

B₂ vitamin mennyiségi meghatározása

Kalman, A. és munkatársai

Nestlé Kutatóközpont, Vevey (Svájc)

Érkezett: 2003. december 21.

Uj bioszenzor alapú kitet fejlesztettek ki B₂ vitamin meghatározására a Nestlé Kutatóközpont, a Xenosense Ltd és a Biacore AB közreműködésével, körvizsgálatban. A B₂ vitamin meghatározását élelmiszer mátrixból és a National Institute of Standards and Technology (NIST)-től származó tanúsított referencia mintákban végezték, indirekt SPR módszerrel. Flavin analóg vegyületeket, flavin bomlástermékeit és a B-csoportba tartozó több vitamint is megvizsgáltak keresztreaktivitás szempontjából. A kimutatási határ 12,4 ng/ml. Minden vizsgálati mintát két különböző laborban függetlenül megvizsgáltak, és a mérés minőségét az ismételhetőség és a szórás alapján értékelték. A bioszenzor alapú mérés eredménye jó korrelációt mutatott a Journal Officiel de la Republique Francaise-ban közölt HPLC módszerével.

A vitaminokat, például folsavat, biotint, B₁₂ vitamint és a riboflavint különböző egészségvédő és nutritív élelmiszerhez adják kiegészítőként. Több országban törvényi előírás a folsav hozzáadása bizonyos gabona alapú termékekhez. A vitaminok koncentrációját az élelmiszerekben az élelmiszer-feldolgozás során határozzák meg. Az analitikai adatok pontossága lényeges a vitaminadagolás ellenőrzése szempontjából, nemcsak azért, hogy a jelölés fogyasztói igényeinek megfeleljen, hanem a veszteség minimálása miatt is. A riboflavin vízoldható B-komplex vitamin, másképpen B₂ néven ismert, elsősorban in vivo található, mint a flavin adenin dinukleotid (FAD) és flavin mononukleotid (FMN) koenzim komponense.

A B-csoportba tartozó vitaminok koncentrációját hagyományosan mikrobiológiai módszerekkel határozták meg, de sok HPLC alapú módszer is jelent meg az irodalomban az elmúlt 20 évben. Bár a vitaminkoncentrációk meghatározása mikrobiológiai és kromatográfiai módszerekkel viszonylag egyszerű, a pontos és megbízható eredmények reprodukálása bonyolultabb. Sok analízis esetén a mikrobiológiai és kromatográfiai módszereket alternatív technikaként tekintik, mindkettő fontos információt szolgáltat az analitikusnak. A riboflavin rutin mennyiségi meghatározását HPLC vagy mikrobiológiai alapú hivatalos módszerekkel végzik. Bizonyos egyszerű minta-előkészítések esetén, pl. premixekben, a riboflavin koncentráció egyszerű félkvantitatív

fluorometriás elemzéssel meghatározható. A HPLC elemzés azonban hosszabb extrakciós és futtatási időt igényel, ami a napi mintaszámot kb. 24-ben limitálja, a mikrobiológiai módszerrel viszont egy minta mérése két-három napot vesz igénybe. Emellett a mikrobiológiai módszerek nagy szakértelmet kívánnak, a pontosság és reprodukálhatóság kicsi. A bioszenzor alapú SPR technikával azonban kevesebb mint 6 óra alatt 20 minta könnyűszerrel megmérhető, és egy óra a manipulációs időigénye.

A tipikus SPR technika inhibíció alapszik, a riboflavin-specifikus fehérje megkötése a szenzor chip felületén gátlást szenved az adott minta szabad riboflavinja jelenlétében. Így kalibrációs görbét nyerhetünk, amiből meghatározható a riboflavin szint az extrahált mintában. A mérés fő komponensei a végfelhasználó számára kit formájában elérhetőek, amely mind rutin laboratóriumi használatra, mind specifikus alkalmazási követelményeknek megfelelő további fejlesztésre alkalmas. Az élelmiszerek vitaminkoncentrációjának általános elveit Biacore SPR technikával a rutin minőségellenőrzésben és tápérték-jelölésben Indyk és McWhirter (2001) foglalta össze.

