



Élelmiszertudományi Kar

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

ENGEL RITA

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Témavezetők:	<i>Stefanovitsné dr. Bányai Éva</i>	<i>Dr. Abrankó László</i>
	DSc, egyetemi tanár Alkalmazott Kémia Tanszék Élelmiszertudományi Kar Budapesti Corvinus Egyetem	PhD, egyetemi adjunktus Alkalmazott Kémia Tanszék Élelmiszertudományi Kar Budapesti Corvinus Egyetem

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

Lugai Andrea, PhD

Kovács Béla, CSc

Opponensek

Bartha András, PhD

Daood Hussein, CSc

Titkár

Üveges Márta, PhD

1 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. 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 lejárásához. 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.

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.

2 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.

3 Anyag és módszer

Vizsgálataim során minden esetben analitikai, vagy nagyobb tisztaságú vegyszerekkel és nagy tisztaságú vízzel ($18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) dolgoztam. A különböző *mozgófázisok* elkészítése során KH_2PO_4 és K_2HPO_4 sókat, metanolt, hangyasavat, valamint ionpárképzőként trifluoroecetsavat és heptafluoro-vajsavat használtam. *Standardoldatokat* a következő vegyületekből készítettem: L-aszkorbinsav (C), tiamin-hidroklorid (B_1), tiamin-monofoszfát (TMP), riboflavin (B_2), riboflavin-5'-monofoszfát (FMN), nikotinamid (NA), nikotinsav (NS), pantoténsav (B_5), piridoxin-hidroklorid (B_6 vagy PN), piridoxamin-dihidroklorid (PM), piridoxal-hidroklorid (PL), piridoxál-5'foszfát-monohidrát (PLP), folsav (B_9). Belső standardként hippursavat használtam. Mintaelőkészítés, valamint a standardoldatok elkészítése során HCl-at, NaCH_3COO -ot, CH_3COOH -at, NH_4OH -át, NaOH-ot, HPO_3 -at, L-ciszteint, taka-diasztázt, burgonyából kinyert savas foszfátot, valamint mandula eredetű β -glükózidázt használtam.

Doktori munkám során kereskedelmi forgalomban lévő termékeket, úgymint *multivitamin tablettát*, vitaminokkal dúsított teljes kiőrlésű reggeli *gabonapelyhet*, *gyümölcslevet* és instant *kakaóport* vizsgáltam. A minták *szabad* vitamintartalmának kinyerését sósavas, valamint metafoszforsavas extrakcióval [EN 14130:2003] végeztem. Az élelmiszerminták *összes* B_1 -, B_2 - és B_6 - vitamin-tartalmának meghatározásához savas hidrolízisből és enzimátikus feltárásból álló mintaelőkészítési eljárásokat alkalmaztam [MSZ EN 14122:2006, MSZ EN 14152:2004, MSZ EN 14663:2006].

Méréseimet HPLC-(UV-VIS) valamint HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS rendszereken végeztem. A vitaminok elválasztásához fordított fázisú analitikai oszlopokat használtam.

4 Eredmények

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

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 következő vízben oldódó vitaminokra, illetve vegyületeire esett a választásom: tiamin, riboflavin, nikotinamid, nikotinsav, pantoténsav, piridoxin, folsav, aszkorbinsav.

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.

Már a *standardoldatok* elkészítése is nagymértékű körültekintést igényel, az egyes komponensek eltérő oldhatósága, illetve nagyfokú instabilitása miatt. Az aszkorbinsavnak híg savas törzsoldatát készítettem el, stabilitásának növelése érdekében. Azonban a közeg alacsony pH-ja ellenére a C-vitamin bomlása volt megfigyelhető. A C-vitamin bomlását ideiglenesen a standardoldatok elkészítést követő azonnali mérésével kerültem ki.

