-
<i>Külső kalibrációs egyenes meredeksége</i>		1,2	13,8	36,1	18,2	20,4	26,5	35,6	-
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációs egyenes meredeksége</i>		1,2	14,1	36,0	18,6	20,4	26,6	34,7	-
<i>A kalibrációs egyenesek meredeksége közötti eltérés</i>	%	0,12	2,16	0,20	1,99	0,09	0,17	2,40	-
<i>Külső kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	117	2,6	1,6	0,57	28	3,6	0,21	-
<i>Mátrixhoz illesztett kalibrációval nyert koncentráció</i>	(mg/100g)	117	2,6	1,6	0,56	28	3,6	0,22	-
<i>A csomagoláson feltüntetett koncentráció</i>	(mg/100g)	102	2,4	2,7	-	31	3,4	0,34	10

6.4.4 Az extrakció hatásfokának vizsgálata

A C- és a B-vitaminok együttes meghatározásához alkalmazott metafoszforsavas mintaelőkészítés alkalmasságára irányuló kísérletek részeként a 6.3.3.2. fejezetben a mintaelőkészítés során esetlegesen fellépő vitaminveszteség mértékét határoztam meg.

Ebben a fejezetben a mintaelőkészítés során alkalmazott extrakció hatásfokának vizsgálata kerül tárgyalásra. Extrakciós hatásfok alatt azt értem, hogy az adott kivonatolási technika alkalmazott beállításai (minta mennyiség/oldószer arány, ultrahangos kezelés időtartama) megfelelőnek bizonyulnak-e a kivonható vitaminmennyiség teljes kinyeréséhez.

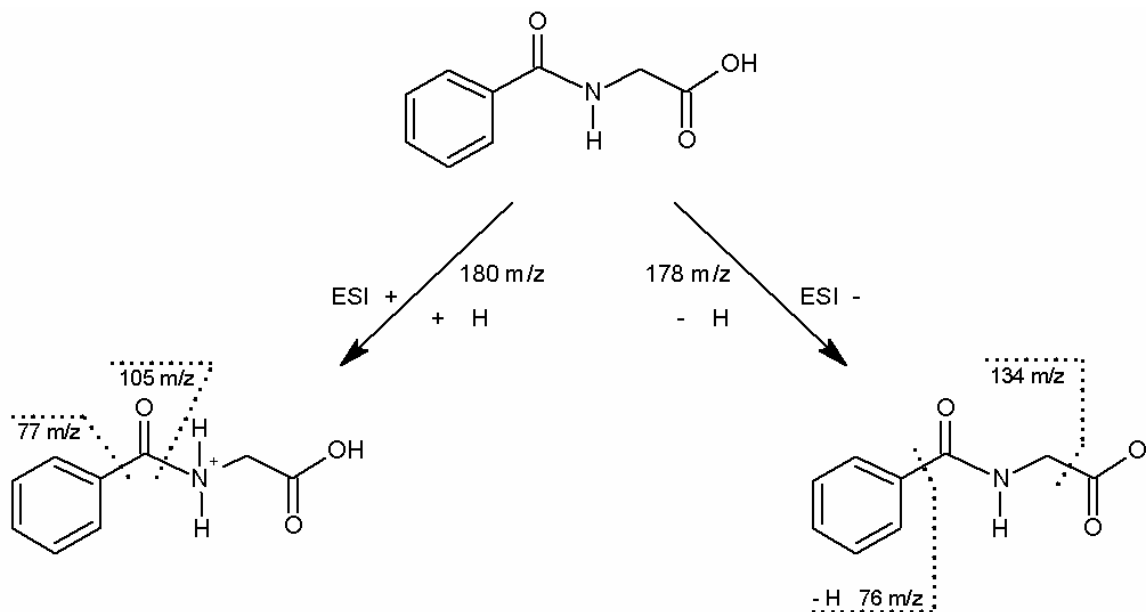
A mintaelőkészítés hatásfokának vizsgálatát egy belső standard alkalmazásának segítségével három különböző mintamátrixon (gabonapehely, gyümölcsle, instant kakaópor) végeztem el. Belső standardként a hippursavat használtam. Ez a vegyület a lovak és más növényevő állatok vizeletében található meg. Számos ok miatt esett a választásom erre a vegyületre. Egyrészt amellet, hogy kémiai szerkezete hasonlóságot mutat a vízben oldódó vitaminokkal (**25. ábra**), az élelmiszer mintákban nincs jelen. A komponensek többségének detektálásához alkalmazott hullámhosszon, azaz 266 nm-en megfelelő abszorbanciával rendelkezik, valamint pozitív és negatív ionizációs módban egyaránt ionizálható. Jól beilleszthető a kidolgozott módszerbe, azaz a fentiekben leírt kromatográfiás körülmények között megfelelő retencióval, a vizsgált komponensek között eluálódik (**25. ábra**), valamint megfelelően elválik a mátrixkomponensektől is (**26. ábra**), habár a kakaópor esetében a megfelelő elválasztás érdekében a gradiens program kismértékű változtatására (lassítására) volt szükség.

A vízben oldódó vitaminokhoz hasonlóan elvégeztem a hippursav komponensfüggő paramétereinek optimalását ESI pozitív és negatív módban egyaránt, melynek értékeit a **16. táblázatban** tüntettem fel.

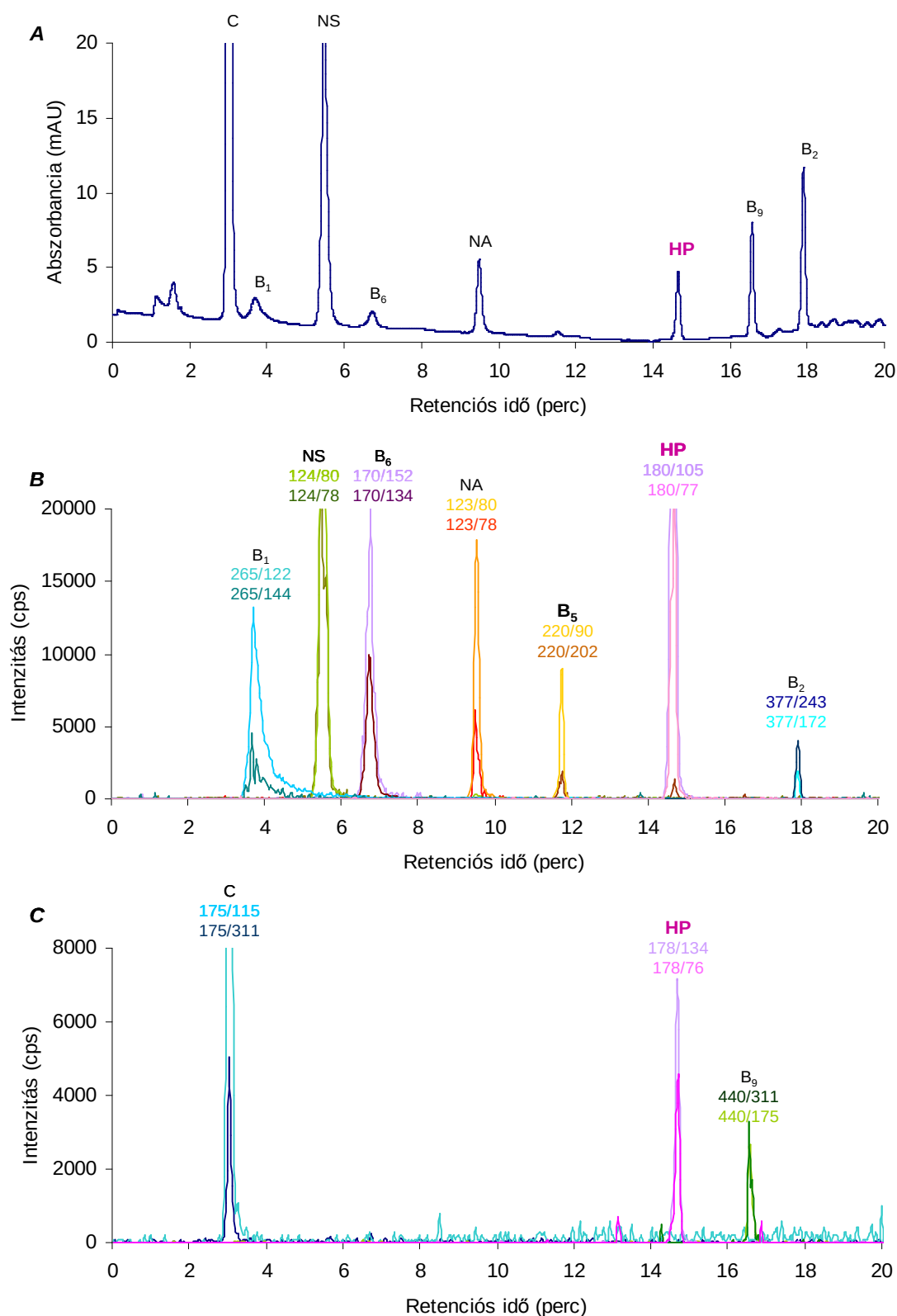
16. táblázat A hippursav anyaiion/termékion átmenetei, valamint komponensfüggő paramétereinek optimális értékei ESI pozitív és negatív ionizációs módban

<i>Hippursav (HP)</i>						
<i>Ionizációs mód</i>	<i>Átmenetek (m/z)</i>	<i>DP (V)</i>	<i>EP (V)</i>	<i>CEP (eV)</i>	<i>CE (V)</i>	<i>CXP (V)</i>
<i>ESI +</i>	180/105	16	4,5	12	17	4
	180/77	16	4,5	12	45	8
<i>ESI -</i>	178/134	-20	-3	-10	-16	-2
	178/77	-20	-3	-10	-22	-8

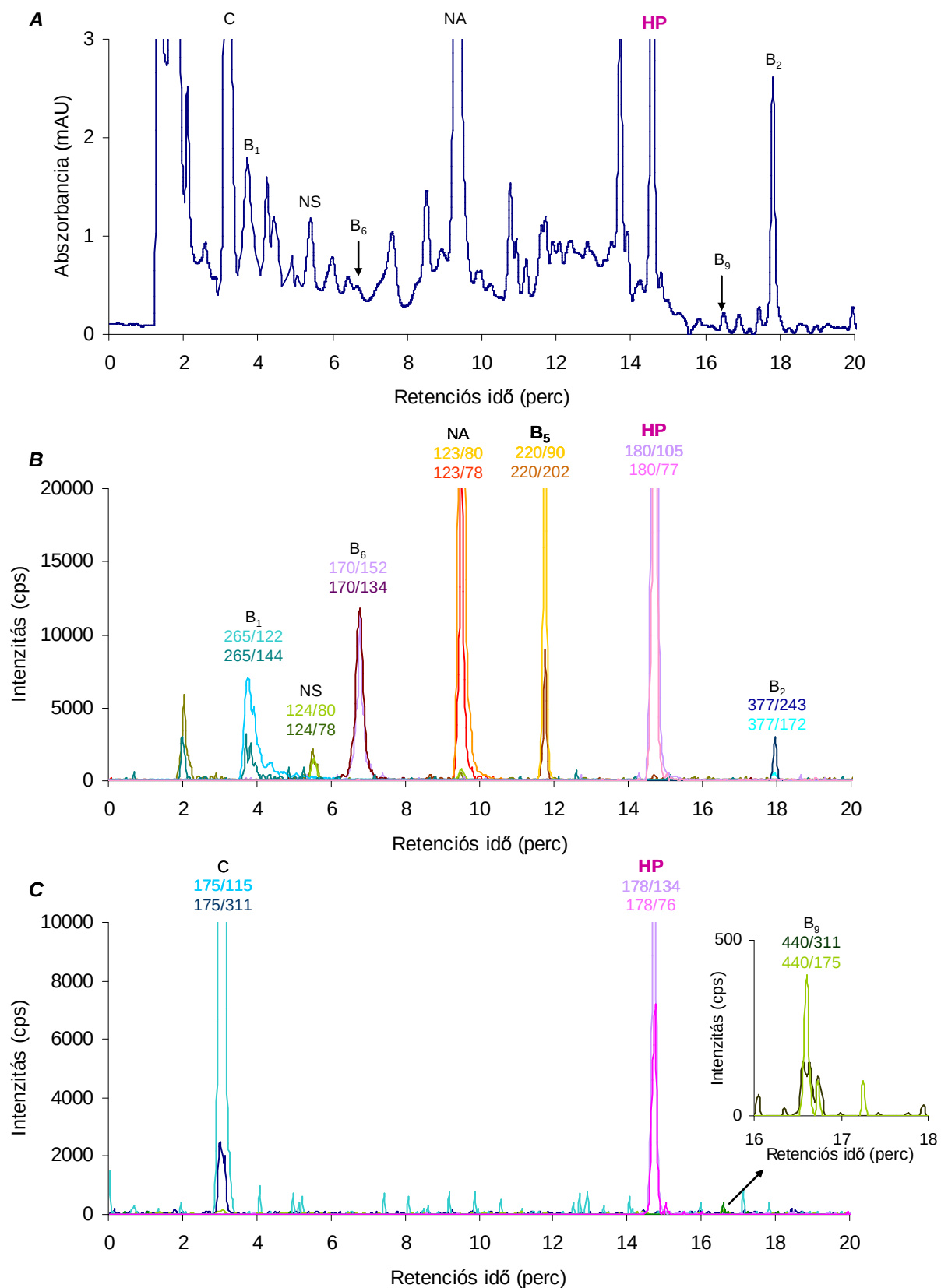
A hippursav ESI pozitív módban egy proton felvételével, ESI negatív módban egy proton leadásával ionizálódik egyszeresen pozitív $[M+H]^+$, illetve egyszeresen negatív $[M-H]^-$ anyaiionokat képezve. A hippursav feltételezett ionizációját és fragmentálódását a **24. ábra** szemlélteti. Pozitív módban a legintenzívebb termékion (105 m/z) glicin kilépésével, a második legintenzívebb a benzolgyűrűhöz kapcsolódó oldallánc lehasadásával (77 m/z) keletkezik. Negatív módban az egyik fragmens (intenzívebb) széndioxidvesztéssel (134 m/z), a másik a benzolgyűrűhöz kapcsolódó oldallánc lehasadásával (76 m/z) jön létre.



