

Élelmiszerek vitamintartalmának meghatározása nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC)¹

BOGNÁR ANTAL* és MOLNÁR PÁL**

* Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Stuttgart
** Allategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Központ, Budapest

Érkezett: 1985. október 31.

A legtöbb vitamin kémiai összetételénél fogva fényvel, oxigénnel és hővel szemben érzékeny anyag. Az élelmiszerekben előforduló egyéb anyagok mennyiségével összehasonlítva a vitaminkoncentráció igen alacsonynak mondható. Ezért természetes, hogy a meghatározási módszerek sokszor bonyolultak és nem a legpontosabbak. A több mint 10%-os eltérések igen gyakoriak a klasszikus kémiai és mikrobiológiai vitaminanalitikában. Egy közelmúltban lezárt B₁-vitamin körvizsgáltnál, amelyben 10 laboratórium vett részt, a kapott eredmények 15%-os szórást mutattak annak ellenére, hogy a minták egyneműsítettek voltak, az alkalmazott tiokrómmódszer pedig DIN szabványban már korábban rögzített eljárás. Így nem véletlen, hogy jelenleg még alig van nemzetközileg is elismert vitaminanalitikai standard módszer annak ellenére, hogy az élelmiszerek minősítése és a nemzetközi élelmiszerkereskedelem ezt már hosszabb idő óta igényli.

A nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC) fejlődése, az érzékeny UV és leginkább a fluoreszcenciás detektorok használata az utóbbi években lehetővé tette számos új vitaminanalitikai módszer kidolgozását. Ezek az eddig használt klasszikus módszereknél gyorsabbak és pontosabbak. Tapasztalataink szerint a HPLC alkalmazása a vitaminpreparátumok analízisének nagyon jól bevált, az élelmiszerek vitamintartalmának meghatározására azonban közvetlenül nem minden esetben adaptálható. A tulajdonképpeni HPLC-méréshez a vitaminokat az élelmiszerekből ki kell vonni, a koncentráció növelése érdekében pedig további extrahálásra, valamint dúsításra van szükség. Ezek a következő tényezőktől függenek:

- a vitamin fajtájától,
- az élelmiszer típusától,
- a vitamin mennyiségétől és
- a választott detektálási módszertől.

A vitaminok érzékenysége, bomlékonysága folytán az alkalmazott analitikai műveleteket megfelelő körülményekkel kell végezni, szükség esetén fény és oxidáló hatású anyagok kizárásával. Az analízisnek sok esetben előfeltétele, hogy a természetben előforduló vitaminszármazék a feltárás alatt felszabaduljon. Így a legtöbb élelmiszerben a B₁, B₂ és B₆ vitaminok egyrésze foszfáthoz kötött formában van jelen, feltárásuk ezért enzimes hidrolízis nélkül nem teljes. Az utóbbi években a vitaminok meghatározására rendkívül sok HPLC-módszert dolgoztak ki és közöltek a nemzetközi szakirodalomban. Ebben a dolgozatban ezek közül csak azokról a módszerekről számolunk be, amelyek az élelmiszerek rutin vizsgálatánál a Szövet-ségi Táplálkozástudományi Kutatóintézet laboratóriumában a gyakorlatban is beváltak.

¹ Az Élelmiszer-minőségellenőrzés VI. Tudományos Konferenciáján Zalaegerszegen, 1985. október 22-én elhangzott előadás alapján.

A-vitamin meghatározása

Az eredetileg az A-vitaminnal dúsított tápszerek vizsgálatára kidolgozott módszer azon alapszik, hogy az észter formában kötött A-vitamint alkoholos káliumhidroxiddal felszabadítjuk, majd n-hexánnal vagy petroléterrel extraháljuk. Az extraktum bepárlása után a maradékot a HPLC eluensben feloldjuk és megfelelő koncentrációra hígítjuk.

Az A-vitamin meghatározása HPLC segítségével élelmiszerekben a következő lépésekben végezhető el:

I. Mintaelőkészítés

1. Elszappanosítás
2. Extrakció
3. Bepárlás
4. Mintaoldat elkészítése

II. HPLC mérési körülmények

Készülék: Waters M 590

Oszlop: Anyag: rozsdamentes acél

Hossza: 15 cm

Belső átmérője: 4 mm

Töltet: Spherisorb ODS 5 μm

Eluens: metanol – víz (98:2)

Áramlási sebesség: 1,5 cm³/min (all transz- és 13-cisz A-vitamin-alkohol)

Injektált mintaoldat térfogat: 2 – 50 μl

(50 – 300 ng A-vitamin-alkohol)

Detektor: UV-fotométer 325 nm vagy

fluorométer gerjesztési hullámhossz: 325 nm

emissziós hullámhossz: 470 nm

III. Kiértékelés

HP integrátorral a görbe alatti terület alapján

Külső standard módszer

A módszer alkalmazhatóságát A-vitamin-palmitáttal, illetve -acetáttal dúsított zabpehelyen, tejporon, valamint egyéb élelmiszereken mint pl. sertésmájon, tojáson, tejen és margarinton próbáltuk ki.