A nyolc vitamin *fordított fázisú kromatográfiás elválasztását* dolgoztam ki, mely során pH 7-es *foszfát puffer* és *metanol* töltötte be a mozgófázisok szerepét. A komponensek alapvonalig történő elválasztását egy négy lépcsős gradiens elúciós program kidolgozásával valósítottam meg. A foszfát puffer által biztosított pH 7-es körülmények között az aszkorbinsav gyenge sav révén polárisabb, ionos formában van jelen, melynek következtében kicsi a visszatartása, és így az adott kromatográfiás körülmények között a kolonna holtidejéhez közel eluálódott.

A vitaminok érzékenyebb, illetve szelektívebb meghatározása érdekében, abszorbancia spektrumaik alapján öt különböző hullámhosszat (*266 nm*- B₁, NA, NS, C, *282 nm*- B₉, 200 nm- B₅, *325 nm*- B₆, *448 nm*- B₂) választottam detektálásukhoz. 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.

A kidolgozott módszert egy vitaminokkal *dúsított gabonapelyhen* próbáltam ki. A vitaminok kinyeréséhez *sósavas extrakciót* alkalmaztam. A fentiekben leírt módszer azonban, nem tette lehetővé a vizsgált vitaminok mátrixkomponensektől való elválasztását. Habár a módszer komplex élelmiszerminták vizsgálatát nem teszi lehetővé, **egyszerűbb mátrixok** (vitamintabletta) rutin vizsgálatához, gyors, olcsó megoldást biztosít.

Doktori munkámat a továbbiakban, a felmerülő **analitikai problémák** megoldásával folytattam, melyek összefoglalva a következők:

- 1) Standardoldatok készítése során felmerült problémák:
 - a) 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.

4.2 Vízben oldódó vitaminok együttes meghatározása ionpároképző használatával RP-IP-HPLC-(UV-VIS) rendszerrel

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 **kromatográfiai elválasztásának** nehézségeit öleli fel.

A felmerült **stabilitási problémák** kivédése érdekében a standardoldatok elkészítéséhez metafoszforsavat (HPO_3) alkalmaztam, mely megvédi az aszkorbinsavat az oxidációtól, és megfelelő stabilitási viszonyokat teremt a B-vitaminok számára is.

A C-vitamin gyors bomlása a *mintaelőkészítés* során is komoly problémát jelent. 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-vitaminokra. Erre azért nyílt lehetőség, mert a dúsított élelmiszerek hozzáadott vitamintartalma nem kötődik szorosan a mátrixkomponensekhez, így a B-vitaminok összetett mintaelőkészítése felváltható egy egyszerűbb extrakcióval. Visszanyerési és mátrixhatás vizsgálatokkal igazoltam, hogy az eredetileg C-vitaminra kidolgozott extrakciós eljárás kiterjeszhető a vizsgált B-vitaminokra.

A C- és B-vitaminok együttes fordított fázisú *kromatográfiás meghatározása* során az egyik legjelentősebb problémát az aszkorbinsav gyenge visszatartása jelentette. Ennek áthidalása érdekében a foszfát puffert trifluor-ecetsav (TFA) tartalmú mozgófázisra cseréltem fel. A TFA kettős szerepet töltött be. Egyrészt pH stabilizátorként megnövelte a C-vitamin retenció idejét, másrészt ionpárképzőként megfelelő visszatartást biztosított a bázikus tulajdonságú vitaminok számára is.

A kiterjesztett mintaelőkészítést és a kidolgozott RP-IP-HPLC módszert sikeresen alkalmaztam különböző *élelmiszermátrixok* (dúsított gabonapehely, kakaópor, gyümölcsle) C-, NA, B₂-, és B₆-vitamin-tartalmának meghatározására. Azonban a mozgófázis TFA tartalmának következtében *(i)* megnövekedett UV cut-off értéke nem tette lehetővé a B₅-vitamin meghatározását. Továbbá a módszer hátrányaként meg kell még említenem *(ii)* a B₁-vitamin csúcsalak, valamint visszatartási, *(iii)* a nikotinsav szelektivitásbeli, valamint *(iv)* a B₉-vitamin érzékenységi problémáit. Az egyes komponensek esetében felmerülő szelektivitási, visszatartási és érzékenységi problémák együttes megoldása céljából a kromatográfiás módszer tömegspektrométerre való átültetése mellett döntöttem.