24. ábra A hippursav ionizációja ESI pozitív és ESI negatív ionizációs módban, valamint a keletkezett anyaiionok feltételezett fragmentációja MRM módban az alkalmazott tömegspektrométer beállítások mellett



25. ábra Vízben oldódó vitaminok valamint belső standardként alkalmazott hippursav (HP) standardoldatának UV detektorral 266 nm-en (A), valamint tömegspektrométerrel MRM pozitív (B) és MRM negatív (C) módban felvett kromatogramjai (C: 100 µg/ml, NS, HP: 10 µg/ml, B₁, B₂, NA, B₅, B₆, B₉: 2 µg/ml)



26. ábra Gabonapehely (belső standardként hozzáadott hippursavval (HP) oldatának UV detektorral 266 nm-en (A), valamint tömegspektrométerrel MRM pozitív (B) és MRM negatív (C) módban felvett kromatogramjai

Az extrakció hatásfokának vizsgálatát a következő módon végeztem el. Mind a három mintamátrixból két-két párhuzamos bemérést készítettem (1-1g gabonapehely, 1-1 g kakaópor, 5-5 ml gyümölcslé). Az extrakciót megelőzően a mintákhoz 1200 µl hippursav törzsoldatot (1000 µg/ml) adtam. Ezt követően elvégeztem az extrakciót, majd az extraktumokat centrifugáltam az „Anyag és módszer” fejezetben leírtak alapján. A felülúszó eltávolítását követően a két párhuzamos minta közül az egyiken, már hippursav hozzáadása nélkül megismételtem az extrakciót. A két extrakció elvégzését követően a két felülúszót összeöntöttem, majd metafoszforsavval (2 m/v %) 30 ml-re jelre töltöttem. Annak érdekében, hogy a két párhuzamos extraktumot összehasonlíthatóvá tegyem (pl.: a különböző hígítási szintből eredő mátrixhatás kiküszöbölése érdekében) az egyszer extrahált minta felülúszóját szintén 30 ml-re jelre töltöttem metafoszforsavval (2 m/v %).

Az extrakció hatásfokának kimutatásához belső standard használatára a következők miatt volt szükség. A felülúszó eltávolítását követően az üledék még tartalmaz egy bizonyos mennyiségű extraktumot (ugyanis az üledék nedves marad, a felülúszó nem távolítható el maradék nélkül). Ebből az következik, hogy a megismételt extrakció során nyert felülúszó nem csak a mintából újonnan extrahálódó, hanem az első extrakcióval már kinyert, csak az üledékben visszamaradt vitaminokat is tartalmazza. Tehát a második extraktumból kimutatott vitaminmennyiség nem feltétlenül a tiszta oldószer hatására újonnan kivont komponensekből származik. Ennek figyelmen kívül hagyása téves következtetések levonásához vezethet.

Ez a tévedés belső standard alkalmazásával elkerülhető. A mintához adott hippursavval a vitaminokhoz hasonló jelenség történik, így belső standardként felhasználható az eredmények korrigálásához. Például a gyümölcsnél a kétszeres extrakció 13%-al magasabb B₁-vitamin értéket eredményezett az egyszeres extrakcióhoz képest. Azonban a B₁-vitaminhoz hasonló módon a hippursav mennyisége is növekedett 12%-al. Tehát abban az esetben, ha az első extrakcióból visszamaradt vitamin mennyiséget figyelmen kívül hagyjuk, akkor az extrakció hatásfoka mindössze 88 %. Míg a belső standarddal történő korrigálást követően ez az érték 99%. Az előbbieket figyelembe véve az extrakció hatásfokát a **3. egyenlet** alapján számítottam ki.

3. egyenlet

$$\text{Extrakció hatásfoka (\%)} = \frac{\text{terület}_{v1} / \text{terület}_{H1}}{\text{terület}_{v2} / \text{terület}_{H2}} \times 100$$

terület_{v1} - egyszeres extrakcióval kinyert vitamin csúcs alatti területe

terület_{H1} - egyszeres extrakcióval kinyert hippursav csúcs alatti területe

terület_{v2} - kétszeres extrakcióval kinyert vitamin csúcs alatti területe

terület_{H2} - kétszeres extrakcióval kinyert hippursav csúcs alatti területe

A **3. egyenlet** alkalmazásával az extrakció hatékonyságát mindhárom vizsgált mátrix (gabonapehely, gyümölcsle, kakaópor) esetében meghatároztam. A kapott értékeket a **17. táblázatban** foglaltam össze.

17. táblázat A metafoszforsavas extrakció hatékonyság vizsgálatának eredményei (n=3)

<i>Komponensek</i>	<i>Gabonapehely</i>	<i>Gyümölcsle</i>	<i>Kakaópor</i>
	<i>%*</i>		
C	104	104	103
B₁	109	99	100
B₂	95	103	-
NA	99	106	104
NS	100	-	116
B₅	101	103	108
B₆	97	94	100
B₉	80	103	85

Az 2. egyenlet alapján számított értékek.

A B₉-vitamin kivételével az extrakció hatékonysága minden vitamin esetében 95% fölött volt. A gabonapehelynek és a kakaópornál az extrakció hatékonysága a B₉-vitamin esetében 80, illetve 85%. Ez a többi vitaminhoz, illetve a gyümölcsléhez viszonyított eltérés azzal magyarázható, hogy ezen két minta B₉-vitamin tartalma a kimutatási határ környékére esik.

Végeredményül elmondható, hogy az egyszeres és a kétszeres extrakció között nincs szignifikáns különbség, tehát a metafoszforsavas extrakciós körülmények alkalmasak dúsított élelmiszerek vitamintartalmának meghatározására.

Az extrakció hatékonysága mellett vizsgáltam a mintaelőkészítés ismételhetőségét is. Három párhuzamos mintaelőkészítést végeztem mindhárom minta esetén, és az eredmények közötti

eltérést RSD%-ban fejeztem ki (**18. táblázat**). Minden vitamin esetén az ismételhetőséget jellemző RDS% érték 10% alatt maradt, mely azt jelzi, hogy a mintaelőkészítés reprodukálható.

18. táblázat Metafoszforsavas mintaelőkészítés ismételhetősége

<i>Komponensek</i>	<i>Gabonapehely</i>	<i>Gyümölcsle</i>	<i>Kakaópor</i>
	<i>RSD% (n=3)</i>		
<i>C</i>	2,4	3,8	1,9
<i>B₁</i>	7,7	5,5	4,6
<i>B₂</i>	3,2	1,5	-
<i>NA</i>	3	6,8	0,6
<i>NS</i>	2	-	8,9
<i>B₆</i>	4,1	5,2	3,7
<i>B₉</i>	2,8	5,0	6,1

Összegzésképpen elmondható, hogy a fent bemutatott eredmények alapján a metafoszforsavas extrakció alkalmas a C- és a vizsgált B-vitaminok dúsított élelmiszerekből történő kinyerésére.

6.5 Természetes vitamintartalom meghatározás

Az Irodalmi áttekintésben már említésre került, hogy a vízben oldódó vitaminoknak számos azonos hatású vitamereje létezik a természetben, így az általunk fogyasztott élelmiszerekben is. Az egyes vitamerek szabad, valamint fehérjékhez, esetleg cukrokhoz kötött formában egyaránt előfordulnak. Ebből kifolyólag az élelmiszerek teljes vitamintartalmának meghatározása a kötött formák felszabadításával lehetséges, mely összetettebb enzimes mintaelőkészítéssel valósítható meg. Azonban ezen mintaelőkészítések alkalmazása során számolni kell azzal, hogy az emberek számára biológiailag nem hozzáférhető vitaminformák is felszabadulnak [NDAW, 2000, 2002].

A dúsított élelmiszerek teljes vitamintartalma a hozzáadott, illetve a természetes vitamintartalomból tevődik össze. Jelen fejezetben az általam B-vitaminokra is kiterjesztett metafoszforsavas mintaelőkészítést a B-vitaminok európai szabvány szerinti meghatározásával hasonlítom össze, annak érdekében, hogy információt nyerjek arról, hogy a metafoszforsavas extrakcióval a dúsított élelmiszerek teljes vitamintartalmának hány százaléka nyerhető ki

Az élelmiszerek B-vitamin-tartalmának meghatározására vonatkozó, HPLC módszert alkalmazó európai szabvány csak a B₁-, B₂-, és B₆-vitaminok esetében áll rendelkezésünkre [MSZ EN 14122:2006; MSZ EN 14152:2004; MSZ EN 14663:2006]. Mindhárom szabvány az élelmiszerek összes B₁-, B₂-, illetve B₆-vitamin-tartalmára vonatkozik. A B₃-, B₅- és a B₉-vitaminok meghatározásának szabványos módszere mikrobiológiai eljárásen alapul, így ezen vitaminok esetében az összehasonlító vizsgálathoz nem állt rendelkezésemre szabványos HPLC módszer.

A B₃-vitamin esetén a nemzetközi irodalomban publikált módszereket alapul véve [BALL, 2006; NDAW, 2002] az összniacin-tartalom egy egyszerű savas hidrolízissel felszabadítható, és mivel a B₁-, B₂- és B₆-vitaminok szabvány által előírt extrakciója tartalmaz savas hidrolízist, ezért mindhárom módszer biztosítja az összniacin-tartalom felszabadulását is.

A B₅- és a B₉-vitaminok mintaelőkészítése, illetve a HPLC technikán alapuló meghatározására a nemzetközi irodalomban is még vitatott. Így ezen két vitamin esetében, doktori munkám során nem volt módom a teljes vitamintartalomra vonatkozó összehasonlító vizsgálat elvégzésére.

Az összehasonlító vizsgálat során a három európai szabvány által javasolt mintaelőkészítést használtam föl, de az egyes vitaminok, illetve azok vitamereinek együttes meghatározása érdekében a szabványok által javasolt HPLC módszereket elhagyva egy új kromatográfiás módszert dolgoztam ki.

6.5.1 A vizsgált analit készlet

A B₁- és a B₂-vitaminok szabvány által előírt extrakciója azonos lépésekből áll, így mintaelőkészítésük összevonható. Ebből kifolyólag az összehasonlító vizsgálat során a metafoszforsavas extrakciót [EN 14130:2003] két különböző enzimes mintaelőkészítéssel [MSZ EN 14152:2004; MSZ EN 14663:2006] vettem össze a négy vizsgált vitaminra vonatkozóan (B₁, B₂, B₃, B₆).

A B-vitaminok szabványos módszerei két fő lépésből állnak, úgymint savas hidrolízisből, mely a fehérjék denaturálódását és a vitaminok fehérjéhez kötött formáinak felszabadulását szolgálja, valamint enzimkezelésből. A B₁- és a B₂-vitaminoknál az enzimkezelés a vitamerek defoszforilálását szolgálja, míg B₆-vitamin esetében ez egy β -glükozidázos kezeléssel is kiegészül a glükozilált formák felszabadítása céljából. Mindkét mintaelőkészítést követően mind a négy vizsgált vitamin szabad formáiban lesz jelen a mintában, úgymint: tiamin (B₁), riboflavin (B₂), nikotinsav (NS), nikotinamid (NA), piridoxin (PN), piridoxamin (PM) és piridoxal (PL).

Így a vizsgált analit készletet ez a hét komponens, valamint a B₁-, B₂- és B₆-vitaminok egy-egy foszforilált formája alkotja. A foszforilált formák vizsgálata a defoszforiláló enzim optimális működésének ellenőrzése céljából szükségesek. A foszforilált formák eltűnése a kromatogramról jelzi az enzim megfelelő működését. Az általam választott három foszforilált forma a tiamin-monofoszfát (TMP), a riboflavin-5'-foszfát (FMN) valamint a piridoxal-5'-foszfát (PLP).

6.5.2 Komponensfüggő paraméterek optimalása

Az eddigiekhez hasonlóan az újonnan összeállított analit készlet meghatározását RP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS kapcsolt rendszeren végeztem.

Az elválasztás kidolgozását megelőzően a 6.4.2.1. fejezetben leírtak szerint optimaltam az egyes komponensek ESI-MS/MS detektálásához szükséges komponensfüggő paramétereit, melyeket a **19. táblázatban** foglaltam össze. A riboflavin-5'-foszfát ESI negatív, a többi

vizsgált molekula ESI pozitív módban ionizálódott jobban. A riboflavin-5'-foszfát egy hidrogén leadásával, a többi komponens egy proton felvételével ionizálódik $[M-H]^-$, illetve $[M+H]^+$ anyaiionokat képezve.

19. táblázat A vizsgált vízben oldódó vitaminok anyaiion/termékion átmenetei, valamint, meghatározásukhoz szükséges komponens függő paraméterek optimális értékei

<i>Komponensek</i>	<i>Átmenetek</i>	<i>DP</i> (V)	<i>EP</i> (V)	<i>CEP</i> (eV)	<i>CE</i> (V)	<i>CXP</i> (V)
Piridoxal (PL)	168/150	26	3,5	10	15	4
	168/122	26	3,5	10	27	4
Piridoxamin (PM)	169/152	26	4	10	15	4
	169/134	26	4	10	29	4
Tiamin-monofoszfát (TMP)	345/122	26	4,5	16	23	4
	345/224	26	4,5	16	19	6
Riboflavin -5'-foszfát (FMN)	455/97	-50	-8,5	-28	-36	0
	455/199	-50	-8,5	-28	-24	0
Piridoxal-5'-foszfát (PLP)	248/150	36	6,5	14	21	4
	248/94	36	6,5	14	37	4

6.5.3 Kromatográfiás elválasztás kidolgozása

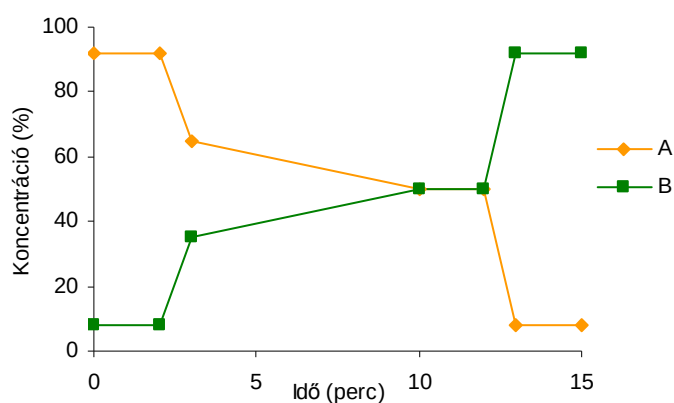
A tíz komponens kromatográfiás elválasztásának kidolgozásához az 6.4.2.2.1. fejezetben bemutatott gradiens elúciós módszert vettem alapul, így állófázisként a Restek Ultra Aqueous C₁₈-as (3,2 x 150 mm, 5 µm) kromatográfiás oszlopot, mozgófázisként 0,1 % hangyasav tartalmú metanolt és vizet alkalmaztam. A kezdeti eluens szerves oldószer tartalmának minimális szintre csökkentése (0,1%) ellenére a piridoxamin és a tiamin-monofoszfát a holtterfoggattal eluálódott.