Anyagok és módszerek

A minta-előkészítés a fordított fázisú HPLC-s B₁ és B₂ vitamin-meghatározás hivatalos francia módszerén alapul (Journal Officiel de la Republique Francaise). Jelenleg elfogadás alatt áll egy CEN módszer (CEN/TC 275), hivatkozási szám prEn 14512, Élelmiszerek, B₂ vitamin HPLC-s meghatározása), Ezt a módszert vitaminnal dúsított élelmiszerekre, pl. csecsemőtápszerekre, gabonaalapú csecsemőtápszerekre, tejalapú diétás termékekre, reggeli gabonatermékekre és vitaminozott italokra validálták. A módszer elve enzimes hidrolízis, melyet HPLC elválasztás követ, a detektálás fluoreszcens marker segítségével történik.

Mintaelőkészítés: 1. protokoll

A bőségesen rendelkezésre álló szilárd anyagból a mintakészítéshez 50 g mintát mértek be egy 250 ml-es főzőpohárba, hozzáadtak 100 ml 40 °C-os vizet és üvegbottal összekeverték. A homogenizált termék 15 grammját ezután (amely az eredeti termék 5 grammjának felel meg) átvitték egy 250 ml-es lapos fenekű barna gömbömbikba. 0,5 mg riboflavin mentes Takadiasztázt és 5 ml 45-50 °C-os vizet adtak a lombikhoz és alaposan összekeverték. A lombikot lezárták, 30 percre 40 °C-os termosztátba helyezték, majd 30 ml 45-50 °C-os vizet adtak hozzá.

Megjegyzés: fontos, hogy vakpróbát is végezzenek, hogy meggyőződhessenek arról, hogy a Taka-diasztáz (vagy Clara-diasztáz) enzim valóban riboflavin-mentes. Ha az enzim riboflavint tartalmaz, UV lámpa alatt két órát kell kezelni vizes pH 4,6-os puffer oldatban.

A teszt oldathoz 5 ml 1M HCl hozzáadásával hidrolizálták a mintákat. A lombikra hűtőt szereltek és forró vízfürdőbe állították 30 perc hosszat. A lombikot 15 perc után összerázták a csomók szétoszlatása céljából. A lombik tartalmát hagyták szobahőmérsékletre lehűlni majd 5 ml 2,5 M nátrium-acetát oldatot adtak hozzá és szűrték. Ha a minta oldékonyságát javítani kell, a szűrést azután kell elvégezni, hogy az oldat pH-ját 4,5-4,7-re állítják 1N HCl oldattal. A mintát 100 ml-es mérőlombikba vitték át és pontosan jelre töltötték vízzel. Végül a mintát ismét szűrték redős szűrőn vagy egy 0,22 μm -es szűrőn.

Mintaelőkészítés: 2. protokoll

Kifejlesztették az 1. protokoll egyszerűsített változatát és az eredményeket összehasonlították. Egy homogén gabonamintát ($1,00 \pm 0,02$ g) egy 100 ml-es Erlenmeyer lombikba mértek és hozzáadtak 45 ml foszfát-citrát extrakciós puffert (164 mM foszfát, 18,2 mM citrát, pH 7,0). A mintát ezután gondosan diszpergálták és a lombikot alufóliával vonták be hogy a mintát megvédjék az UV fénytől a mintakészítés előtt és alatt, és megakadályozzák a B₂ vitamin lebomlását. A mintát 30 percig erősen keverték, 50 ml-es mérőlombikba vitték át és jelre töltötték az extrakciós pufferrel. A mintát ezután szűrték, először egy 0,45 μm -es fecskendőszűrőn, majd egy 0,22 μm -es fecskendőszűrőn át. Annyi szűrletet gyűjtöttek, hogy az elemzéshez használt mintatartó edényt megtöltse.

Műszer

A mérést Sensor Chip CM5 –tel végezték, amelyet egy Biacore Q műszerbe helyeztek (Biacore AB, Uppsala, Svédország).

A B₂ származék immobilizálása.

A B₂ vitamin származékot a Sensor Chip CM5 felületére a következő amin csatolási reakcióval rögzítették. A karboximetil dextrans gélfelületet 0,2 M EDC:50 mM NHS hétperces impulzussal aktiválták 10 μl /perc áramlási sebességgel. Az aktivált felületre 10 mM B₂ vitamin származékot injektáltak pH 8,5-ös borát pufferben 20 perc hosszat 3 μl /perc áramlási sebességgel. Az el nem reagált helyeket azután 70 μl 1M-os pH 8,5-ös etanolamin injektálásával dezaktiválták 10 μl /perc áramlási sebességgel.