4.3 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 lágú ionizációs technikán alapuló *HPLC-ESI-MS/MS* kapcsolt rendszeren kidolgoztam és validáltam egy új többkomponenses módszert vízben oldódó vitaminok meghatározására.

A módszerfejlesztés első lépéseként a legjobb jel/zaj arány elérése érdekében az *ionforrás-* és a *komponensfüggő paramétereket* egyaránt optimalám. A komponensek meghatározását MRM módban végeztem. Minden vitamin esetében a két legintenzívebb anyaiion/termékion átmenetet monitoroztam. Az intenzívebb anyaiion/termékion átmenet a vitaminok mennyiségi meghatározását, a kisebb intenzitású a minőségi azonosítás során fellépő hibák kiküszöbölését szolgálja. A két fragmentum egy időben történő eluálódása biztosítja a vizsgált komponens azonosságát.

A detektálási paraméterek optimalálását követően a vízben oldódó vitaminok egyidejű elválasztására egy új *MS kompatibilis kromatográfias módszert* dolgoztam ki. Az eddigiekben alkalmazott TFA nagymértékben rontja a vitaminok ionizációját, ezért a mozgófázis alacsony pH-ját TFA helyett hangyasav hozzáadásával biztosítottam. Az új mozgófázis összetétel az eddigiekben használt állófázis lecserélését tette szükségessé. A vizsgált komponensek elválasztását és megfelelő visszatartását egy magas víz toleranciájú fordított fázisú analitikai oszlop használatával értem el. A vitaminok detektálásához UV detektort és tömegspektrométert egyaránt alkalmaztam, úgy, hogy a két készüléket egy kapilláris cső segítségével sorba kötöttem.

A kidolgozott kromatográfias módszert a *teljesítményjellemzők* (kimutatási határ, linearitás, érzékenység, ismételhetőség) meghatározását követően *dúsított élelmiszereken* (gabonapehely, instant kakaópor, gyümölcsle) sikeresen alkalmaztam.

A C- és a B-vitaminok együttes meghatározását szolgáló metafoszforsavas mintaelőkészítés validálásának részeként vizsgáltam az *extrakció hatásfokát*. A minták egyszeres és kétszeres extrakciójával nyert kivonatait belső standard (hippursav) segítségével vettem össze. Az egyszeres és a kétszeres extrakció között nem volt szignifikáns különbség. Az extrakció hatékonysága mellett vizsgáltam a mintaelőkészítés ismételhetőségét is.

Végeredményképen elmondható, hogy a kidolgozott *HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS* módszer és a kiterjesztett *metafoszforsavas extrakció* alkalmas C- és B-vitaminok (B₁, B₂, NS, NA, B₅, B₆, B₉) egy menetben történő meghatározására dúsított élelmiszerekből.

4.4 Természetes vitamintartalom meghatározás

A vízben oldódó vitaminoknak számos azonos hatású *vitamerje* létezik a természetben. Az egyes vitamerek *szabad*, valamint *kötött* formában egyaránt előfordulnak. Ebből kifolyólag az élelmiszerek teljes vitamintartalmának meghatározása a kötött formák felszabadításával lehetséges. A dúsított élelmiszerek teljes vitamintartalma a hozzáadott, illetve a természetes vitamintartalomtól tevődik össze.