A fronton eluálódó komponensek nagyobb visszatartása érdekében ionpároképző használata vált szükségessé. Irodalmi adatokra támaszkodva ionpároképzőként az előzőekben alkalmazott TFA helyett heptafluoro-vaajsavat (HFBA) választottam, ugyanis amellett, hogy illékonyabb, kisebb mértékben okoz zavart az ionizációban, így a TFA-hoz képest a HFBA használata kedvezőbb LC-MS/MS alkalmazás esetén [CHEN, 2006; MIDTTUN, 2005].

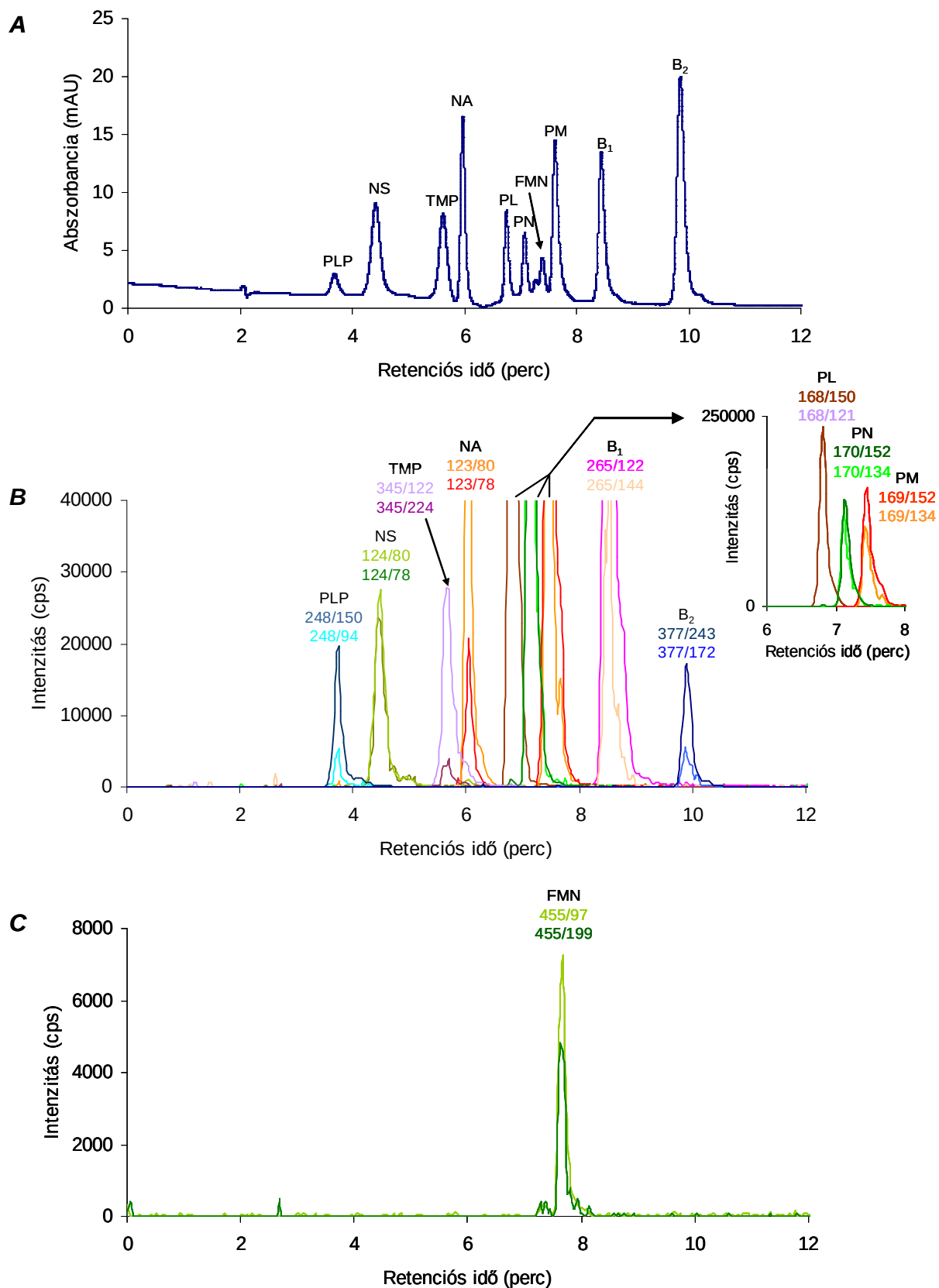
A továbbiakban a mozgófázisok HFBA tartalmának optimalizálását végeztem el. Ennek érdekében 0,03, 0,05 és 0,07 % (v/v) HFBA tartalmú vizes és metanolos eluenseket készítettem és próbáltam ki. A három különböző koncentrációjú eluens közül a 0,05 és 0,07 % (v/v) HFBA

tartalmú oldatok biztosították mind a 10 komponens megfelelő visszatartását. Mivel a magasabb 0,07% (v/v) HFBA tartalom nem eredményezett jelentősebb javulást, ezért a továbbiakban az elválasztás optimalizálásához a 0,05 % HFBA tartalmú oldatokat használtam.

A csúcsalakok javítása érdekében a metanol helyett egy erősebb oldószert, az acetonitrilt is kipróbáltam, de mivel nem eredményezett jelentős változást, így szerves eluensként a metanol mellett maradtam. Számos változtatást követően a **27. ábrán** bemutatott gradiens elúciós program 500 µl/perc áramlási sebesség mellett 10 perc alatt biztosította a tíz vizsgált komponens megfelelő visszatartását, illetve elválasztását (**28. ábra**).



27. ábra Vízben oldódó vitaminok elválasztására kidolgozott gradiens elúciós program
(A: 0,05 % HFBA/ víz; B: 0,05 % HFBA/metanol, áramlási sebesség:500 µl/perc)



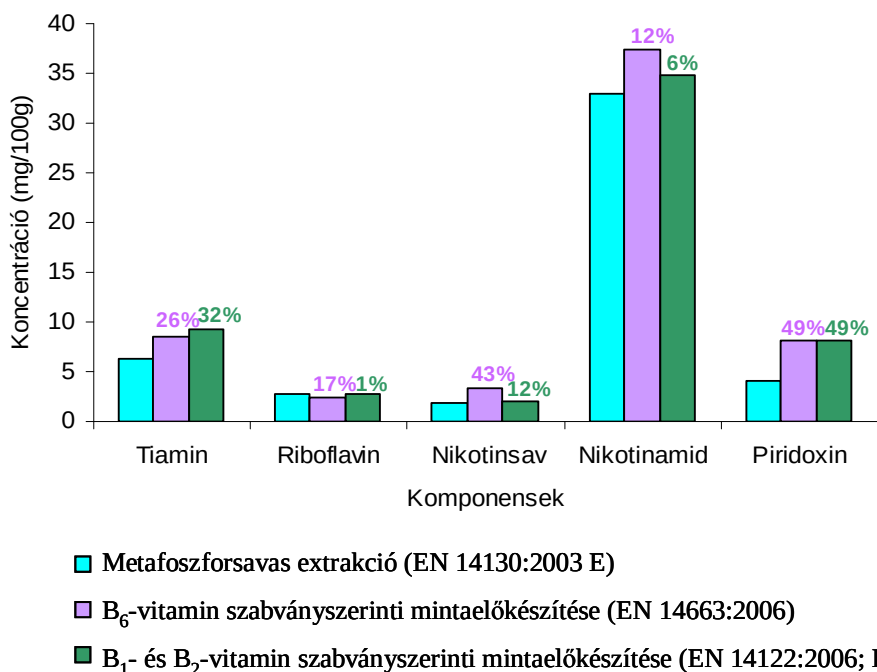
28. ábra Vízben oldódó vitaminok standardolatának (5ppm) UV detektorral 266 nm-en (A), valamint tömegspektrométerrel MRM + (B) és MRM – (C) módban felvett kromatogramjai

6.5.4 Az összehasonlító vizsgálat eredményei

A kromatográfiás módszer kidolgozását követően elvégeztem a három mintaelőkészítés [EN 14130:2003; MSZ EN 14152:2004; MSZ EN 14663:2006] összehasonlító vizsgálatát, melynek eredményeit az eddigiekben is vizsgált teljes kiőrlésű reggeli gabonapehely példáján mutatom be. A szükséges enzimek működésének ellenőrzését követően, a szabványok által leírt módon végrehajtottam a mintaelőkészítést, melynek lépéseit vázlatosan az „Anyag és módszer” fejezetben is feltűntettem.

Az összehasonlító vizsgálatot a nagyobb szelektivitású tömegspektrométerrel felvett adatok felhasználásával végeztem. A gabonapehely vitamintartalmát mindhárom extrakció esetén standard addíciós technikával határoztam meg az esetlegesen fellépő mátrixhatás kiküszöbölése érdekében.

A gabonapehely három különböző mintaelőkészítéssel kinyert B₁-, B₂-, B₃- és B₆-vitamintartalmát mg/100g-ban kifejezve grafikus módon ábrázoltam (29. ábra). A 29. ábrán feltűntettem még a B₁ (B₂)- és a B₆-vitamin szabványszerinti mintaelőkészítés eredményeinek a metafoszforsavas extrakcióval kapott értékekhez viszonyított eltérését is abszolút értékben, százalékban kifejezve.



29. ábra Vitaminokkal dúsított reggeli gabonapehely három különböző mintaelőkészítési eljárással kinyert vízben oldódó vitamin tartalma, az enzimes mintaelőkészítések metafoszforsavas extrakcióhoz képesti eltéréseinek százalékos értékeivel feltűntetve

A mintaelőkészítéseket azonosnak tekintettem abban az esetben, ha a köztük fennálló eltérés 20% alatt marad, mivel ekkora mértékű eltérés az összetett mintaelőkészítés, illetve az injektálás szórásának tulajdonítható.

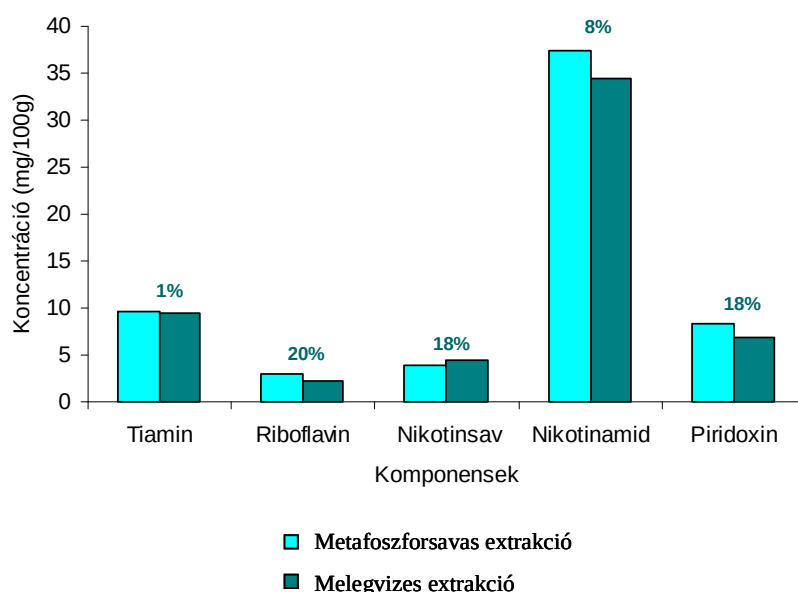
A riboflavin és a nikotinamid esetében a teljes, illetve a metafoszforsavval kinyert vitamintartalom közötti különbség 20%-nál kisebb. Ez egyrészt tükrözi, a gabonamagvak igen alacsony természetes riboflavin-tartalmát, másrészt, hogy a gabonapehely nikotinamid-tartalma kizárólag a dúsításból származhat. A gabonamagvakban a B₃-vitamin nikotinsavként található meg, melynek 85-90%-a biológiailag nem hozzáférhető glikozid formában van jelen. Az általánosan alkalmazott savas hidrolízis a kötött nikotinsavból többet szabadít fel, mint az élőszervezetben ezt a célt szolgáló glikohidroláz enzimek [NDAW, 2002]. A kémiai kötött formák felszabadulásával magyarázható a 43%-os eltérés a metafoszforsavas extrakció és a B₆-vitamin szabványszerinti mintaelőkészítése között.

A tiamin esetében mindkét enzimes mintaelőkészítés növekedést eredményezett a metafoszforsavas extrakcióhoz képest, ami a defoszforiláló enzimek hatására felszabaduló tiamin-difoszfátnak tulajdonítható. A természetes B₁-vitaminban gazdag teljes kiőrlésű gabona termékek ugyanis (szabad) tiamin mellett tiamin-difoszfátot is tartalmaznak.

A B₆-vitamin esetében mindkét enzimes mintaelőkészítés azonos mértékű növekedést eredményezett a metafoszforsavas extrakcióhoz képest, ami szintén a foszforilált formák felszabadulásával magyarázható. Felmerülhet az a kérdés, hogy ha a két különböző enzimes mintaelőkészítéssel azonos eredmény érhető el, akkor mi indokolja a B₆-vitamin szabványos extrakciójának különbözőségét. Ennek magyarázata a következőkben rejlik: A kukorica kivételével a növények B₆-vitamin-tartalmát piridoxin és piridoxamin alkotja. A piridoxin egy része a növényi szövetekben gyakran biológiailag nem felvehető PN-glükozidként van jelen, ezért írja elő a szabvány a defoszforiláló enzim mellett a β -glükozidáz használatát is. Jelen esetben azonban a β -glükozidáz használata nem okozott változást a kizárólag defoszforiláló enzimet alkalmazó mintaelőkészítéshez képest. Így elmondható, hogy a vizsgált gabonapehely nem tartalmazott PN-glükozidot. A piridoxamin kimutatási határ alatti koncentrációban volt, ezért a vizsgált gabonapehely B₆-vitamin-tartalmát kizárólag szabad és foszforilált piridoxin alkotta. A defoszforiláló enzim hatására közel 50%-al nőtt a piridoxin mennyisége, ami azt mutatja, hogy a vizsgált gabonapehely természetes B₆-vitamin-tartalmának jelentős része foszforilált formában volt jelen.