A módszer reprodukálhatóságát egy körvizsgálat keretében vizsgálták meg, amelyben 13 laboratórium – köztük a Szövetségi Táplálkozástudományi Kutatóintézet laboratóriuma – vett részt. Az eredmények statisztikai értékelése azt mutatta, hogy a módszer jól reprodukálható és kellően megbízható. Ezért a módszer bekerült az NSZK Élelmiszervizsgálati Módszertkönyvébe (1).

A módszer mind a természetben előforduló, mind pedig az élelmiszerekhez dúsítás céljából hozzáadott A-vitamin mennyiségének meghatározására alkalmas.

B₁-vitamin (tiamin) meghatározása

A tiamint az élelmiszerekből savas (0,2n H₂SO₄) és enzimes hidrolízissal szabadjuk fel. Az oldhatatlan részek leszűrése után a tiamint lúgos oldatban káliumhexacianoferrát (III-)al tiokrómmá oxidáljuk. Ez utóbbit izo-butanollal a vizes oldatból extraháljuk. Az extraktumot Lichrosorb RP 8 oszlopon kromatografáljuk és az elválasztott tiokrómot fluorometriásan meghatározzuk.

A tiamin (B₁-vitamin) meghatározása HPLC segítségével élelmiszerekben a következő lépésekben végezhető el:

I. Minta-előkészítés

1. Homogenizálás, konzerválás
2. Savas feltárás (0,2 n H₂SO₄, 15 min, 120 °C)
3. Enzimatiskus hidrolízis (15 óra 37 °C)
4. Tiokróm reakció

II. HPLC mérési körülmények

Készülék: Perkin Elmer LC 601
Oszlopok: Anyaga: Rozsdamentes acél

Hossza: 8, ill. 25 cm
Belső átmérője: 4,6 mm
Töltet: Lichrosorb RP 8 10 μm

Eluens: metanol – acetonitril – ISO-butanol (80:10:10)

Áramlási sebesség: 2 cm³/min

Retenció idő: 2,25 min

Injektált mintaoldat térfogata: 50 μl (1 – 10 ng tiaminklorid)

Detektor: Spektrofluorométer (Kontrom SMF 23)

Gerjesztési hullámhossz: 425 nm

Emissziós hullámhossz: 370 nm

III. Kiértékelés

HP integrátorral a görbe alatti terület alapján

Külső standard módszer

Az ismertetett módszert eddig 60 különböző élelmiszer B₁-vitamintartalmának meghatározásánál próbáltuk ki (1. táblázat). Az analitikai eredmények jól reprodukálhatók. A mintákhoz adott tiamin 94 – 105%-ban volt kimutatható. A legkisebb meghatározható mennyiség 5 μg tiamin 100 g élelmiszerben. A kidolgozott vizsgálati módszer aránylag egyszerű és megbízható. Egy munkaerő naponta – amennyiben a minták már enzimesen hidrolizálva vannak – 12–20 vizsgálatot tud elvégezni. A HPLC oszlop több mint 3000 vizsgálathoz használható fel.

B₂-vitamin (riboflavin) meghatározása

A riboflavint élelmiszerekből a tiaminéhoz hasonló módon szabadítjuk fel. A hidrolízis után a leszűrt oldatot közvetlenül a HPLC oszlopra adjuk és az elúció után fluorometriásan meghatározzuk.

A riboflavin (B₂-vitamin) meghatározása HPLC segítségével élelmiszerekben a következő lépésekben végezhető el:

I. Minta-előkészítés

1. Homogenizálás, konzerválás
2. Savas feltárás (0,2 n H₂SO₄, 15 min, 120 °C)
3. Enzimatiskus hidrolízis (15 óra, 37 °C)

II. HPLC mérési körülmények

Készülék: Perkin-Elmer LC 601
Oszlopok: Anyaga: Rozsdamentes acél

Hossza: 8, ill. 25 cm
Belső átmérője: 4,6 mm
Töltet: Lichrosorb NH₂ 10 μm

Eluens: metanol-Na-acetát puffer pH = 4,5 (50:50)