Doktori munkám részeként arra kerestem a választ, hogy a B-vitaminokra kiterjesztett **metafoszforsavas extrakcióval** a dúsított élelmiszerek teljes vitamintartalmának hány százaléka nyerhető ki. Ennek érdekében a metafoszforsavas mintaelőkészítést a B-vitaminok európai szabvány szerinti mintaelőkészítési eljárásaival, valamint egyszerű melegvizes kivonással vettem össze. Az élelmiszerek összes B-vitamin-tartalmának meghatározására vonatkozó, HPLC módszeren alapuló szabvány csak a B₁-, B₂-, és a B₆-vitaminok esetében áll rendelkezésünkre. Ezek a szabványos módszerek az összniacin-tartalom (B₃) felszabadításához szükséges feltételeket (savas hidrolízis) egyaránt teljesítik. A B₁- és a B₂-vitaminok extrakciója azonos lépésekből áll, így mintaelőkészítésüket összevontam. Ebből kifolyólag a metafoszforsavas extrakciót két különböző, **savas hidrolízisből és enzimatikus feltárásból** álló mintaelőkészítéssel valamint **melegvizes** kivonással vettem össze **a B₁-, B₂-, B₃-, és B₆-vitaminokra** vonatkozóan

A fentiek alapján a vizsgálandó komponensek körét a továbbiakban a tiamin (B₁), a riboflavin (B₂), a nikotinsav (NS), a nikotinamid (NA), a piridoxin (PN), a piridoxamin (PM) a piridoxal (PL), a tiamin-monofoszfát (TMP), a riboflavin-5'-foszfát (FMN) és a piridoxal-5'-foszfát (PLP) alkotják. A foszforilált formák vizsgálata a defoszforiláló enzim optimális működésének ellenőrzése céljából szükségesek. A foszforilált formák eltűnése a kromatogramról jelzi az enzim megfelelő működését.

Az ily módon összeállított komponenskészlet meghatározását **RP-HPLC-(UV-VIS)-ESI-MS/MS** kapcsolt rendszeren végeztem **ionpárképző** használatával (HFBA). Az elválasztás kidolgozását megelőzően optimáltam a komponensek detektálásához szükséges komponensfüggő paramétereket.

A kidolgozott kromatográfia segítségével dúsított gabonapelyhen összehasonlítottam a fent említett négy mintaelőkészítést. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a metafoszforsavas extrakcióval kinyerhető vitaminmennyiséget kizárólag a **szabad vitaminformák** alkotják.

5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam az élelmiszerek dúsításához legelterjedtebben alkalmazott vízben oldódó vitaminformák (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 ionpárképzővel (trifluoro ecetsav),
 - o ionpárképző nélkül, semleges kémhatáson történő, valamint
 - o ionpárképző 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 abszorbancia 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 ionpárképző alkalmazása az egyik megoldását jelentheti a vitaminok eltérő sav-bázis jellemzőiből eredő kromatográfiás problémák áthidalására.

2. Kidolgoztam egy ionpároképzőt 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 ionpároképzőt alkalmazva lehetőség nyílik a tiamin (B₁), a tiamin-monofoszfát (TMP), riboflavin (B₂), 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 kromatográfias eljárásokkal UV-VIS detektálással valódi mintákból nem kivitelezhető, ugyanakkor az eltérő működési elv miatt ez ESI-MS/MS rendszerrel azonos kromatográfias 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 szükségszerű e két vitamér megfelelő felbontású kromatográfias 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 e 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 meghatározásár

6 Publikációs tevékenység

Impakt faktoros folyóirat közlemények

Hegedűs A., Balogh E., **Engel R.**, Sipos B.Z., Papp J., Blázovics A., Stefanovits-Bányai É.: Comparative nutrient element and antioxidant characterization of berry fruit species and cultivars grown in Hungary. HortScience, ISSN: 0018-5345, **2008**. 43 (6) 1711-1715 (IF:0,79)

Engel R., Abrankó L., Stefanovits-Bányai É., Fodor P.: Simultaneous determination of water-soluble vitamins in fortified food products. Acta Alimentaria, ISSN 1588-2535, **2008**. (IF: 0,441) in press

Engel R., Abrankó L., Stefanovits-Bányai É., Fodor P.: Simultaneous determination of B group vitamins and vitamin C in various fortified food products. Chromatographia, **2009**. bírálás alatt

Nem impakt faktoros folyóirat közlemények

Engel R., Hegedűs A., Bodor Zs., Heltmann-Tulok M., Stefanovits-Bányai É.: Comparative study of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones during the growing season. Journal of Horticulture Science, ISSN 1585-0404, **2005**. 11 (2) 67-72.