A következőkben arra kerestem a választ, hogy a metafoszforsavas extrakció a szabad vitaminformákon túl eredményezheti-e a mátrixhoz kötött formák bizonyos mértékű felszabadulását.

Ennek érdekében a metafoszforsavas extrakciót melegvizes kivonással hasonlítottam össze (1 g gabonapehely őrlemény / 10 ml 40°C-os víz, 10 perc ultrahangos fürdő, szűrés, centrifugálás), mely a nemzetközi gyakorlat szerint kizárólag csak a szabad formákat vonja ki a mintából. A két extrakciós technikával kapott eredményeket, illetve azok közötti különbségeket a **30. ábra** szemlélteti.



30. ábra Vitaminokkal dúsított reggeli gabonapehely metafoszforsavas, illetve melegvizes extrakcióval kinyert vízben oldódó vitamintartalma, a két extrakciós technika közötti eltérés százalékos értékének feltüntetésével

A kapott eredmények alapján minden vizsgált vitamin esetén a vizes és a metafoszforsavas extrakció közötti különbség elhanyagolhatónak ($\leq 20\%$) tekinthető.

Következtetésképpen elmondható, hogy a metafoszforsavas extrakcióval kinyerhető vitaminmennyiséget kizárólag a szabad vitaminformák alkotják. Mivel dúsított élelmiszerek esetében a szabad vitaminformákat főként a hozzáadott vitaminok alkotják, ezért ezen termékek esetében a metafoszforsavas extrakcióval kinyerhető vitaminmennyiség a dúsítás mértékét jellemzi.

Tehát dúsított élelmiszerek hozzáadott B- és C-vitamin-tartalma egy menetben meghatározható a C-vitamin stabilitását biztosító metafoszforsavas extrakció segítségével.

7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam az élelmiszerek dúsításához legelterjedtebben alkalmazott vízben oldódó vitamininformák (C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉) egy menetben történő mérésére alkalmas analitikai módszercsaládot. Ennek során a vitaminok eltérő sav-bázis jellemzőiből eredő kromatográfiás problémákat több, eltérő analitikai megközelítést alkalmazó alternatív megoldással hidaltam át.

- Kidolgoztam a fent említett komponensek:
 - o UV-VIS detektálással egy és több hullámhosszon, valamint
 - o UV-VIS-ESI-MS/MS detektálási rendszerrel megvalósított,
 - o ionpároképzővel (trifluoro ecetsav),
 - o ionpároképző nélkül, semleges kémhatáson történő, valamint
 - o ionpároképző nélküli ionvisszaszorításos fordított fázisú HPLC módszereit.
- Bizonyítottam, hogy az UV detektálást alkalmazó kromatográfiás módszernél B₂-vitamin meghatározásakor a 448 nm hullámhosszon történő detektálás, a nagyobb szelektivitás miatt jobb kimutathatóságot eredményez, mint a 270 nm hullámhosszon található abszorbanancia maximumon történő mérés esetén.
- Igazoltam, hogy vitaminkészítmények B₅-vitamin-tartalma – még karakterisztikus kromofor csoport hiányának ellenére is – meghatározható 200 nm hullámhosszt alkalmazó UV detektálással, 50mM foszfát-puffer/MeOH mozgófázis összetétel esetében.
- Bizonyítottam, hogy a trifluoro-ecetsav ionpároképző alkalmazása az egyik megoldását jelentheti a vitaminok eltérő sav-bázis jellemzőiből eredő kromatográfiás problémák áthidalására.

2. Kidolgoztam egy ionpárképzőt alkalmazó fordított fázisú HPLC elválasztást, valamint ehhez hangolt ESI-MS/MS detektálási módszert, amely alkalmas a vízben oldódó vitaminok, egyes vitamerek valamint jellemző származékaik egy menetben történő vizsgálatára. Igazoltam, hogy a módszer alkalmas élelmiszerminták természetes vitamintartalmának meghatározását célzó mintaelőkészítési eljárások megfelelőségének ellenőrzésére.

- Igazoltam, hogy 0,05 % (v/v) heptafluoro-vajsav ionpárképzőt alkalmazva lehetőség nyílik a tiamin (B₁), a tiamin-monofoszfát (TMP), riboflavin-5'-monofoszfát (FMN), a nikotinamid (NA), a nikotinsav (NS), a piridoxin (B₆), piridoxamin (PM), a piridoxal (PL) és a piridoxál-5'-foszfát (PLP) elválasztására.

3. Kidolgoztam egy vitaminkészítmények és élelmiszerek vízben oldódó vitaminjainak vizsgálatára alkalmas mintaelőkészítési módszert és valódi mintákon alkalmazva igazoltam annak alkalmasságát teljes C-vitamin, valamint a szabad B₁-, B₂-, B₃-, B₅-, B₆-, B₉-vitaminok mennyiségi meghatározására.

- Visszanyerési kísérletekkel igazoltam, hogy a fent említett vitaminok minőségi és mennyiségi integritása nem sérül az alkalmazott mintaelőkészítési eljárás során.
- Kidolgoztam egy új hatásfok-vizsgálati eljárást, melynek alkalmazásával bizonyítottam, hogy a metafoszforsavas extrakciós körülmények (kivonószer/minta arány, extrakciós idő) megfelelőnek bizonyultak az extrakció maximális hatásfokának eléréséhez.
- Bizonyítottam, hogy az eredetileg C-vitamin kivonására kidolgozott metafoszforsavas extrakciós eljárás B-vitaminoknál azonos eredményekre vezet, mint az általánosan elterjedt melegvizes extrakció.

4. A kidolgozott vitamin vizsgálati módszerek esetén összehasonlító kísérleteket végeztem a munkám során alkalmazott két detektálási rendszerrel (ESI-MS/MS és UV-VIS), melynek során:

- Megállapítottam, hogy a B₅-vitamin meghatározása a kidolgozott kromatográfiás eljárásokkal UV-VIS detektálással valódi mintákból nem kivitelezhető, ugyanakkor az eltérő működési elv miatt ez ESI-MS/MS rendszerrel azonos kromatográfiás körülmények között megoldható.

- Megállapítottam, hogy két detektálási mód közül B₁-vitamin esetén közel 15-ször, B₃-vitamerek esetében több mint 17-szer jobb kimutatási határ érhető el ESI-MS/MS detektálással, míg C-vitamin esetén UV detektálással lehetett több mint egy nagyságrenddel jobb kimutatási határt elérni. A B₂- és a B₉-vitaminok kimutatási határa a két detektálási móddal nem mutat lényeges különbséget.
- Megállapítottam, hogy az ESI-MS/MS detektálási rendszer érzékenyebben reagál a mátrix jelenlétére, mint az UV detektor, ezért a vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása esetén ESI-MS/MS alkalmazása mellett mátrixhoz illesztett kalibráció készítése szükséges a mátrix torzító hatásának kivédése érdekében.
- Megállapítottam, hogy az alkalmazott módszerekkel, a vizsgált komponensek esetén UV detektálással jobb ismételhetőség érhető el, mint ESI-MS/MS detektálási rendszerrel.
- A nikotinsav és a nikotinamid esetében igazoltam, hogy ESI-MS/MS detektálási rendszer alkalmazásakor szükséges a két vitamert megfelelő felbontású kromatográfiás elválasztása, a közel azonos tömegű és szerkezetű molekulák esetén megjelenő azonos-átmenetek okozta zavarás miatt.

5. Kidolgoztam egy olyan analitikai eljárást, amely alkalmas gabona alapú termékek felvehető B₁-, B₂- és B₆-vitamin-tartalmának egy menetben történő HPLC-ESI-MS/MS rendszerrel végzett kvantitatív meghatározására. Ennek során:

- Bizonyítottam, hogy a korábban kidolgozott B₁-, B₂-, és B₆-vitaminok egyenkénti meghatározására szolgáló mintaelőkészítési módszerek egyesíthetők, és ezáltal az általam kidolgozott HPLC-ESI-MS/MS analitikai módszert alkalmazva a komponensek biológiailag hozzáférhető hányada a mintából egy menetben meghatározható.
- A módszer alkalmasságát igazoltam gabona alapú termék felvehető B₁-vitamin, azaz tiamin és foszfátjai, felvehető B₂-vitamin, azaz a riboflavin és foszfátjai, valamint a felvehető B₆-vitamin formák (piridoxin, piridoxal és piridoxamin) és foszfátjai meghatározására.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A helytelen, egyoldalú táplálkozás világszerte komoly egészségügyi problémák előidézője. Számos, sok esetben halálos kimenetelű betegség kialakulásáért a hiányos táplálkozásból fakadó elégtelen vitaminbevitel okolható. Ezen betegségek megelőzésének a kulcsa az emberek étkezési szokásának megváltoztatásában, helyes irányba terelésében rejlik. Ennek megvalósítása azonban hosszadalmas folyamat. Egy köztes megoldást jelenthet olyan készítmények, termékek előállítása, melyek hozzájárulnak az emberek jó egészségi állapotának fenntartásához. Ezt felismerve különböző vitaminkészítmények, étrend-kiegészítők, dúsított élelmiszerek egyre bővülő skálája kerül kereskedelmi forgalomba. Ezen termékek tömeges megjelenése szigorú minőségbiztosítást követel meg a fogyasztók védelme érdekében. A vízben oldódó vitaminok mérésének hivatalosan elfogadott módszerei azonban gyakran bonyolult, időigényes és sok esetben pontatlan már elavult technikákon alapulnak, melyek nem teszik lehetővé több komponens egyidejű meghatározását. Ebből kifolyólag egyre nagyobb az igény, főként minőségbiztosítási célból, megbízható, időtakarékos, költséghatékony, korszerű, többkomponenses analitikai módszerek iránt.

A fent megfogalmazottak tükrében doktori munkám során vízben oldódó vitaminok (C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉) egyidejű folyadékkromatográfiás meghatározására fókuszáltam. A vitaminok eltérő sav-bázis jellemzőiből eredő kromatográfiás akadályokat több, eltérő analitikai megközelítést alkalmazó alternatív megoldással hidaltam át. Ennek eredményeképpen egy olyan UV-VIS, illetve UV-VIS-ESI-MS/MS detektálási rendszereket egyaránt alkalmazó analitikai módszer családot dolgoztam ki, mely lehetővé teszi a vízben oldódó vitaminok dúsításhoz legelterjedtebben használt formáinak egy menetben történő meghatározását.

A többkomponenses módszerek egyik kulcslépése a mintaelőkészítés, mely biztosítja a vitaminok egyidejű, veszteség nélküli kinyerését a vizsgálandó termékből. Az extrakciónak, céljától függően, két megközelítése létezik. Az egyik a **hozzáadott** (szabad formák), a másik a **teljes** (hozzáadott + természetes) vízben oldódó vitamintartalom kinyerésére fókuszál.

A **hozzáadott** vitamintartalom kinyerés céljából egyszerűbb mintaelőkészítés is elegendő, mivel a hozzáadott komponensek nem kötődnek szorosan a mátrixhoz. Doktori munkám során a különböző vitaminkészítmények és dúsított élelmiszerek gyors, rutinszerű vizsgálata érdekében az eredetileg C-vitamin kinyerését szolgáló metafoszforsavas mintaelőkészítést továbbfejlesztettem, és valódi mintákon sikeresen alkalmazva igazoltam alkalmasságát teljes C-vitamin, valamint a szabad B₁-, B₂-, B₃-, B₅-, B₆-, B₉-vitaminok mennyiségi meghatározására.

Ezzel szemben a **teljes** vitamintartalom meghatározása esetén a kötésben lévő vitaminokat is fel kell szabadítani. Ez a legtöbb esetben több lépcsős (savas hidrolízis, enzimatisz feltárás) mintaelőkészítési eljárást igényel. Az ilyen összetett mintaelőkészítési folyamatok sok hibaforrást rejtnek magukban (pl.: elégtelen enzimaktivitás), ezért ellenőrzésük elengedhetetlen. Ennek érdekében kidolgoztam egy ionpárpézpzt alkalmazó fordított fáziszú HPLC elválasztást, valamint ehhez hangolt ESI-MS/MS detektálási módszert, amely alkalmas a vízben oldódó vitaminok, egyes vitamerek, valamint jellemző származékaik egy menetben történő vizsgálatára. Igazoltam, hogy a módszer alkalmas élelmiszerminták természetes vitamintartalmának meghatározását célzó mintaelőkészítési eljárások megfelelőségének ellenőrzésére.

A hozzáadott és teljes vitamintartalom vizsgálaton túl felmerülhet az igény az élelmiszerek **biológiaiilag felvehető** vitamintartalmának meghatározása iránt is. Ezért kidolgoztam egy olyan analitikai eljárást, amely alkalmas gabona alapú termékek felvehető B₁-, B₂- és B₆- vitamintartalmának egy menetben történő HPLC-ESI-MS/MS rendszerrel végzett kvantitatív meghatározására. Bebizonyítottam, hogy a korábban kidolgozott B₁-, B₂-, és B₆-vitaminok egyenkénti meghatározására szolgáló mintaelőkészítési módszerek egyesíthetők, és ezáltal az általam kidolgozott HPLC-ESI-MS/MS analitikai módszert alkalmazva e komponensek biológiaiilag hozzáférhető hányada a mintából egy menetben meghatározható.

Az élelmiszerek vitamintartalmának meghatározására irányuló analitikai kérdésfeltevés sok esetben nem egyértelmű. Ugyanakkor a fent kidolgozott módszerek rugalmasan és költséghatékonyan teremtenek lehetőséget a változó megrendelői igények széles körű kielégítésére. Ezt bizonyítja, hogy az általam kidolgozott és validált módszereket a Nemzeti Akkreditáló Testület (NAT) elfogadta és 2008. óta egy akkreditált analitikai laboratórium élelmiszervizsgálatra irányuló profiljának részeként szolgálja ki a különböző igényű megrendelőket.

9 Summary

Micronutrient malnutrition is widespread throughout the world, with important health and economic consequences. Vitamin deficiency caused mainly by inappropriate dietary habits is responsible for a wide range of serious, sometimes mortal diseases. The best way of preventing these diseases could be the consumption of a balanced diet that is adequate in every nutrient. However, factors affecting food choice are complex, and therefore programmes to effect changes in dietary patterns may take a relatively long time. Products with health-promoting property can be a tool in helping the population to meet its dietary requirements. Because of this reason an expanding scale of various dietary supplements and fortified food products is commercially available. The growing number of these products requires reliable quality control to insure the protection of consumers. However the official analytical methods of water-soluble vitamins in most cases are based on outdated procedures, which are complicated, time-consuming, inaccurate and do not allow the simultaneous determination of the vitamins. For these reasons there is an increasing need for the development of validated, accurate, time-saving, low cost, modern, multicomponent methods.