Áramlási sebesség: 2 cm³/min

Retenció idő: 2,3 min

B₁-vitamin (tiamin) kimutatása élelmiszerekben HPLC-analízissel

Élelmiszer	Hozzáított tiamin μg/100 g minta	HPLC-módszer						Hagyományos módszer ¹					
		Tiamintartalom μg/100 g minta				Visszanyerési arány %		Tiamintartalom μg/100 g minta				Visszanyerési arány %	
		n	\bar{x}	s	v	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s	v	\bar{x}	s
Nyers karfiol	—	6	49	2	4	—	—	3	47	4	9	—	—
	30	6	94	2	2	98	2	3	88	4	5	91	5
Főtt burgonyagombóc	—	4	85	4	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	60	4	146	4	3	102	3	—	—	—	—	—	—
Burgonyapüré	—	3	58	1	2	—	—	3	55	3	5	—	—
	30	3	87	3	3	97	5	3	82	4	4	90	5
Sós burgonya (mélyhűtött)	—	1	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	50	1	97	—	—	104	—	—	—	—	—	—	—
Nyers sertéshús	—	6	807	56	7	—	—	3	800	65	8	—	—
	600	6	1410	112	8	101	3	3	1382	75	5	97	3
Liofilizált sertéshús	—	10	2720	190	7	—	—	5	2850	342	12	—	—
	1490	7	4260	213	5	103	—	5	4570	686	15	115	—
	3040	7	5580	167	3	94	—	5	5170	1240	24	76	—

¹ Rettenmaier szerint (5) \bar{x} = számtani középérték; s = szórási; v = relatív szórási (%)

Injektált mintaoldat térfogata: 50 μg (2–10 ng riboflavin)
Detektors: Spektrofluorométer (Kontrom SMF 23)
Gerjesztési hullámhossz: 467 nm
Emissziós hullámhossz: 525 nm

III. Kiértékelés

HP integrátorral a görbe alatti terület alapján
Külső standard módszer

A módszert a legkülönbözőbb élelmiszerek vitamintartalmának meghatározására alkalmaztuk (2. táblázat). A kimutatás alsó határa 5 μg riboflavin 100 g élelmiszerben. Vizsgálataink bizonyították, hogy a HPLC-vel történő riboflavin-meghatározás a klasszikus humiflavin módszernél jóval egyszerűbb és pontosabb. Egy munkaeő naponta kb. 20 vizsgálatot tud elvégezni. Automatikus mintafeladó használatával ez a szám akár a többszörösére is növelhető.

B₆-vitamin meghatározása

A B₆-vitamin hatású vegyületek a piridoxin (PN), piridoxamin (PM), piridoxál (PL) és ezek foszforsav észterei az élelmiszerekből 0,2 n kénsavas hidrolízissel tárhatók fel. A leszűrt extrakciós oldat közvetlenül a Spherisorb ODS oszlopra adható és 0,08 n kénsavas eluennel a piridoxamin, a piridoxin és a piridoxál egymástól elválasztható. A koncentráció fluoreszcenciás detektorral mérhető.

A B₆-vitamin meghatározása HPLC segítségével élelmiszerekben a következő lépésekben végezhető el:

I. Minta-előkészítés

1. Homogenizálás, konzerválás
2. Savas feltárás
3. Ultraszűrés

II. HPLC mérési körülmények

Készülék: Waters M 590 (WISP 710 B)

Oszlopok: Anyaga: Rozsadmentes acél

Hossza: Előoszlop 10 cm, főoszlop 25 cm

Belső átmérő: 4 mm

Töltet: Spherisorb ODS (Phase Sep England) 10 μm

Eluens: I. 0,08 n H₂SO₄ II. Metanol – Víz (95:5) mosóoldat

Áramlási sebesség: I. 2 cm³/min II.: 3 cm³/min

Retenciós idők: Piridoxamin: 1,9 min

Piridoxál: 5,8 min

Piridoxin: 8 min

Injektált mintaoldat térfogata: 50 μl ultraszűrt oldat

(2–20 ng piridoxamin, piridoxal vagy piridoxin)