Riboflavin-kötő fehérje

Több riboflavin-kötő fehérje és antitest aktivitását vizsgálták az immobilizált ligandummal és szabad riboflavinnal szemben. A választott fehérje tyúk tojásfehérjéből izolált riboflavin kötő fehérje (RBP), ez volt az egyetlen, ahol a kötést a szabad riboflavin gátolta.

A mérés kalibrálási körülményei

Az RBP-t 1:400 arányban hígították HBS-EP pufferben és azután az injektálás előtt 8:2 (v/v) arányban összekeverték a mintával. A kevert oldatot 30 másodperc hosszát injektálták a chip felületre 40 µl/perc áramlási sebességgel. A felület regenerálására 100 mM HCl-at használtak 20 µl/perc áramlási sebességgel.

HPLC elemzés

A különböző élelmiszer mátrixok riboflavin tartalmát HPLC módszer alapján fluoreszcenciás detektálással mérték. A méréshez egy diódasoros detektorral (Agilent Technology Inc) és egy fluoreszcenciás detektorral (LaChrom, Merck-Hitachi) felszerelt Agilent 1100 HPLC-rendszert használtak. A fluoreszcenciás detektort 530 nm-re állították, a gerjesztési hullámhossz 450 nm volt. Agilent 1100 Series automata mintaadagolóval 50 µl mintát injektáltak (Agilent Technology Inc, Urdorf, Svájc). A mintát izokratikusan választották szét Nucleosil C₁₈ oszlopon (5 mm, 250x4,6 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Németország) 1,0 ml/perc áramlási sebességgel, a mozgó fázis metanol/0,5 M nátrium-acetát (30:70 v/v) volt.

Eredmények

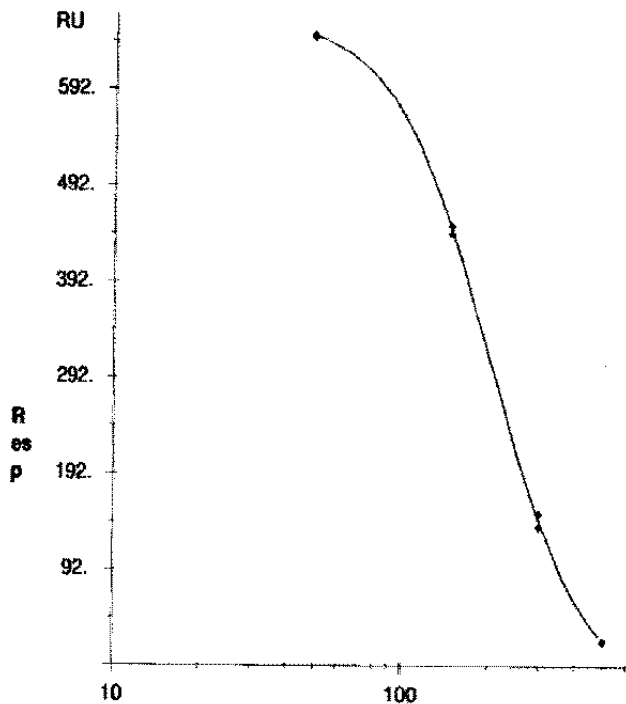
AZ RBP specificitását a flavin analógokkal, riboflavin lebomlási termékekkel és más B csoportba tartozó gyakran előforduló vitaminokkal szemben vizsgálták. A kalibrációs görbéket az 1. táblázatban felsorolt vegyületeket tartalmazó pufferben vették fel 10 µg/ml és 50 µg/ml között és a görbék inflexiós pontját (IC₅₀) hasonlították össze egy riboflavin standard görbével. Az eredményeket a riboflavin görbe inflexiós ponton kapott válasz százalékában adták meg.

Kalibrációs görbe, kimutatási (LOD) és mérési határ(LOQ)

Az 1. ábrán egy tipikus kalibrálási görbe látható, a riboflavin 50-500 ng/ml koncentrációtartományában. A görbe 150-300 ng/ml tartományban lineáris. A standard görbét vakkal vették fel a foszfát-citrát puffert 20-szor ismételve, a LOD-ra 3 mérés átlagában 12,4 ng/ml-t kaptak.