Stefanovits-Bányai É., **Engel R.**, Hermán R., Blázovics A., Hegedűs A.: Antioxidant characterization of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids. International Journal of Horticultural Science, ISSN 1585-0404, **2005**. 11 (4) 47-51.

Szenthe A., Stefanovits-Bányai É., Blázovics A., Hegedűs A., **Engel R.**, Sipos B.Z., Sárdi É., Papp J.: Influence of strawberry and raspberry consumption on the antioxidant status of human body. International Journal of Horticultural Science, ISSN 1585-0404, **2006**. 12 (3) 30-36.

Engel R., Hegedűs A., Heltmann-Tulok M., Stefanovits-Bányai É.: Rozmaring-klónokból készült vizes és alkoholos kivonatok antioxidáns kapacitásának és elemösszetételének összefüggései. Olaj, Szappan, Kozmetika, ISSN 0472-8602, **2005**.54 (1) 26-28.

Stefanovits-Bányai É., Gyúró J., **Engel R.**, Hegedűs A.: Tojásgyümölcs (*Solanum melongena*) fajták szerepe az antioxidáns védelemben. Kertgazdaság, ISSN 1419-2713, **2005**. 37 (4)10-13.

Stefanovits-Bányai É., Blázovics A., Hegedűs A., **Engel R.**, Sipos B.Z., Szenthe A., Papp J.: A szamóca és a málnafogyasztás szerepe a szervezet antioxidáns státuszának kialakításában. Kertgazdaság, ISSN 1419-2713, **2006**. 38 (1)19-26.

Publikáció konferencia kiadványban

Magyar nyelvű teljes

Engel R., Hegedűs A., Heltmanné Tulok M.: A rozmaring (*Rosmarinus officinalis* L.) kivonatok összantioxidáns- kapacitásának valamint összfenol- tartalmának változása a vegetáció során. The 11th symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, ISBN 963-217-147-0, **2004**. Összefoglaló 121-125.

Stefanovits-Bányai É., Hegedűs A., Blázovics A., Sztefanov A., **Engel R.**, Koczka N.: Az antioxidáns kapacitás szempontjából fontos fenolos vegyületek mennyisége a *Ginkgo biloba* L. hím és nőivarú egyedeiben. The 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, ISBN 963-219-675-9, **2005**. Összefoglaló 410-414.

Engel R., Hegedűs A., Heltmanné Tulok M., Ferenczi A., Stefanovits-Bányai É.: Mintavételi időpontok hatása néhány fontosabb *Lamiaceae* faj drogjából készült kivonat antioxidáns kapacitására. The 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, ISBN 963-219-675-9, **2005**. Összefoglaló 405-409.

Magyar nyelvű összefoglaló

Engel R., Hegedűs A., Heltmann Tulok M., Stefanovits-Bányai É.: Rozmaringból készült teakivonatok összehasonlítása az antioxidáns kapacitás szempontjából. Magyar Szabadgyök-kutató Társaság III. Konferenciája, Debrecen, **2005**. 15.

Engel R., Hegedűs A., Szani Sz., Mózes T., Stefanovits-Bányai É.: Káposztafajták antioxidáns kapacitásának szerepe az élelmiszeriparban. VII. Élelmiszertudományi Konferencia, Szeged, ISBN 963-482-676-8, **2006**. Előadás és poszter összefoglaló, 94.