In the light of the aforementioned facts my thesis focuses on the simultaneous determination of water-soluble vitamins (C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉) by liquid chromatography. I offered alternative solutions using different analytical approaches to overcome the chromatographic difficulties caused by the chemical diversity of water-soluble vitamins. As a result I developed a group of analytical methods using UV-VIS and UV-VIS-ESI-MS/MS systems allowing the simultaneous determination of the most frequently applied forms of water-soluble vitamins.

One of the key steps of the multivitamin methods is sample preparations, which is able to extract several vitamins simultaneously from the particular matrix. Depending on the aim of the extraction two different approaches are involved. One of them serves the extraction of fortified (free forms) levels of water-soluble vitamins, while the other provides the extraction of the total (fortified and endogenous forms) water-soluble vitamin content of the sample. For the first approach a simpler extraction method could be fit for purpose, since the added vitamins are not strongly embedded in the matrix.

In the frame of my Ph.D. study I have optimized a sample preparation method using metaphosphoric acid, originally developed for the determination of vitamin C. to gain a routine technique for the examination of the several vitamins in supplemented products. By means of applying this optimized extraction procedure on fortified food products I proved its efficiency for

the quantitative determination of total vitamin C and the free forms of vitamin B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉.

Contrarily, in the case of the determination of the total vitamin content the bound vitamin forms have also to be released from the matrix, which needs complex sample preparation (acid hydrolysis, enzymatic treatment). Such complex extraction procedures include many possible sources of errors (e.g.: inadequate enzyme activity), therefore the control of them is required. This led me to develop an ion-pair, reversed-phase HPLC separation method coupled with ESI-MS/MS detection, which allows of the simultaneous determination of water-soluble vitamins and some vitamers. I have proved the efficiency of this method for controlling sample preparation used for the extraction of total vitamin content of foodstuffs.

Beyond the examination of the added and the total vitamin contents, the bioavailable vitamin content of the samples can also be the object of interest. Therefore, I have developed an analytical method using HPLC-ESI-MS/MS system for the quantitative determination of the bioavailable B₁, B₂, B₆ vitamin content of cereal based products. I have proved that the sample preparation procedures serving the single examination of B₁, B₂, B₆ vitamins could be merged. Thus the bioavailable fraction of the aforementioned vitamins can be simultaneously determined in the samples using this combined extraction procedure followed by the developed HPLC-ESI-MS/MS method.

The questions about the vitamin contents of foodstuffs are quite often ambiguous. At the same time the developed methods can satisfy all demands of the customers in a flexible way. As a proof of this the developed methods became parts of the scope of a laboratory accredited against ISO 17025 by National Accreditation Board in 2008.

10 IRODALOMJEGYZÉK

- 1925/2006/EK. (2006) Az Európai Parlament és Tanács rendelete a vitaminok, ásványi anyagok és bizonyos egyéb anyagok élelmiszerekhez történő hozzáadásáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja*, L404/26-38
- ACC/SCN, 2000 Fourth report on the world nutrition situation, geneva: WHO.
- ADDO, C., és AUGUSTIN, J. (1988): Changes in the vitamin-B₆ content in potatoes during storage. *Journal of Food Science*, 53 (3) 749-752. p.
- ALBALAHURTADO, S., VECIANANOGUES, M. T., IZQUIERDOPULIDO, M., és MARINEFONT, A. (1997): Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778 (1-2) 247-253. p.
- ALLEN, L., BENOIST, B. D., DARY, O., és HURRELL, R. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients, WHO Press, Geneva.
- AMIN, M., és REUSCH, J. (1987): High-performance liquid-chromatography of water-soluble vitamins 2. Simultaneous determinations of vitamin-B₁ vitamin-B₂, vitamin-B₆, and vitamin-B₁₂ in pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatography*, 390 (2) 448-453. p.
- ANG, C. Y. W., CENCIARELLI, M., és EITENMILLER, R. R. (1988): A simple liquid-chromatographic method for determination of B₆ vitamers in raw and cooked chicken. *Journal of Food Science*, 53 (2) 371-375. p.
- AOAC 942.23:2000. Thiamin (vitamin B₁) in foods. Fluorometric method.
- AOAC 967.21:1968. Ascorbic acid in vitamin preparations and juices. 2,6-dichloroindophenol titrimetric method.
- AOAC 967.22:2000. Vitamin C (total) in vitamin preparations. Microfluorometric method.
- AOAC 970.65:2000. Riboflavin (vitamin B₂) in foods and vitamin preparations.
- ARANDA, M., és MORLOCK, G. (2006): Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1131 (1-2) 253-260. p.
- ARELLA, F., LAHELY, S., BOURGUIGNON, J. B., és HASSELMANN, C. (1996): Liquid chromatographic determination of vitamins B₁ and B₂ in foods. A collaborative study. *Food Chemistry*, 56 (1) 81-86. p.
- ARGOUEDELIS, C. J. (1997): Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of all seven vitamin B₆ related compounds. *Journal of Chromatography A*, 790 (1-2) 83-91. p.
- ASHOOR, S. H., KNOX, M. J., OLSEN, J. R., és DEGER, D. A. (1985): Improved liquid-chromatographic determination of riboflavin in milk and dairy-products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68 (4) 693-696. p.
- ASHOOR, S. H., SEPERICH, G. J., MONTE, W. C., és WELTY, J. (1983): HPLC determination of riboflavin in eggs and dairy-products. *Journal of Food Science*, 48 (1) 92-&. p.
- AYI, B. K., YUHAS, D. A., és DEANGELIS, N. J. (1986): Simultaneous determination of vitamin-B₂ (riboflavin) and vitamin-B₆ (pyridoxine) in infant formula products by reverse phase liquid-chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 69 (1) 56-59. p.

- BALL, G. F. M. (2006). Vitamins in foods, analysis, bioavailability, and stability, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- BARCLAY, D. (1998). Multiple fortification of beverages Food and nutrition bulletin, N. S. Scrimshaw, ed., United Nations University Press, Tokyo, 168-171.
- BARNA, E., és DWORSCHAK, E. "Determination of thiamine (vitamin-B₁) and riboflavin (vitamin-B₂) in meat and liver by high-performance liquid-chromatography." 359-363.
- BATIFOULIER, F., VERNY, M. A., BESSON, C., DEMIGNE, C., és REMESY, C. (2005): Determination of thiamine and its phosphate esters in rat tissues analyzed as thiochromes on a RP-amide C₁₆ column. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 816 (1-2) 67-72. p.
- BAUERNFEIND, J., és DERITTER, E. (1991). Foods considered for nutrient addition: Cereal grain products. Nutrient additions to food: Nutritional, technological and regulatory aspects, J. Bauernfeind and P. Lachance, eds., Food and Nutrition Press, Trumbull, 143–209.
- BECK, W. S. (2001). Cobalamin (vitamin B₁₂) Handbook of vitamins, R. B. Rucker, J. W. Suttien, D. B. McCormick, and L. J. Machlin, eds., Marcel Dekker, New York, 469.
- BEHRENS, W. A., és MADERE, R. (1987): A highly sensitive high-performance liquid-chromatography method for the estimation of ascorbic and dehydroascorbic acid in tissues, biological-fluids, and foods. *Analytical Biochemistry*, 165 (1) 102-107. p.
- BELITZ, H.-D., GROSCH, W., és SCHIEBERLE, P. (2004). Food chemistry, Springer, Berlin.
- BELZ, S., és NAU, H. (1998): Determination of folate patterns in mouse plasma, erythrocytes, and embryos by HPLC coupled with a microbiological assay. *Analytical Biochemistry*, 265 (1) 157-166. p.
- BERTRAIS, S., LUQUE, M. L. P., PREZIOSI, P., FIEUX, B., DE FLOT, M. T. és munkatársai. (2000): Contribution of ready-to-eat cereals to nutrition intakes in french adults and relations with corpulence. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44 (5-6) 249-255. p.
- BLAKE, C. J. (2007): Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: A review. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 389 (1) 63-76. p.
- BLUM, M. (1997). Nutriview, status paper: Food fortification, a key strategy to end micronutrient malnutrition, Vitamin Division, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel.
- BOGNÁR, A., és DAOOD, G. H. (2000): Simple in-line postcolumn oxidation and derivatization for the simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acids in foods. *Journal of chromatographic science*, 38 162-168. p.
- BOLLET, A. J. (1992): Politics and pellagra - the epidemic of pellagra in the united-states in the early 20th-century. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 65 (3) 211-221. p.
- BOWLEY, A. (2003). Nutriview, mandatory food enrichment, Roche Vitamins Europe Ltd, Nutriview Special Issue 1–12, Basel.
- BRAUSE, A. R., WOOLLARD, D. C., és INDYK, R. E. (2003): Determination of total vitamin C in fruit juices and related products by liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of Aoac International*, 86 (2) 367-374. p.
- BROUWER, V. D., STOROZHENKO, S., STEENE, J. C. V. D., WILLE, S. M. R., STOVE, C. P. és munkatársai. (2008): Optimisation and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for folates in rice. *Journal of Chromatography, A*, 1215 (1/2) 125-132. p.
- BRUSSAARD, J. H., LOWIK, M. R. H., VAN DEN BERG, H., BRANTS, H. A. M., és KISTEMAKER, C. (1997): Micronutrient status, with special reference to vitamin B₆. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51 S32-S38. p.
- BURINI, G. (2007): Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1154 (1-2) 97-102. p.

- CAMMACK, J., OKE, A., és ADAMS, R. N. (1991): Simultaneous high-performance liquid-chromatographic determination of ascorbic-acid and dehydroascorbic acid in biological samples. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 565 (1-2) 529-532. p.
- CANCALON, P. F. (2001): Routine analysis of ascorbic acid in citrus juice using capillary electrophoresis. *Journal of Aoac International*, 84 (3) 987-991. p.
- CATALDI, T. R. I., NARDIELLO, D., DE BENEDETTO, G. E., és BUFO, S. A. (2002): Optimizing separation conditions for riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide in capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 968 (1-2) 229-239. p.
- CHATZIMICHALAKIS, P. F., SAMANIDOU, V. F., VERPOORTE, R., és PAPADOYANNIS, I. N. (2004): Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, 27 (14) 1181-1188. p.
- CHEN, P., és WOLF, W. R. (2007): LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 387 (7) 2441-2448. p.
- CHEN, Z., CHEN, B., és YAO, S. Z. (2006): High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Analytica Chimica Acta*, 569 (1-2) 169-175. p.
- CHENG, F. C., YANG, D. Y., WU, T. F., és CHEN, S. H. (1999): Rapid on-line microdialysis hyphenated technique for the dynamic monitoring of extracellular pyruvate, lactic acid and ascorbic acid during cerebral ischemia. *Journal of Chromatography B*, 723 (1-2) 31-38. p.
- CHO, C. M., KO, J. H., és CHEONG, W. J. (2000): Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after eating an overdose of vitamin pills by a HPLC method coupled with a solid phase extraction. *Talanta*, 51 (4) 799-806. p.
- CHOI, S. W., és MASON, J. B. (2002): Folate status: Effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *Journal Of Nutrition*, 132 (8) 2413S-2418S. p.
- CIANCAGLINI, P., SANTOS, H. L., DAGHASTANLI, K. R. P., és THEDEI, G. (2001): Using a classical method of vitamin C quantification as a tool for discussion of its role in the body. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 29 (3) 110-114. p.
- DANSE, B., ROBERFROID, M., BRESLIN, L., és CONTOR, L. (1998): Functional food science in europe - foreword. *British Journal of Nutrition*, 80 S3-S4. p.
- DAOOD, G. H., BIACS, A. P., MOHA, A. D., és HAJDU, F. (1994): Ion-pair chromatography and photodiode-array detection of vitamin C and organic acids. *Journal of chromatographic science*, 32 481-487. p.
- DAOOD, G. H., VINKLER, M., MÁRKUS, F., HEBISHI, E. A., és BIACS, A. P. (1996): Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food chemistry*, 55 (4) 365-372. p.
- DOHERTY, R. F., és BEECHER, G. R. (2003): A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2) 354-361. p.
- DRI, 2004. Dietary reference intakes (DRIS): Recommended intakes for individuals, vitamins, food and nutrition board, institute of medicine, national academies, www.nap.edu.
- EKANAYAKE, A., és NELSON, P. E. (1988): Applicability of an invitro method for the estimation of vitamin-B₆ biological availability. *Journal of Micronutrient Analysis*, 4 (1) 1-15. p.
- EKINCI, R., és KADAKAL, C. (2005): Determination of seven water-soluble vitamins in tarhana, a traditional turkish cereal food, by high-performance liquid chromatography. *Acta Chromatographica*, 15 289-297. p.