Detektor: Fluorométer gerjesztési hullámhossz: 290 nm

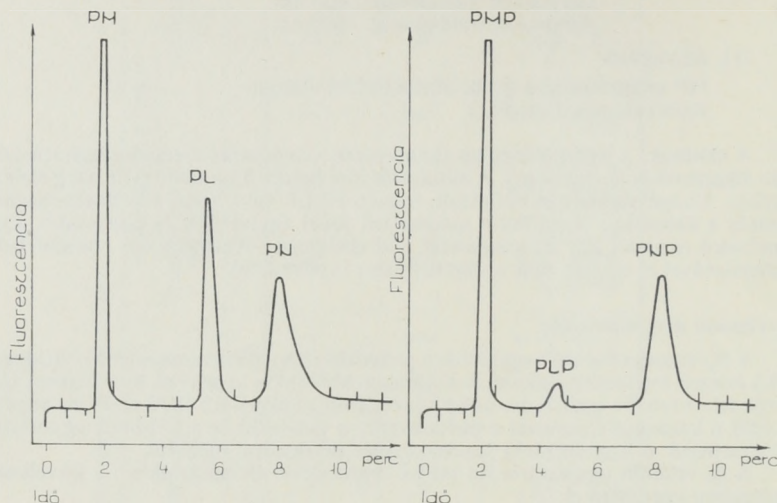
emissziós hullámhossz: 395 nm

III. Kiértékelés

HP integrátorral a görbe alatti terület alapján
Külső standard módszer

A hat különböző B₆-vitamin derivát kromatogrammjából – amint azt az 1. ábra is szemlélteti, jól látható, hogy az előzőekben ismertetett HPLC körülmények között a szabad piridoxamin és a piridoxin retenciós ideje azonos a foszforsav észterével. A piridoxál és a piridoxálfoszfát azonban különböző kromatográfiai tulaj-

1. ábra B₆-vitaminszűrőanyagok kromatogramja.



donságot mutat. A B₆-vitamin derivátumok fluoreszcenciás aktivitása eltérő, így a kvantitatív meghatározás alapfeltétele a különböző származékok kvalitatív elválasztása.

A legtöbb élelmiszerben előforduló egyéb anyag, mint pl. a purin- és pirimidinbázisok ilyen feltételek mellett szintén fluoreszkálnak és a kromatográfiai oszlopról vizes eluenssel csak lassan moshatók le. Az analízisidő lerövidítése céljából ezért ajánlatos az oszlop alkoholos mosása, így egy minta analízise kb. 30 percet vesz

3. táblázat

B₆-vitamin kimutatása élelmiszerekben HPLC-analízissel

Élelmiszer	n	B ₆ -vitamin a)			
		μg/100 g minta		Visszanyerési arány (%) b)	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s
Marhahús	3	248	10	100	2
Sertéshús	5	570	13	99	6
Tojás	4	85	9	—	—
Burgonya	7	79	10	100	5
Zöldborsó (gyorsfagyasztott)	4	293	38	100	—
Fejes saláta	3	57	3	101	5
Búzaliszt	3	244	15	98	3
Tejbedara (gyermekétel) ...	3	824	25	118	5
Csokoládemassza	4	4009	162	100c)	3

a) Piridoxamin (PM), piridoxal (PL) és piridoxin (PN) összege piridoxinra számítva

b) 15–100 μg PM, PL és PN/100 g minta a feltárás előtt hozzáadva

c) Hozzáadott piridoxin az előállító adata alapján

B₂-vitamin (riboflavin) kimutatása élelmiszerekben HPLC-analízissel

Élelmiszer	Hozzáított riboflavin μg/100 g minta	HPLC-módszer						Hagyományos módszer ¹					
		Riboflavin-tartalom μg/100 g minta				Visszanyerési arány %		Riboflavintartalom μg/100 g minta				Visszanyerési arány %	
		n	\bar{x}	s	v	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s	v	\bar{x}	s
Nyers karfiol	–	3	86	5	6	–	–	1	84	–	–	–	–
	30	3	117	6	5	103	–	–	–	–	–	–	–
Burgonyapüré	–	3	71	3	4	–	–	3	74	6	8	–	–
	ismeretlen 70	3	451	8	2	–	–	3	460	10	2	–	–
		3	140	5	4	99	3	–	–	–	–	–	–
Főtt rizs	–	3	17	1	6	–	–	3	18	1	5	–	–
	20	3	37	3	8	100	–	3	–	–	–	–	–
Főtt burgonya	–	3	28	1	4	–	–	3	27	3	11	–	–
	30	3	57	2	4	97	–	3	56	4	7	97	4
Nyers sertéshús	–	5	250	4	2	–	–	5	237	9	4	–	–
	200	5	446	4	1	98	2	5	427	14	3	95	6
Teljes kiőrlésű lisztből készült kenyér	–	3	293	5	2	–	–	2	276	10	4	–	–
	200	3	489	3	1	98	1	–	–	–	–	–	–

¹ Lumiflavin-módszer \bar{x} = számtani középérték; s = szórás; v = relatív szórás (%)

igénybe. A módszer eddig számos élelmiszer B₆-vitamintartalmának meghatározására eredményesen alkalmaztuk (3. táblázat). Az élelmiszerekhez adott vitamint 94-től 102%-ban sikerült a mintákban kimutatni. A kvalitatív analízis alsó kimutatási határa PM esetén 5 µg; PL, ill. PN esetén 10 µg/100 g élelmiszerben. A klaszszikus mikrobiológiai módszernél a HPLC-vel történő B₆-vitamin-meghatározás jóval pontosabb és reprodukálhatósága is jobb. Az oszlop kb. 1000 vizsgálathoz használható fel.

