

Új irányzatok a vitaminanalitikában

Lásztity Radomír

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 2006. december 21.

Bevezetés

A vitaminok felfedezése nemcsak a táplálkozásban nyitott új fejezetet, hanem fordulatot jelentett az élelmiszeralitikában is. Míg a 20. század elején elegendő volt az élelmiszeralitikus számára néhány kémiai összetételi adat (nedvesség, fehérje, zsír N-mentes kivonat, ásványi anyag, nyersrost) megadása a minőség megállapításhoz, az első vitaminok nyomán a mai napig egyre újabb és újabb élelmiszer mikrokomponensek meghatározását igényli a gyakorlat. Gondoljunk csak a ma egyre divatosabb funkcionális élelmiszerekre vagy a táplálék-kiegészítőkre. És még itt állnak előttünk a táplálkozásgenomika (nutrigenomics) fejlődését várhatóan követő további vizsgálati igények.

Az analitikus az új komponensek vizsgálatában az adott időszakban ismert technikák alkalmazhatóságát próbálta ki. Így a kezdeti időszakban a fotometriás és ritkábban titrimetriás módszerek domináltak. A Mérnök Továbbképző Intézet tanfolyamain Vuk Mihály professzor által tartott előadások alapján készült az első magyar nyelvű vitaminanalitikával foglalkozó könyv (1942) például a következő meghatározásokat említi: C-vitamin titrimetriás meghatározása 2,6-diklór-fenol-indofenollal, A-vitamin mérése fotometriásan antimon-triklorid reagenssel, E-vitamin meghatározása fotometriásan dipiridil reagens segítségével, B1- és B2-vitamin meghatározása fluorometriásan. Fokozatosan gyakorlatilag mindegyik vitamin számára találtak egy színes vegyületet adó reagenst. Egyes esetekben, ha vitamin-készítményről vagy jellegzetes specifikus spektrummal rendelkező vitaminnal van szó, a direkt spektrofotometriás meghatározás is lehetséges. A származékképzés tovább bővítette a lehetőségeket. Példaként említhetjük a fenilhidrazon képzést az aszkorbinsavval és a dehidroaskorbinsavval, amely alkalmas mind a natív, mind az oxidált C-vitamin mennyiségi meghatározására (Spanyár et al., 1953). Hasonló a helyzet az o-fenilén-diamin származékkal, amelynek kinoxalin származéka fluorometriásan mérhető (Sullivan and Carpenter, 1993). A múlt század közepétől indult el a kromatográfiás módszerek térhódítása a papír- és réteg-gázkromatográfiától kezdve a nagynyomású folyadék kromatográfiáig. De megemlíthető a mára csaknem teljesen visszaszorult polarográfia és a főleg a B-vitamin analitikában ma is jelentős helyet elfoglaló mikrobiológiai vitamin-meghatározás is.

Jelen helyzet

Ha végiglapozunk korszerű analitikai szakkönyveket vagy folyóiratokat (a fiatal generáció az interneten található információkat) szembeűnő a HPLC módszerek dominanciája. Így például az egyik viszonylag újnak tekinthető élelmiszeranalitika könyv (Nollet et al., 1996) vitaminanalitikai fejezetében a zűíroidható vitaminok esetében kizárólag HPLC módszerek szerepelnek, és a vízoldható vitaminoknál is ezek az uralkodók. A modern kromatográfiás módszerekkel foglalkozó újabb monográfia (De Leenheer et al., 2000) is elsősorban a HPLC módszereket emeli ki. Hozzájárul ezen módszerek bővűlő alkalmazásához az is, hogy ezáltal gyakran több vitamin szimultán meghatározása válik lehetségessé. A mikrobiológiai módszerek alkalmazása – mint azt az elűbb említésre került a – B-vitaminok analitikájában számottevű. A fluorometriás meghatározás sok országban megmaradt mint referencia módszer a B1 és a B2 vitamin esetében. Ismert egy sor gázkromatográfiás módszer (Velisek és Davidek, 2000), és dűsűtött termékeknél, vitaminkészűtményeknél a fotometriás módszerek is alkalmazhatók.

Megjelentek már a bioanalitikai módszerekre (enzimes analízis, immunanalitika) épűlű vitamin-meghatározásokkal foglalkozó publikációk is.

Mi várható a közeljűvűben ?