- EN 14130:2003. Foodstuff-determination of vitamin C by HPLC.
- EN 14164:2002. Foodstuffs. Determination of vitamin B₆ by HPLC.
- ESSAMA-TJANI, J. C., GUILLAND, J. C., DE COURCY, G. P., FUCHS, F., és RICHARD, D. (2000): Folate status worsens in recently institutionalized elderly people without evidence of functional deterioration. *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (3) 392-404. p.
- ESTEVE, M. J., FARRE, R., FRIGOLA, A., és GARCIA-CANTABELLA, J. M. (1998): Determination of vitaminB₆ (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) in pork meat and pork meat products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 795 (2) 383-387. p.
- FARBER, C. M., KANENGISER, S., STAHL, R., LIEBES, L., és SILBER, R. (1983): A specific high-performance liquid-chromatography assay for dehydroascorbic acid shows an increased content in cll lymphocytes. *Analytical Biochemistry*, 134 (2) 355-360. p.
- FEKETE, J. (2003). Folyadékkromatográfia, Budapest.
- FELLMAN, J. K., ARTZ, W. E., TASSINARI, P. D., COLE, C. L., és AUGUSTIN, J. (1982): Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Food Science*, 47 (6) 2048-&. p.
- FERNANDO, S. M., és MURPHY, P. A. (1990): HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (1) 163-167. p.
- FINGLAS, P. M., és FAULKS, R. M. (1984): The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. *Food Chemistry*, 15 (1) 37-44. p.
- FLETCHER, R. J., BELL, I. P., és LAMBERT, J. P. (2004): Public health aspects of food fortification: A question of balance. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63 (4) 605-614. p.
- FLYNN, A., MOREIRAS, O., STEHLE, P., FLETCHER, R. J., MULLER, D. J. G. és munkatársai. (2003): Vitamins and minerals: A model for safe addition to foods. *European Journal Of Nutrition*, 42 (2) 118-130. p.
- FONTANNAZ, P., KILINC, T., és HEUDI, O. (2006): HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry*, 94 (4) 626-631. p.
- FURUSAWA, N. (2001): Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control*, 12 (1) 27-29. p.
- GALVIN, M. A., KIELY, M., és FLYNN, A. (2003): Impact of ready-to-eat breakfast cereal (RTEBC) consumption on adequacy of micronutrient intakes and compliance with dietary recommendations in irish adults. *Public Health Nutrition*, 6 (4) 351-363. p.
- GASZTONYI, K. (1992). Vitaminok. Élelmiszer-kémia 1., K. Gasztonyi and L. Radomir, eds., Mezőgazda Kiadó, Budapest, 290-337.
- GATTI, R., és GIOIA, M. G. (2005): Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B₆ vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*, 538 (1-2) 135-141. p.
- GAUCH, R., LEUENBERGER, U., és MÜLLER, U. (1993): The determination of folic acid (pteroyl-l-glutamic acid) in food by HPLC. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 84 (295)p.
- GIBSON, S. (2003): Micronutrient intakes, micronutrient status and lipid profiles among young people consuming different amounts of breakfast cereals: Further analysis of data from the national diet and nutrition survey of young people aged 4 to 18 years. *Public Health Nutrition*, 6 (8) 815-820. p.
- GIOIA, M. G., ANDREATTA, P., BOSCHETTI, S., és GATTI, R. (2007): Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids in new dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (3) 456-464. p.

- GREENWAY, G. M., és KOMETA, N. (1994): Online sample preparation for the determination of riboflavin and flavin mononucleotides in foodstuffs. *Analyst*, 119 (5) 929-935. p.
- GREGORY, J., és LOWE, S. (2000). National diet and nutrition survey: Young people aged 4 to 18 years. Report of the diet and nutrition survey, The Stationery Office, London.
- GUJSKA, E., és KUNCEWICZ, A. (2005a): Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in poland using trienzyme extraction and high-performance liquid chromatography methods. *European Food Research and Technology*, 221 (1-2) 208-213. p.
- GUJSKA, E., és MAJEWSKA, K. (2005b): Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. *Plant Foods For Human Nutrition*, 60 (2) 37-42. p.
- HAHN, A., STEIN, J., RUMP, U., és REHNER, G. (1991): Optimized high-performance liquid-chromatographic procedure for the separation and quantification of the main folacins and some derivatives .1. Chromatographic system. *Journal of Chromatography*, 540 (1-2) 207-215. p.
- HAMANO, T., MITSUHASHI, Y., AOKI, N., YAMAMOTO, S., és OJI, Y. (1988): Simultaneous determination of niacin and niacinamide in meats by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography*, 457 403-408. p.
- HASSELMANN, C., FRANCK, D., GRIMM, P., DIOP, P. A., és SOULES, C. (1989): High-performance liquid-chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietetic foods. *Journal of Micronutrient Analysis*, 5 (4) 269-279. p.
- HEMSTROM, P., és IRGUM, K. (2006): Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 29 (12) 1784-1821. p.
- HERNANDEZ, Y., LOBO, M. G., és GONZALEZ, M. (2006): Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96 (4) 654-664. p.
- HEUDI, O., KILINC, T., és FONTANNAZ, P. (2005): Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *Journal of Chromatography A*, 1070 (1-2) 49-56. p.
- HIDIROGLOU, N., MADERE, R., és BEHRENS, W. (1998): Electrochemical determination of ascorbic acid and isoascorbic acid in ground meat and processed foods by high pressure liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11 (1) 89-96. p.
- HILKER, D. M., és CLIFFORD, A. J. (1982): Thiamin analysis and separation of thiamin phosphate-esters by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography*, 231 (2) 433-438. p.
- HURST, W. J., MCKIM, J. M., és MARTIN, R. A. (1983): The HPLC analysis of thiamin in milk chocolate. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 53 (3) 239-242. p.
- IIDA, J., és MURATA, T. (1990): Application of thermospray liquid-chromatography mass-spectrometry to the analysis of water-soluble vitamins. *Analytical Sciences*, 6 (2) 273-276. p.
- IWASE, H. (2000): Use of an amino acid in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in food by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 881 (1-2) 317-326. p.
- IWATANI, Y., ARCOT, J., és SHRESTHA, A. K. (2003): Determination of folate contents in some australian vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16 (1) 37-48. p.
- JOHNSSON, H., és HESSEL, H. (1987): High-performance liquid-chromatographic determination of cholecalciferol (vitamin-D₃) in food - a comparison with a bioassay method. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 57 (4) 357-365. p.

- KABASAKALIS, V., SIOPIDOU, D., és MOSHATOU, E. (2000): Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70 (3) 325-328. p.
- KAFKAS, E., KOSAR, M., TUREMIS, N., és BASER, K. H. C. (2006): Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from turkey. *Food Chemistry*, 97 (4) 732-736. p.
- KALL, M. A., és ANDERSEN, C. (1999): Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography B*, 730 (1) 101-111. p.
- KAMMAN, J. F., LABUZA, T. P., és WARTHESEN, J. J. (1980): Thiamin and riboflavin analysis by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Food Science*, 45 (6) 1497-&. p.
- KARLSEN, A., BLOMHOFF, R., és GUNDERSEN, T. E. (2005): High-throughput analysis of vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 824 (1-2) 132-138. p.
- KIRCHMEIER, R. L., és UPTON, R. P. (1978): Simultaneous determination of niacin, niacinamide, pyridoxine, thiamine, and riboflavin in multivitamin blends by ion-pair high-pressure liquid-chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67 (10) 1444-1446. p.
- KLEJDUS, B., PETRLOVA, J., POTESIL, D., ADAM, V., MIKELOVA, R. és munkatársai. (2004): Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, 520 (1-2) 57-67. p.
- KRISHNAN, P. G., MAHMUD, I., és MATTHEES, D. P. (1999): Postcolumn fluorimetric HPLC procedure for determination of niacin content of cereals. *Cereal Chemistry*, 76 (4) 512-518. p.
- KUTNINK, M. A., HAWKES, W. C., SCHAUS, E. E., és OMAYE, S. T. (1987): An internal standard method for the unattended high-performance liquid-chromatographic analysis of ascorbic-acid in blood components. *Analytical Biochemistry*, 166 (2) 424-430. p.
- LACROIX, D. E., WOLF, W. R., PORTER, E., CANTELLOPS, D., CHASE, G. W. és munkatársai. (2001): Determination of niacin in infant formula by solid-phase extraction and anion-exchange liquid chromatography - PVM 1:2000. *Journal of Aoac International*, 84 (3) 789-804. p.
- LAHELY, S., BERGAENTZLE, M., és HASSELMANN, C. (1999): Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Food Chemistry*, 65 (1) 129-133. p.
- LANSKA, D. J. (1996): Stages in the recognition of epidemic pellagra in the united states: 1865-1960. *Neurology*, 47 (3) 829-834. p.
- LAU, O. W., LUK, S. F., és WONG, K. S. (1986): Background correction method for the determination of ascorbic-acid in soft drinks, fruit juices and cordials using direct ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, 111 (6) 665-670. p.
- LAVOIE, J. C., CHESSEX, P., ROULEAU, T., MIGNEAULT, D., és COMTE, B. (2004): Light-induced byproducts of vitamin C in multivitamin solutions. *Clinical Chemistry*, 50 (1) 135-140. p.
- LEBIEDZINSKA, A., MARSZALL, M. L., KUTA, J., és SZEFER, P. (2007): Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B₁ (thiamine), B₆ (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B₁₂ in animal and plant foods. *Journal of Chromatography A*, 1173 (1-2) 71-80. p.

- LEPORATI, A., CATELLANI, D., SUMAN, M., ANDREOLI, R., MANINI, P. és munkatársai. (2005): Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the analysis of water-soluble vitamins in italian pasta. *Analytica Chimica Acta*, 531 (1) 87-95. p.
- LESKOVA, E., KUBIKOVA, J., KOVACIKOVA, E., KOSICKA, M., PORUBSKA, J. és munkatársai. (2006): Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (4) 252-276. p.
- LIM, H. S., MACKEY, A. D., TAMURA, T., WONG, S. C., és PICCIANO, M. F. (1998): Measurable human milk folate is increased by treatment with alpha-amylase and protease in addition to folate conjugase. *Food Chemistry*, 63 (3) 401-407. p.
- LUCOCK, M. D., GREEN, M., HARTLEY, R., és LEVENE, M. I. (1993): Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability - use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 47 (1) 79-86. p.
- LYKKESFELDT, J. (2000): Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: Reliable reduction with tris[2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 282 (1) 89-93. p.
- LYKKESFELDT, J., LOFT, S., és POULSEN, H. E. (1995): Determination of ascorbic-acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid-chromatography with coulometric detection - are they reliable biomarkers of oxidative stress. *Analytical Biochemistry*, 229 (2) 329-335. p.
- LYNCH, P. L. M., és YOUNG, I. S. (2000): Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881 (1-2) 267-284. p.
- MAIA, A. M., BABY, A. R., YASAKA, W. J., SUENAGA, E., KANEKO, T. M. és munkatársai. (2007): Validation of HPLC stability-indicating method for vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. *Talanta*, 71 (2) 639-643. p.
- MANUAL. (2005). 3200 Q trap LC/MS/MS system, MDS SCIEX, Canada.
- MARSZALL, M. L., LEBIEDZINSKA, A., CZARNOWSKI, W., és SZEFER, P. (2005): High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1094 (1-2) 91-98. p.
- MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J. és munkatársai. (2001): Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5) 2343-2348. p.
- MAURO, D. J., és WETZEL, D. L. (1984): Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in enriched cereal based products by high-performance liquid-chromatography using selective detection. *Journal of Chromatography*, 299 (1) 281-287. p.
- MAWATARI, K., IINUMA, F., és WATANABE, M. (1991): Determination of nicotinic-acid and nicotinamide in human serum by high-performance liquid-chromatography with postcolumn ultraviolet-irradiation and fluorescence detection. *Analytical Sciences*, 7 (5) 733-736. p.
- MELTZER, H. M., ARO, A., ANDERSEN, N. L., KOCH, B., és ALEXANDER, J. (2003): Risk analysis applied to food fortification. *Public Health Nutrition*, 6 (3) 281-290. p.
- MIDTTUN, O., HUSTAD, S., SOLHEIM, E., SCHNEEDE, J., és UELAND, P. M. (2005): Multianalyte quantification of vitamin B₆ and B₂ species in the nanomolar range in

- human plasma by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 51 (7) 1206-1216. p.
- MITTERMAYER, R., KALMAN, A., TRISCONI, M. J., és HEUDI, O. (2004): Determination of vitamin B₅ in a range of fortified food products by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. *Journal of Chromatography A*, 1032 (1-2) 1-6. p.
- MORENO, P., és SALVADO, V. (2000): Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870 (1-2) 207-215. p.
- MSZ EN 14122:2006. Élelmiszerek. A B₁-vitamin meghatározása HPLC-vel.
- MSZ EN 14152:2004. Élelmiszerek. A B₂-vitamin meghatározása HPLC-vel.
- MSZ EN 14663:2006. Élelmiszerek. A B₆-vitamin (beleértve a glikozidjait is) meghatározása HPLC-vel.
- MULLER, L. D. (2001): Improved extraction methods for avoiding the interference of copper in the LC determination of ascorbic acid in multivitamin-mineral tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25 (5-6) 985-994. p.
- NDAW, S., BERGAENTZLE, M., AOUDÉ-WERNER, D., és HASSELMANN, C. (2000): Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. *Food Chemistry*, 71 (1) 129-138. p.
- NDAW, S., BERGAENTZLE, M., AOUDÉ-WERNER, D., és HASSELMANN, C. (2002): Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. *Food Chemistry*, 78 (1) 129-134. p.
- NILSON, A., és PIZA, J. (1998). Food fortification: A tool for fighting hidden hunger Food and nutrition bulletin, N. S. Scrimshaw, ed., United Nations University Press Tokyo, 49-60.
- NOVAKOVA, L., SOLICH, P., és SOLICHOVA, D. (2008): HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trac-Trends In Analytical Chemistry*, 27 (10) 942-958. p.
- O'BRIEN, M. M., KIELY, M., HARRINGTON, K. E., ROBSON, P. J., STRAIN, J. J. és munkatársai. (2001): The north/south ireland food consumption survey: Vitamin intakes in 18-64-year-old adults. *Public Health Nutrition*, 4 (5A) 1069-1079. p.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I., HERNANDEZ-JOVER, T., és MARTIN-BELLOSO, O. (2007): Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*, 105 (3) 1151-1158. p.
- OHTA, H., BABA, T., SUZUKI, Y., és OKADA, E. (1984): High-performance liquid-chromatographic analysis of thiamine in rice flour with fluorimetric post-column derivatization. *Journal of Chromatography*, 284 (1) 281-284. p.
- OISHI, M., AMAKAWA, E., OGIWARA, T., TAGUCHI, N., ONISHI, K. és munkatársai. (1988): Determination of nicotinic-acid and nicotinamide in meats by high-performance liquid-chromatography and conversion of nicotinamide in meats during storage. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 29 (1) 32-37. p.
- OSSEYI, E. S., WEHLING, R. L., és ALBRECHT, J. A. (2001): HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. *Cereal Chemistry*, 78 (4) 375-378. p.
- OTTAWAY, B. (1995). The technology of vitamins in food, Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- PAKIN, C., BERGAENTZLE, M., HUBSCHER, V., AOUDÉ-WERNER, D., és HASSELMANN, C. (2004): Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1035 (1) 87-95. p.