1. táblázat: AZ RBP és a flavin analógok, riboflavin bomlástermékek és más B vitaminok kereszt-reakciója

Vegyület	Keresztreaktivitás a mérésben (%)
Riboflavin 5'-monofoszfát (FMN)	18,6
Lumikrom	26,5
Lumiflavin	51,0
Flavin adenin dinukleotid (FAD)	nincs kereszt-reaktivitás
Biotin	nincs kereszt-reaktivitás
Fólsav	nincs kereszt-reaktivitás
Pantoténsav	nincs kereszt-reaktivitás
Koenzim A	nincs kereszt-reaktivitás
Tiamin	nincs kereszt-reaktivitás
Tiamin monofoszfát	nincs kereszt-reaktivitás
Tiamin pirofoszfát	nincs kereszt-reaktivitás
Tiokrom	nincs kereszt-reaktivitás



1. ábra: SPR válaszgörbe riboflavin standard oldatokkal két párhuzamosban felvéve

Riboflavin tartalom meghatározása élelmiszer és referencia mintákban

A 2. táblázatban két laboratóriumban a Biacore módszerrel kapott riboflavin koncentráció eredmények láthatók a HPLC módszerrel kapott eredményekkel összevetve.

2. táblázat: A Biacore alapú riboflavin koncentráció mérésében mutatkozó laborok közötti eltérés a HPLC-s eredményekkel összehasonlítva különböző élelmiszer-mátrixokban

Minta	Átlagérték (mg/100g) Biacore 1.labor	Átlagérték (mg/100g) Biacore 2.labor	Átlagérték (mg/100g) HPLC módszerrel
Szója alapú termék 1. csecsemőtápszer	0,966	1,07	0,97
Nestlé referencia tejpor	1,40	1,39	1,39±0,07
Szója alapú termék 2. csecsemőtápszer	0,842	1,5	0,71
Gabona alapú termék Reggeli gabona	3,10	2,52	2,04
Tej alapú termék kakaó hozzáadásával Gyerektápszer 3	1,64	1,17	0,04
Gabona alapú termék Csecsemőtápszer 4	0,714	0,82	0,60
Csecsemő gabona	0,57	0,67	0,32
Tej alapú hipoallergén termék Csecsemőtápszer 5	1,51	1,25	1,24
Kutyatáp	1,39	1,22	0,99
Egészségvédő termék	Nem mutatható ki	0,55	0,22

A 3. táblázatban olyan kísérleti eredmények találhatók, ahol a különböző élelmiszerekben a NIST által garantált B₂ vitamin tartalmat hasonlították össze a Biacore SPR technikával mért B₂ vitamin szintekkel.

A riboflavin koncentráció meghatározására alkalmazott két módszer összehasonlítása

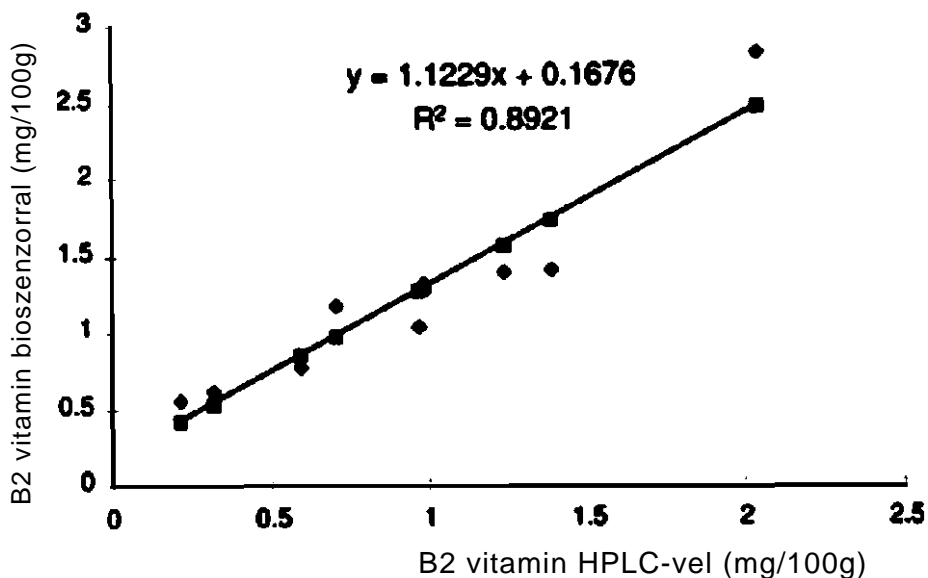
A hivatalos HPLC módszerrel és a Biacore módszerrel kapott adatokat összevetve a két módszer jó egyezést mutatott, ($R^2=0,89$) (2. ábra). A módszerek között szisztematikus hibát nem észleltek.