Egy ilyen kérdésre válaszolni mindig jelentűs kockázatot jelent. Mégis vállalva a tévedés lehetőségét az én szavazatom a bioanalitikáé és a kapilláris elektroforézisé, még akkor is, ha a HPLC lehetűségei sincsenek teljesen kimerűtve. Mire alapozom ezt az állítást? Elsűsorban arra, hogy a vitamin-meghatározások iránti igény tovűbbi növekedése várható. A vitaminnal dűsűtött élelmiszerek terjedése (nem térve ki itt arra, hogy milyen mértékben van erre tényleges szűkség), a funkcionális élelmiszerek, a tápanyag-kiegészűtűk (divatja?), a táplálkozás-genomika várható fejleményei, mind ebbe az irányba mutatnak. Ugyanakkor a meghatározások szűk keresztmetszete a minta-elűkészűtű hosszadalmassága. Kétsűgtelen, hogy a mai kor technikai fejlettsége mellett minden elűkészűtű művelet automatizálható, sűt robotokkal is megoldható, mégis járhatóbb útnak látszik egyes bioanalitikai eljárások használata, amelyek gyakorlatilag elűkészűtű nélkül (vagy csekély elűkészűtűssel) a vitaminok közvetlen mérését teszik lehetővű. Természetesen egyet lehet érteni azzal a törekvűssel, hogy a fizikai munkaigényt csűkkentsűk, az analitikai labor teljesűtűképességét növeljűk, és a vegyszerfelhasználás redukálásával a környezet védjűk. A követekűzűkben – korántsem törekedve teljességre – a bioanalitika és a kapilláris elektroforézis néhány lehetőségét mutatom be.

Egy új technika a vitaminok bioanalitikájában a SPR (Surface Plasmon Resonance)

A ma uralkodó HPLC módszerek, bár maga a befejező elválasztás és a mennyiségi meghatározás viszonylag rövid időt vesz igénybe, legtöbbször hosszadalmas minta-előkészítést igényelnek, amelynek lépései, módszerei változhatnak a vizsgálni kívánt élelmiszer jellege szerint. Ugyanakkor a szigorodó élelmiszerminőségi és élelmiszerbiztonsági előírások arra kényszerítik az élelmiszer-előállítókat, hogy saját minőségbiztosító rendszerük minél rövidebb idő alatt szolgáltatson adatokat a gyártásirányításnak. Tekintve, hogy a minta-előkészítés a leginkább időigényes művelet, az előkészítés nélkül közvetlenül alkalmazható eljárások az érdeklődés középpontjába kerültek. Ilyen eljárás az SPR módszer.

A módszer elve: Alapjait tekintve az eljárás a szokásos immunanalitikai procedúrának felel meg, amelynél valamilyen specifikus szubsztrát-kötő anyag (leggyakrabban fehérje) a meghatározandó vitamint köti meg.

Már korábban ismert volt, hogy a természetben található specifikus vitamint kötő fehérjék. Mint például a biotint kötő avidin vagy a riboflavin-kötő fehérje. Ez adta az ötletet ezen jelenség felhasználására analitikai célokra. Az irodalmi források általában tojásságájából izolált riboflavin-kötő fehérjék felhasználását említik (Kalman et al., 2003; Grace and Stenberg, 2002), de elvileg bármely riboflavin- és más vitamin (biotin, folsav, B12 vitamin) antitest is felhasználható.

A módszer új vonása lényegében a megkötés folyamatának a követési módja. A tulajdonképpeni szenzor egy üvegre felvitt igen vékony fémlemez (aranylemez). Az immunanalitikai meghatározási módszer típusától függően a szenzor felületére az adott vitaminmolekulát megkötő ágenst viszik fel. Amennyiben a vizsgálandó oldatból vitamin kötődik meg a szenzor felületén, az optikai rendszer érzékeli és jelzi, regisztrálja ezt a tényt.

A módszer két kulcseleme a szenzor és a vizsgálandó mintát áramoltató mikroberendezés. Az üvegfelületen elhelyezkedő vékony aranylemez biztosítja a feltételeket az adott vitamint megkötő felületi kiképzéshez. A kötő vegyület leggyakrabban specifikus fehérje. Kötőmatrix-ként széleskörűen használatos a karboxi-metil-dextrán, amely hidrofил környezetet biztosít a fehérjének és megőrzi az immobilizált fehérjét natív állapotban.

Az áramoltató berendezéssel szemben az a követelmény, hogy a vizsgálandó anyagban jelenlevő vitamin változatlan koncentrációban jusson el a szenzor felületére. A szenzor felületén az áramlásnak egyenletesnek és reprodukálhatónak kell lennie.

Az eljárás az előkészítő műveletek elhagyhatósága következtében lényegesen gyorsabb. Mivel optikai érzékelő rendszere nem a fényelnyelés (vagy fényszórás) észlelésén alapul, nem kell a fotometriai, illetve spektrofotometriai módszereknél ismert korlátokra számítani. Zavaros és színes folyadékok vizsgálata is lehetséges. Megoldott a szenzorok regenerálása és az egész folyamat automatizálása. Más módszerekkel (elsősorban mikrobiológia eljárással) végzett összehasonlítások jó korrelációt mutattak.