- PATRING, J. D. M., és JASTREBOVA, J. A. (2007): Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity. *Journal of Chromatography A*, 1143 (1-2) 72-82. p.
- PFEIFFER, C. M., ROGERS, L. M., és GREGORY, J. F. (1997): Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (2) 407-413. p.
- PRIETO, S. P., GRANDE, B. C., FALCON, S. G., és GANDARA, J. S. (2006): Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food Control*, 17 (11) 900-904. p.
- QUINLIVAN, E. P., HANSON, A. D., és GREGORY, J. F. (2006): The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 348 (2) 163-184. p.
- REES, D. I. (1989): Determination of nicotinamide and pyridoxine in fortified food-products by HPLC. *Journal of Micronutrient Analysis*, 5 (1) 53-61. p.
- REYES, E. S. P., és SUBRYAN, L. (1989): An improved method of simultaneous HPLC and thiamin in selected cereal products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2 (1) 41-47. p.
- RICHARDSON, D. (1990): Food fortification. *Proceedings of the Nutrition Society*, 49 39-50. p.
- RICHARDSON, D. (1997): The addition of nutrients to food. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56 807-825. p.
- RIZZOLO, A., BRAMBILLA, A., VALSECCHI, S., és ECCHER-ZERBINI, P. (2002): Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear fruit tissue. *Food Chemistry*, 77 (2) 257-262. p.
- RODLER, I. (2005). Élelmezés- és táplálkozás egészségtan, Medicina könyvkiadó Rt. , Budapest.
- ROSE-SALLIN, C., BLAKE, C. J., GENOUD, D., és TAGLIAFERRI, E. G. (2001): Comparison of microbiological and HPLC-fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified food products. *Food Chemistry*, 73 (4) 473-480. p.
- RUSSELL, L. F., BROOKS, L., és MCRAE, K. B. (1998): Development of a robotic-HPLC determination of riboflavin vitamers in food. *Food Chemistry*, 63 (1) 125-131. p.
- RUSSELL, L. F., és VANDERSLICE, J. T. (1992): Non-degradative extraction and simultaneous quantitation of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine-dinucleotide in foods by HPLC. *Food Chemistry*, 43 (2) 151-162. p.
- RYCHLIK, M. (2003a): Pantothenic acid quantification by a stable isotope dilution assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst*, 128 (7) 832-837. p.
- RYCHLIK, M. (2003b): Simultaneous analysis of folic acid and pantothenic acid in foods enriched with vitamins by stable isotope dilution assays. *Analytica Chimica Acta*, 495 (1-2) 133-141. p.
- RYCHLIK, M., ENGLERT, K., KAPFER, S., és KIRCHHOFF, E. (2007): Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (5) 411-419. p.
- SALMINEN, I., és ALFTHAN, G. (2008): Plasma ascorbic acid preparation and storage for epidemiological studies using tca precipitation. *Clinical Biochemistry*, 41 (9) 723-727. p.
- SAMPSON, D. A., EOFF, L. A., YAN, X. L., és LORENZ, K. (1995): Analysis of free and glycosylated vitamin-B₆ in wheat by high-performance liquid-chromatography. *Cereal Chemistry*, 72 (2) 217-221. p.
- SCIENTIFIC COMMITTEE on FOOD (2000): "Tolerable upper levels of intake of vitamins and minerals."

- SHEPHARD, A. B., NICHOLS, S. C., és BRAITHWAITE, A. (1999): Moisture induced solid phase degradation of L-ascorbic acid - part 1. A kinetic study using tristimulus colorimetry and a quantitative hplc assay. *Talanta*, 48 (3) 585-593. p.
- SIERRA, I., és VIDALVALVERDE, C. (1997): A simple method to determine free and glycosylated vitamin B₆ in legumes. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20 (6) 957-969. p.
- SIMOES, S. I. D., ELEUTERIO, C. V., CRUZ, M. E. M., CORVO, M. L., és MARTINS, M. B. F. (2003): Biochemical changes in arthritic rats: Dehydroascorbic and ascorbic acid levels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18 (2) 185-189. p.
- SIMS, A., és SHOEMAKER, D. (1993): Simultaneous liquid-chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods. *Journal of Aoac International*, 76 (5) 1156-1160. p.
- STAHL, M. (2003). Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology-application, Agilent Technologies, Waldbronn.
- STANCHER, B., és ZONTA, F. (1986): High-performance liquid-chromatographic analysis of riboflavin (vitamin-B₂) with visible absorbency detection in italian cheeses. *Journal of Food Science*, 51 (3) 857-858. p.
- TANG, X. Y., CRONIN, D. A., és BRUNTON, N. P. (2006): A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase hplc. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (8) 831-837. p.
- THOMPSON, C. O., és TRENERRY, V. C. (1995): A rapid method for the determination of total L-ascorbic-acid in fruits and vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 53 (1) 43-50. p.
- TOUKAIRINODA, T., SAKAMOTO, E., HIROSE, N., MORI, M., ITOH, T. és munkatársai. (1989): Determination of vitamin-B₆ derivatives in foods and biological-materials by reversed-phase HPLC. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 35 (3) 171-180. p.
- TOYOSAKI, T., YAMAMOTO, A., és MINESHITA, T. (1986): Simultaneous analysis of riboflavin and its decomposition products in various milks by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Micronutrient Analysis*, 2 (2) 117-123. p.
- TSUNODA, K., INOUE, N., IWASAKI, H., AKIYA, M., és HASEBE, A. (1988): Rapid simultaneous analysis of nicotinic-acid and nicotinamide in foods, and their behavior during storage. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 29 (4) 262-266. p.
- TUCKER, K. L., OLSON, B., BAKUN, P., DALLAL, G. E., SELHUB, J. és munkatársai. (2004): Breakfast cereal fortified with folic acid, vitamin B₆, and vitamin B₁₂ increases vitamin concentrations and reduces homocysteine concentrations: A randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5) 805-811. p.
- TYLER, T. A., és GENZALE, J. A. (1990): Liquid-chromatographic determination of total niacin in beef, semolina, and cottage cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73 (3) 467-469. p.
- VALLS, F., SANCHO, M. T., FERNANDEZ-MUINO, M. A., és CHECA, M. A. (2000): Simultaneous determination of nicotinic acid and nicotinamide in cooked sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8) 3392-3395. p.
- VANDERSLICE, J. T., MAIRE, C. E., és YAKUPKOVIC, J. E. (1981): Vitamin-B₆ in ready-to-eat cereals - analysis by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Food Science*, 46 (3) 943-946. p.
- VANNIEKERK, P. J., SMIT, S. C. C., STRYDOM, E. S. P., és ARMBRUSTER, G. (1984): Comparison of a high-performance liquid-chromatographic and microbiological method for the determination of niacin in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (2) 304-307. p.

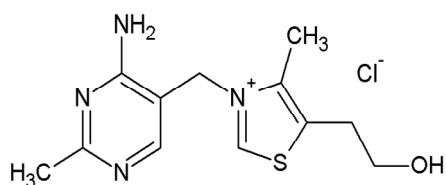
- VANSCHOONHOVEN, J., SCHRIJVER, J., VANDENBERG, H., és HAENEN, G. (1994): Reliable and sensitive high-performance liquid-chromatographic method with fluorometric detection for the analysis of vitamin-B₆ in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (7) 1475-1480. p.
- VIDAL-VALVERDE, C., és DIAZ-POLLAN, C. (1999): Optimization analysis by capillary electrophoresis of thiamine in meat: Comparison with high performance liquid chromatography. *European Food Research and Technology*, 209 (5) 355-359. p.
- VIDAL-VALVERDE, C., és DIAZ-POLLAN, C. (2000): Comparison of capillary electrophoretic and high performance liquid chromatographic thiamin determination in milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 55 (6) 307-309. p.
- VIDALVALVERDE, C., és RECHE, A. (1990): An improved high-performance liquid-chromatographic method for thiamin analysis in foods. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 191 (4-5) 313-318. p.
- VIDALVALVERDE, C., és RECHE, A. (1991): Determination of available niacin in legumes and meat by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (1) 116-121. p.
- VIDOVIC, S., STOJANOVIC, B., VELJKOVIC, J., PRAZIC-ARSIC, L., ROGLIC, G. és munkatársai. (2008): Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatography A*, 1202 (2) 155-162. p.
- VINAS, P., BALSALOBRE, N., LOPEZ-ERROZ, C., és HERNANDEZ-CORDOBA, M. (2004): Determination of vitamin B₆ compounds in foods using liquid chromatography with post-column derivatization fluorescence detection. *Chromatographia*, 59 (5-6) 381-386. p.
- VINAS, P., LOPEZ-ERROZ, C., BALSALOBRE, N., és HERNANDEZ-CORDOBA, M. (2003): Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the b group vitamins in baby foods. *Journal of Chromatography A*, 1007 (1-2) 77-84. p.
- WALKER, M. C., CARPENTER, B. E., és COOPER, E. L. (1981): Simultaneous determination of niacinamide, pyridoxine, riboflavin, and thiamine in multivitamin products by high-pressure liquid-chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70 (1) 99-101. p.
- WARD, C. M., és TRENNERY, V. C. (1997): The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 60 (4) 667-674. p.
- WATSON, D. G., IQBAL, Z., MIDGLEY, J. M., PRYCEJONES, H., MORRISON, L. és munkatársai. (1993): Measurement of ascorbic-acid in human aqueous-humor and plasma and bovine aqueous-humor by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11 (4-5) 389-392. p.
- WILSON, S. D., és HORNE, D. W. (1984): High-performance liquid-chromatographic determination of the distribution of naturally-occurring folic-acid derivatives in rat-liver. *Analytical Biochemistry*, 142 (2) 529-535. p.
- WIMALASIRI, P., és WILLS, R. B. H. (1985): Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography*, 318 (2) 412-416. p.
- WIRAKARTAKUSUMAH, M. A., és HARIYADI, P. (1998). Technical aspects of food fortification Food and nutrition bulletin, N. S. Scrimshaw, ed., The United Nations University, Tokyo.

- WOOLLARD, D. C., és INDYK, H. E. (2002): Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography. *Journal of Aoac International*, 85 (4) 945-951. p.
- WOOLLARD, D. C., INDYK, H. E., és CHRISTIANSEN, S. K. (2000): The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chemistry*, 69 (2) 201-208. p.
- YON, M., és HYUN, T. H. (2003): Folate content of foods commonly consumed in korea measured after trienzyme extraction. *Nutrition Research*, 23 (6) 735-746. p.
- ZAFRA-GOMEZ, A., GARBALLO, A., MORALES, J. C., és GARCIA-AYUSO, L. E. (2006): Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13) 4531-4536. p.
- ZAJKÁS, G. (2004). Magyarország nemzeti táplálkozáspolitikája, Nemzeti Népegészségügyi Program támogatásával, Budapest.

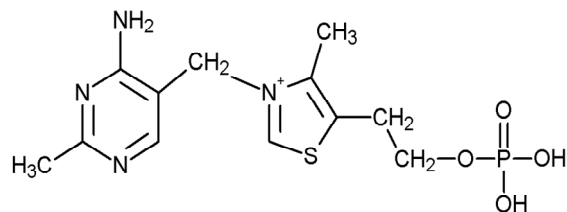
11 MELLÉKLETEK

Melléklet I.

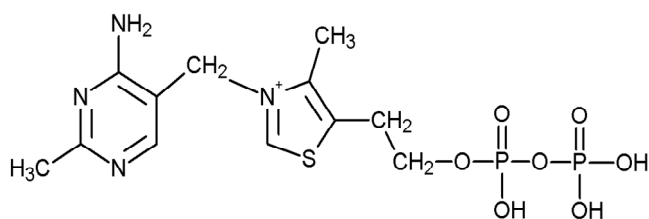
B₁-vitamin és vitamerjei



Tiamin

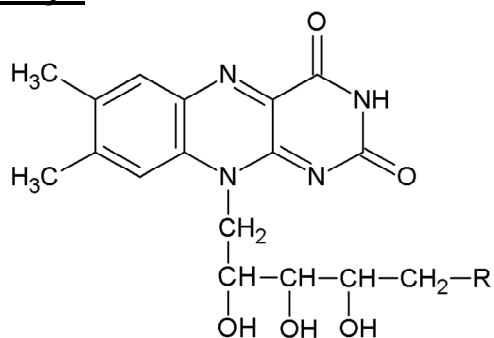


Tiamin-monofoszfát (TMP)



Tiamin-difoszfát (TDP)

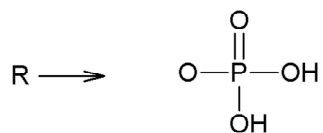
B₂-vitamin és vitamerjei



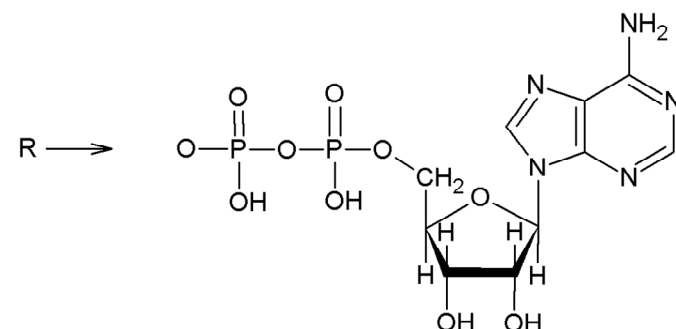
Riboflavin



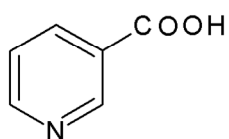
Riboflavin-5'-
foszfát (FMN)



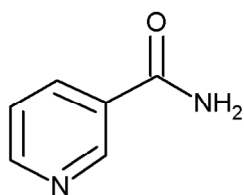
Flavin-adenin-
dinukleotid (FAD)



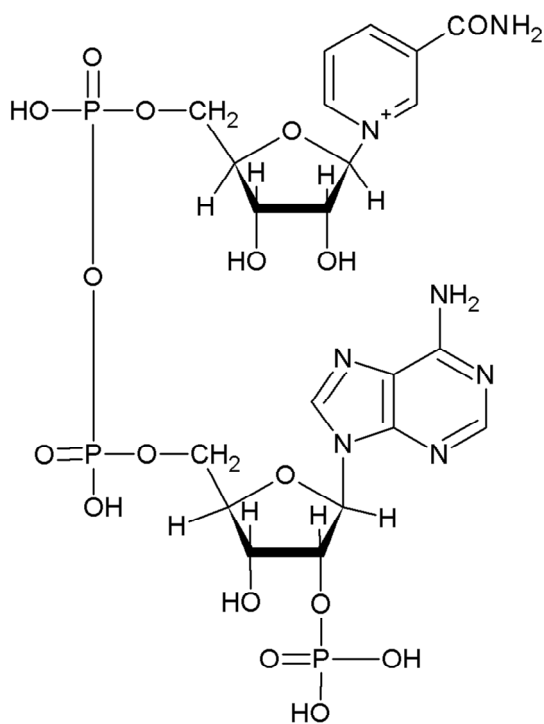
B₃-vitamin és vitamerei



Nikotinsav

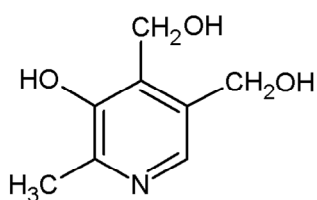


Nikotinamid



Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
(NADP)