Az előzőekben vázolt módszereket a szakirodalom részletesen ismerteti (2,3). Különösen ajánlható egy, a közelmúltban megjelent vitaminanalitikai módszereket tartalmazó angol nyelvű könyv (4), melyben a HPLC-módszerek előkelő helyet kaptak.

Összefoglalva megállapítható, hogy a vitaminok analízise HPLC segítségével az utóbbi időben széles körben elterjedt. A HPLC-módszer legfontosabb előnyeiként a gyorsaság, a jó reprodukálhatóság sorolható fel. Hátránynak a berendezések magas ára tekintendő, de ez megfelelő kihasználtsággal kompenzálható.

I R O D A L O M

- (1) Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Teil 4. L49.00-3 Beuth Verl. Berlin – Köln 1985
- (2) *Bognár, A.*; Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Deutsch. Lebensm.-Rundschau 77 (1981) 12, 431 – 436
- (3) *Bognár, A.*; Bestimmung von Vitamin B₆ in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) Z. Lebensm. Unters. Forsch. 181 (1985), 200 – 205
- (4) *Brubacher, G., Müller-Mulot, W. and Southgate, D. A. T.*; Methods for the Determination of Vitamins in Foods Appl. Science Publ. Essex 1985.
- (5) *Rettenmaier, R., J. P. Vuilleumier, w. M. Müller-Mulot*; Zur quantitativen Vitamin-B₁ – Bestimmung in Nahrungsmitteln und biologischem Material. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 168 (1979), 120

ÉLELMISZEREK VITAMINTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)

Bognár Antal és Molnár Pál

A szerzők bemutatják az élelmiszerekben levő és hozzáadott vitaminok meghatározására kidolgozott, illetve adaptált HPLC-analízis fontosabb módszereit. A vizsgált mintákban a HPLC-módszerrel és valamelyik elfogadott hagyományos eljárással mért természetes és hozzáadott A, B₁, B₂ és B₆ vitamintartalmat táblázatosan hasonlították össze. A HPLC-módszer előnye a gyorsaság, a jó reprodukálhatóság és az automatizálhatóság, ami különösen a sorozatvizsgálatokhoz szükséges.

DETERMINATION OF VITAMIN CONTENT OF FOOD BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

A. Bognár and P. Molnár

The important elaborated and adopted HPLC methods for determination of vitamins either present in foods or added to them are discussed by the authors. Natural or added A, B₁, B₂ and B₆ vitamin contents of the examined samples measured by a conventional and an HPLC method are compared in tables. The advantages of the HPLC method are quickness, good reproducibility and easy automatization, which are highly important especially in routine examinations.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИН С ПОМОЩЬЮ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ (HPLC)

А. Богнар и П. Молнар

Авторы познакомили с наиболее важными условиями анализа HPLC, разработанного для определения содержания находящихся в продуктах и добавленных к продуктам витамин. Авторами, в табличной форме, приведено сравнение количеств витамин А, В₁, В₂, В₆, содержащихся в анализируемых пробах продуктов и добавленных к ним, которые были определены традиционным методом и методом HPLC.

Преимущество метода HPLC заключается в быстроте и хорошей воспроизводимости, а также в возможности автоматизации испытаний, что является необходимым для проведения серийных испытаний.

BESTIMMUNG DES VITAMINGEHALTES IN LEBENSMITTELN MIT DER HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Bognár, A. und P. Molnár

Verfasser geben die wichtigsten Bedingungen der für die Bestimmung von in Lebensmitteln vorhandenen und zugesetzten Vitaminen ausgearbeiteten bzw. adaptierten HPLC-Analysen-methode. Der Gehalt an Vitaminen A, В₁, В₂ und В₆ in den mittels HPLC- und eines traditionellen Verfahrens untersuchten Proben wurde tabellarisch verglichen. Vorteile der HPLC-Methode sind die Schnelligkeit, gute Reproduzier- und Automatisierbarkeit, die insbesondere für Serienuntersuchungen notwendig sind.