3. táblázat: A Biacore technikával mért B₂ vitamin szintek összehasonlítása a NIST által garantált szintekkel

Anyag	Leírás	Garantált B ₂ vitamin szint (mg/kg)*	Bioszenzorral mért B ₂ vitamin szint (mg/kg)
NIST SRM 1846	Csecsemőtápszer	16,4 ± 18,4 ^a	16,7
NIST SRM 2383	Bébitápszer keverék	2,3-3,08 ^b	3,14
NIST SRM 1546	Hús homogenizátum	1,41-2,59 ^b	1,72
NIST RM 8415	Teljes tojáspor	12 ^c	7,4
NIST RM 8435	Teljes tejpor	7,4-13,8 ^b	11,2

* Ezeket az értékeket a NIST szolgáltatta és az analízis bizonylatokban szerepelnek (amely a www.nist.gov/sm webhelyen érhető el)

^a tanúsított érték, ^b referencia érték, ^c csak információs érték.



2. ábra: B₂ vitamin koncentráció mérése:
A HPLC-vel és a Biacore módszerrel nyert adatok korrelációja

A módszer teljesítményének jellemzői

Az extrakciós pufferhez B₂ vitamint adtak úgy, hogy a végső koncentráció 150, 300 és 450 ng/ml legyen. A mintákat 10 párhuzamosban mérték és az eredményeket standard görbén interpolálták. Ezt három különböző műszeren megismételték és az eredményeket használták fel a módszer pontosságának kiszámítására az egyes koncentrációk mellett (4. táblázat)

4. táblázat: Pontossági jellemzők

	% variációs együttható 150 ng/ml-nél	% variációs együttható 300 ng/ml-nél	% variációs együttható 450 ng/ml-nél	átlagos % variációs együttható
Ismételhetőség	7,5	1,7	3,2	4,1
Laboratóriumon belüli (intermediate) ismételhetőség	4,5	4,9	12,4	7,3

Következtetések

A Biacore SPR technikán alapuló kitet különböző élelmiszertermékekre két laboratóriumban vizsgálták és házon belül validálták élelmiszerekben és egészségmegőrző temékekben, valamint különböző NIST által tanúsított mintákban. Az eredmények szoros korrelációban voltak a hivatalos HPLC módszerrel kapott eredményekkel. A vizsgálat során tesztelt élelmiszer mintákban az egyszerűsített mintaelőkészítéssel a Biacore módszer kitűnő eredményeket adott.

Ez a bioszenzor alapú SPR technika minimális mintaelőkészítést igénylő nagykapacitású gyors módszer a riboflavin koncentrációjának mérésére. A Qflex B₂ vitamin kit új termék a B csoport vitaminjainak (fólsav, biotin és B₁₂ vitamin) meghatározására kifejlesztett tesztkitek között, melyek hasonló, könnyen kivitelezhető módszerleírást tartalmaznak. Az SPR technikának nagy lehetőségei vannak a rutin laborokban, ahol naponta többféle vitaminvizsgálatot kell végezni és lényeges, hogy az egyik tesztkitről a másikra gyorsan át tudjanak állni.

A B₂ vitamin kit további validálását a közeljövőben kezdeményezik nemzetközi szinten elismert intézetekben és laboratóriumokban, hogy meghatározzák a módszer összes teljesítményjellemzőjét.

Irodalom

- Indyk, H. and McWhirter, A. Determination of vitamin concentrations in food samples by Biacore's SPR technology Biacore Journal 2:4-7 (2001)
- Journal Officiel de la Republique Francaise, Produits dietetiques et de regime: methode de dosage des vitamins B₁ et B₂