Az aptamerek új lehetőségeket nyitnak meg az analitikus számára

Az aptamerek rövid oligonukletidok, amelyek nagy affinitással tudnak kapcsolódni meghatározott célmolekulákhoz. Sok esetben az aptamer affinitása a célmolekulához olyan erősségű, mint azt az antigén-monoclonális antitest kapcsolódásnál fordul elő. Specifikus aptamereket random nukleinsav könyvtárakból lehet kiválasztani (egy-egy könyvtárban akár 10^{13} - 10^{15} féle szekvencia is lehet) az általában használatos SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) eljárással. Az aptamereket legtöbbször kapcsolni lehet fluoreszcens molekulákkal, ami által igen érzékeny, és egészen kis mennyiségek meghatározására alkalmas technikák alakíthatók ki (például lézer indukált fluoreszcencia). Ilyen alapon dolgoztak ki eljárást ultra-kicsiny mennyiségben előforduló fehérjék kiválasztására és mérésére kapilláris elektroforézissel kombinálva (Zhang et al., 2006).

Az előbbieken ismertetett lehetőségek elvileg bármely vitamin meghatározására lehetőségeket nyújtanak, anélkül, hogy tovább kellene küzdeni az antitestek kísérleti állatok felhasználásával történő gyártását ellenző állatvédőkkel.

Kapilláris elektroforézis a vitaminanalitikában.

A kapilláris elektroforézist még a legújabb technikák közé sorolhatjuk, amelynek analitikai lehetőségeit még korántsem tártuk fel teljesen. Kidolgozásának kezdeteként Jorgenson és Lukacs 1981-ben megjelent publicisztikáját szokták említeni. Megfelelő körülményeket választva nemcsak a töltéssel rendelkező vitamin-molekulák választhatók el, hanem a semlegesek is. Már több mint tíz éve jelent meg közlemény több vízoldható és zsíroldható vitamin szimultán meghatározásáról MECC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography) eljárással (Ong et al., 1991).

Bimolekulák kapilláris elektroforézissel történő meghatározása a múlt század 90-es éveiben kezdett egyre jelentősebb mértékűvé válni. Jelenleg ezt az analitikai eljárást a legnagyobb gyakorisággal a klinikai analitikában alkalmazzák (Perret, 1999). A meghatározott biomolekulák között már a

90-es években megjelentek a vitaminok is, elsősorban biológiai folyadékokban, de élelmiszerekben is (Shi et al., 1995; Lambert et al., 1992; Koch et al., 1993; Wai Siang et al., 2005).

Irodalom

- Boström Caselunghe, M., Lindeberg, J. (2000) Biosensor-based determination of folic acid in fortified food. *Food Chem.* 70, 523-526
- De Leenheer, A., Lambert, W.E., Van Bocxlaer, J.F. (2000): *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. Marcel Dekker, New York-Basel
- Grace, T.A., Stenberg, E. (2002): Using surface plasmon resonance to determine vitamin concentrations. *Cereal Foods World* 47(1), 7-9
- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. (1981) Free-zone electrophoresis in capillaries. *Clin. Chem.* 27, 1551-1553
- Kalman, A., Caclen, I., Trisconi, M.J. (2003): Quantitative analysis of vitamin B2. *New Food*, Issue 4, 26-31.
- Koh, E.V., Bisseli, M.G., Ito, R. K., Measurement of vitamin C by capillary electrophoresis in biological fluids and fruit beverages using a stereoisomer as an internal standard. *J. Chromatography* 633, 245-250
- Lambert, D., Adjalla, C., Felden, F., Benhayoun, S., Nicolas, I.P., Gueant, J.L. (1992): Identification of vitamin B12 and analogues by high-performance capillary electrophoresis and comparison with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 608, 311-315
- Ong, C. P., Ng, C. I., Li SFY (1991): Separation of water and fat-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography. *J. of Chromatography* 547, 419-428
- Perret, D. (1999): Capillary electrophoresis in clinical chemistry. *Ann. Clin. Biochem.* 36, 133-150
- Shi, H. I., Ma, Y.F., Humphrey, J. H., Craft, N. E. (1995) Determination of vitamin-A in dried human blood spots by high-performance capillary electrophoresis with laser excited fluorescence detection. *J. Chromatography B. Biomed. Appl.* 665, 89-96
- Spanyár P., Kiszél M., Demel I. (1953): Aszkorbinsav és dehidroaszkorbinsav meghatározása reduktonok jelenlétében. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 59, 143-147
- Sullivan, D. M., Carpenter, D. E. eds. (1993): *Vitamin C in : Methods of Analysis for Nutritional Labelling*, AOAC Int., Arlington, pp. 561-568
- Velisek, J., Davidek, J. (2000): Pantothenic acid. In: *Modern Chromatographic Analysis of vitamins*, a.p. De Leenheer, W. E. Lambert and J. F. Van Bocxlaer, eds. Marcell Dekker Inc., New York-Basel, pp. 555-600
- Vuk M. (1942): *Vitaminok és a vitaminok sorsa konzerválás közben*. Mérnök Továbbképző Intézet, Budapest
- Wai Siang Law, Kuban, P., Ian Hong Zhao, Sam Fong Jau Li, Hauser, P. C (2005): Determination of vitamin C and preservatives in beverages by conventional capillary electrophoresis and microchip electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 26, 3648-3655
- Zhang, H., Quiang Zhao, Chris Le X. (2006): Ultrasensitive protein detection. Use of aptamers as probes. *Bioforum* 10 (6) 22-24