B₆-vitamin és vitamerei



Pridoxin (PN)

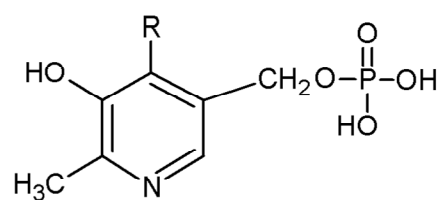
Pridoxal (PL)

Pridoxamin (PM)

R – CH₂OH

R – COH

R – CH₂NH₂

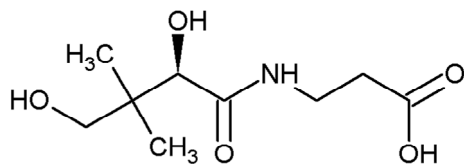


Pridoxin-5'-foszfát (PNP)

Pridoxal-5'-foszfát (PLP)

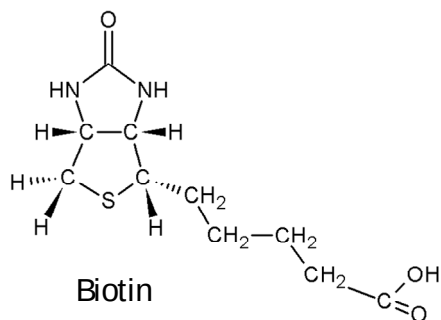
Pridoxamin-5'-foszfát (PMP)

B₅-vitamin



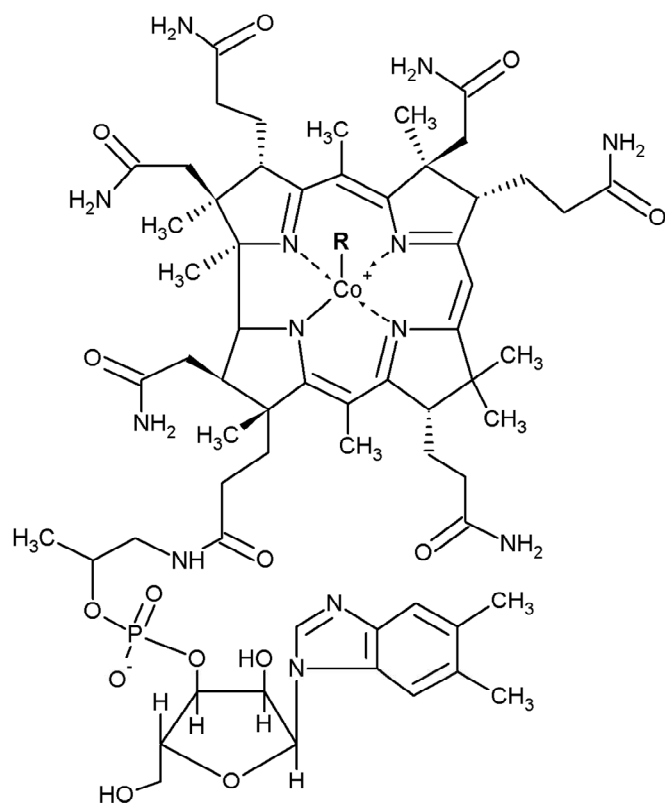
Pantoténsav

B₇-vitamin

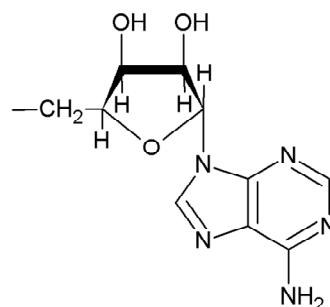


Biotin

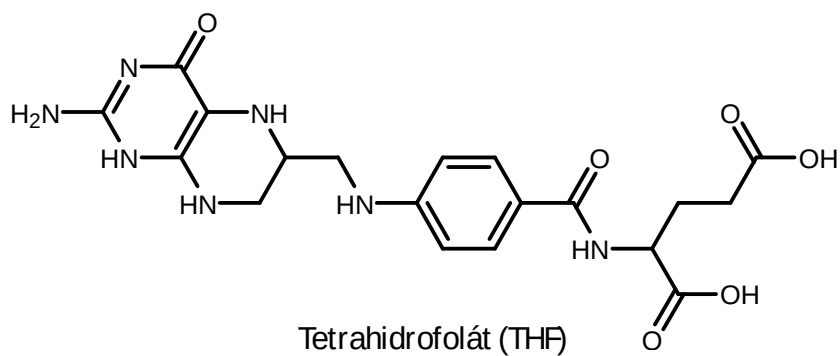
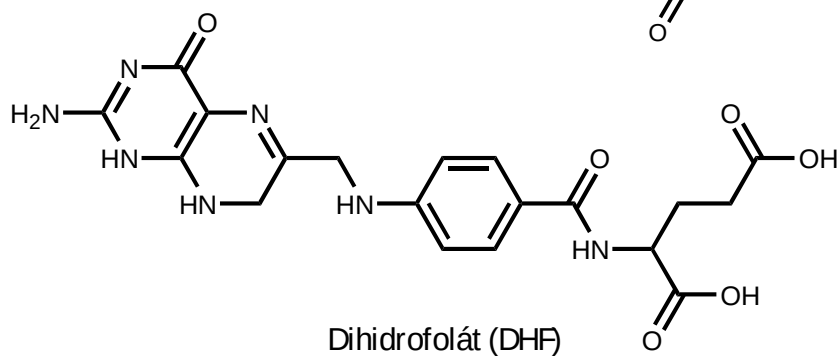
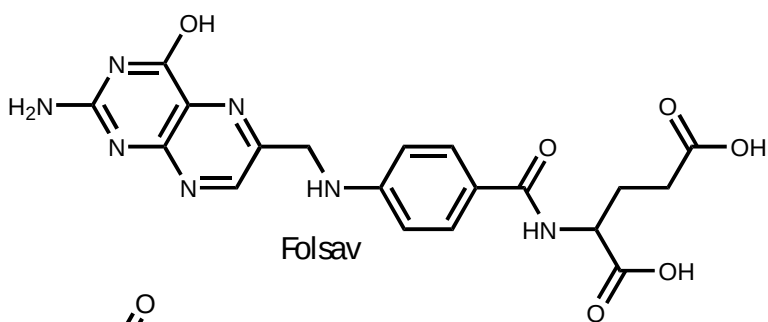
B₁₂-vitamin és vitamerei



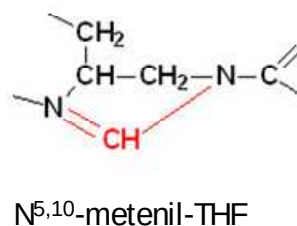
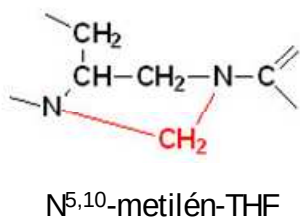
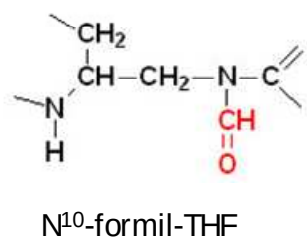
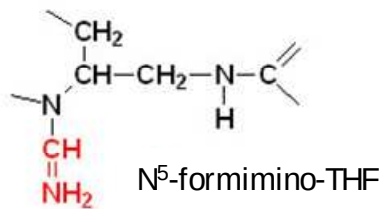
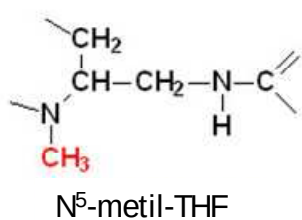
	R
cianokobalamin	- CN
hidroxikobalamin	- OH
aquakobalamin	- H ₂ O
metilkobalamin	- CH ₃
5'-dezoxiadenozil-kobalamin	



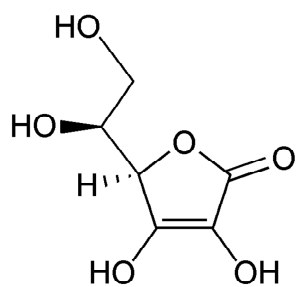
B₉-vitamin és vitamerjei



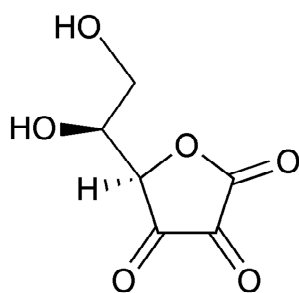
Tetrahidrofolát egy szénatomosvegyületrészekkel kiegészített formái



C-vitamin és vitamerjei

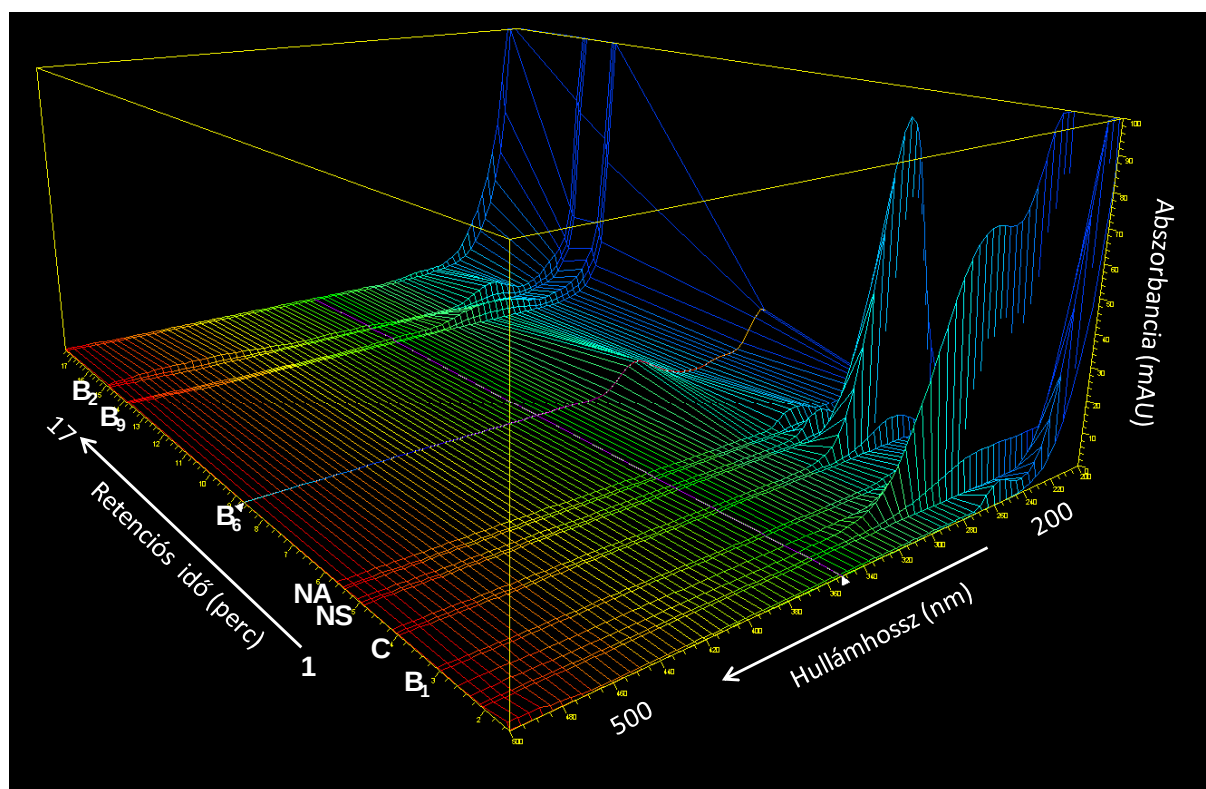


Aszkorbinsav



Dehidro-aszkorbinsav

Melléklet II.



Vízben oldódó vitaminok standardolatának háromdimenziós kromatogramj

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségemre voltak, támogattak a négy évig tartó doktori munkám során.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Stefanovitsné Dr. Bányi Évának, aki már diplomamunkám megírásától fogva ösztönözte munkámat, és akinek személyes és szakmai támogatására, segítségnyújtására mindvégig számíthattam.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Abrankó Lászlónak, témavezetőmnek, barátomnak, aki hatalmas élelmiszeranalitikai tudásából egy szeletet átadva bevezetett e tudományterület csodálatos világába, és aki szakmai útmutatásával, fáradhatatlan biztatásával terelgette munkámat egészen e dolgozat végső formájának megszületéséig.

Köszönettel tartozom Dr. Fodor Péternek, az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjének, aki biztosította munkám sikerességéhez szükséges szakismereti és műszeres hátteret.

Szeretném továbbá megköszönni Dr. Hegedűs Attilának és Dr. Dernovics Mihálynak kutatómunkámhoz nyújtott személyes közreműködését, illetve Tömöry Istvánnak a munkámhoz nélkülözhetetlen számítástechnikai háttér megteremtését.

Köszönöm Doktorandusz társaimnak és a Tanszék összes dolgozójának, hogy szakmai tanácsaikkal és kellemes légkör megteremtésével segítették munkámat. Továbbá köszönöm diplomázóimnak, hogy szorgalmas munkájukkal segítségemre voltak.

Külön köszönöm Dr. Lugasi Andrea és Dr. Bartha András opponensi munkáját, építőjellegű kritikáit házi védésem alkalmával.

Doktori munkám elvégzéséhez nyújtott anyagi támogatásért köszönettel tartozom továbbá a következő intézményeknek: Magyar Állami Doktori Ösztöndíj, BCE - Élelmiszertudományi Doktori Iskola, Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, akik támogatására, segítségnyújtására minden helyzetben számíthattam, és akik szakadatlan biztatással, ösztönzésükkel bátorítottak, és lendítettek át doktorandusz éveim hullámvölgyein.

Külön köszönöm édesapámnak Dr. Engel Tibornak, hogy sokrétű tudásával, vegyészmérnöki szemléletével számtalan esetben segítette munkámat.

És végül, de nem utolsó sorban köszönöm páromnak Dr. Schäffer Richárdnak irányomba tanúsított végtelen türelmét, kifogyhatatlan biztató szavait, szakmai tanácsait, valamint, hogy mindig ott termett és segített a bajban.