Szente A., Stefanovits-Bányai É., Stéger-Máté M., Boldoczky D., Balogh E., **Engel R.**, Sipos B.Z., Papp J.: Ősszel érő bogyósgyümölcsök friss fogyasztásának szerepe táplálkozásunkban. VII. Élelmiszertudományi Konferencia, Szeged, ISBN 963-482-676-8, **2006**. Előadás és poszter összefoglaló 115-116.

Szamosi Cs., **Engel R.**, Hegedűs A., Némethy-Uzoni H., Tordai E., Sárdi É., Stefanovits Bányai É.: A dinnyefélék táplálkozási jelentősége a téli időszakban. VII. Élelmiszertudományi Konferencia, Szeged, ISBN 963-482-676-8, **2006**. Előadás és poszter összefoglaló 113-114.

Engel R., Hegedűs A., Blázovics A., Gyúros J., Stefanovits-Bányai É.: Paprikafajták antioxidáns tulajdonságának összehasonlítása friss és feldolgozott állapotban. Magyar Szabadgyök Kutató Társaság, Munkaértekezlet, **2006**. 9.

Szamosi Cs., **Engel R.**, Tordai E., Sárdi É., Némethy-Uzoni H., Stefanovits-Bányai É.: Milyen szerepe lehet a dinnyefélék fogyasztásának a szervezet antioxidáns státuszának biztosításában? Magyar Szabadgyök Kutató Társaság, Munkaértekezlet, **2006**. 22.

Engel R., Abrankó L., Fodor P.: Vízben oldódó vitaminok meghatározása vitaminozott élelmiszerekben HPLC-UV technikával. Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, **2007**.

Nemzetközi teljes

Engel R., Hegedűs A., Heltmann-Tulok M., Stefanovits-Bányai É.: Microelement ingestion by herb-tea consumption. 6th International Elements in Environment, Medicine and Biology, Temesvár, Románia, Publishing House, ISBN 973-620-035-3, **2004**. 203-208.

Engel R., Némethy-Uzoni H., Hegedűs A., Stefanovits-Bányai É.: Effect of potassium sulphate fertilization on element content and antioxidant capacity in onion (*Allium cepa* L.). International Symposium on Trace Elements in the Food Chain, Budapest, ISBN 963 7067 132, **2006**. 299-303.

Engel R., Abrankó L., Stefanovits-Bányai É., Fodor P.: Simultaneous determination of water-soluble vitamins in supplemented cereal by liquid chromatography. Proceedings of 5th International Congress on Food Technology, Thessaloniki, Greece, ISBN 978-960-88557-3-1, **2007**. 619-626.

Nemzetközi összefoglaló

Engel R., Heltmann-Tulok M., Hegedűs A., Ferenczy A., Stefanovits-Bányai É.: Antioxidant capacity of some *Lamiaceae* species. 36th International Symposium on Essential Oils, Budapest, ISBN 963 218 981 7, **2005**. September 4-7. Abstract P141.

Máthé Á., Stefanovits-Bányai É., Blázovics A., Sipos B.Z., Szenthe A., Hegedűs A., **Engel R.**, Papp J., Sárdi É. Antioxidant activity and element content in elderberry collected from different areas in Hungary. 27th International Horticultural Congress & Exhibition, COEX, Seoul, Korea, **2006**. August 13-19. Abstracts 91. SO3-P-47

Máthé Á., Stefanovits-Bányai É., Blázovics A., Sipos B.Z., Szenthe A., Hegedűs A., **Engel R.**, Papp J., Sárdi É. Effect of the antioxidant activity and element content in raspberry fruits on human health. 27th International Horticultural Congress & Exhibition. COEX, Seoul, Korea, **2006**. August 13-19. Abstracts 84. SO3-P-10

Engel R., Stefanovits-Bányai É., Abrankó L.: Simultaneous determination of water-soluble vitamins in supplemented cereal by liquid chromatography. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV., Gyógyszerészet Supplementum Budapest, ISSN 0017-6036, **2009**. 53, S113

