

Zsírban oldódó A-, D2-, D3-, E- és K3-vitaminok meghatározása izotóphígítással és LC-MS/MS műszeregyüttessel

Kulcsszavak: vízben oldódó és vízben nem oldódó vitaminok, vitamerek, koenzimek, kofaktorok, napi beviteli érték (RDI – Recommended Daily Intake), izotóphígítás

1. ÖSSZEFOGLALÁS

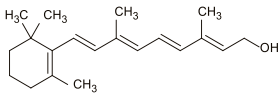
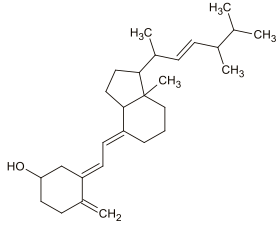
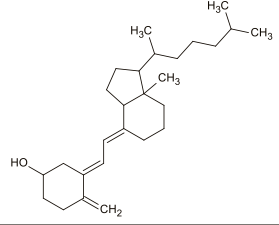
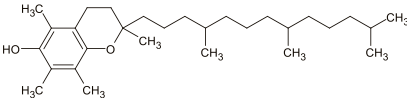
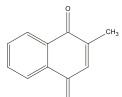
Közleményünk célja élelmiszerekben (búzáliszt, üdítő, pezsgőtabletta) és étrendkiegészítőkben alacsony mennyiségben előforduló zsírban oldódó A-, D2-, D3-, E-vitaminok teljes (természetes eredetű és hozzáadott) meghatározása folyadékkromatográfiás tandem tömegspektrometriai (LC-MS/MS) módszerrel. A mintákat a célkomponensek izotópjelölt származékaival hígítottuk (A-vitamin-d6, D2-vitamin-d3, D3-vitamin-d3, E-vitamin-d6), majd az extrakciót és szappanosítást követően folyadék-folyadék extrakcióval tisztítottuk azokat. Egy oldószercserét követően C8-as HPLC oszlopon savas mozgófázisok (0,1% hangyasav vízben/metanolban) alkalmazásával és LC-MS/MS technikával határoztuk meg a vitaminok koncentrációját. Táplálék kiegészítőkben fontos lehet a zsírban oldódó K3-vitamin vizsgálata is, mert a K3-vitamin alkalmazása humán készítményekben jelenleg nem engedélyezett. A K3-vitamin meghatározása során szappanosításra nincs szükség, szerkezetéből adódóan a lúgos hidrolízis a K3-vitamin bomlásához vezetne, így ezt a komponenst egy, a többi vitamintól eltérő módszerrel vizsgáltuk. A K3-vitamin kis mennyiségben történő LC-MS/MS jellegű vizsgálata a K3-vitamin MS készülékben mutatott alacsony érzékenysége miatt bonyolultabb, mint a többi vitaminé. A K3-vitamin meghatározását ezért L-ciszteinnel, mint származékképző reagenssel történő kémiai származékképzést követően végeztük, szintén izotóphígítással és LC-MS/MS technikával. A módszereket laboratóriumon belüli validálását követően hazai és nemzetközi körvizsgálatokban sikeresen alkalmaztuk csecsemő tápszerben és folyékony vitamin készítményben.

¹ Bálint Analitika Kft.

2. Bevezetés

A vitaminok olyan szerves molekulák, melyek az emberi és állati szervezet működéséhez elengedhetetlenül fontosak. Szükségesek a sejtállomány gyarodásához, illetve fenntartásához, bizonyos szervek hibátlan működéséhez, a normál anyagcsere fenntartásához [1]. A vitaminok összetett szerves molekulák, amelyeknek szerkezete, illetve a szervezetben betöltött funkciója egymástól nagyon eltérő, ezért a legegyszerűbb, ha oldhatóságuk alapján csoportosítjuk őket. Ennek alapján megkülönböztetünk vízben-, és zsírban oldódó vitaminokat [1]. Vízben oldódó vitaminok a C-, és B-vitaminok. Ezeket a vitaminokat a szervezet nem képes sokáig tárolni, többnyire a vizelettel ürülnek a szervezetből, ezért szükséges naponta pótolni a megfelelő mennyiségben őket. Zsírban oldódó vitaminok: A-, D-, E- és K-vitaminok (1. táblázat).

1. táblázat. A vizsgált A-, D2-, D3-, E- és K3-vitaminok szerkezete, triviális neveik és fontosabb fizikai-kémiai jellemzőjük.

A vizsgált vitamin szerkezeti képlete	Triviális név	Molekulatömeg g/mol	LogP
	A-vitamin (retinol)	265,5	5,7
	D2-vitamin (calciferol)	396,7	7,5
	D3-vitamin (cholecalciferol)		7,5
	E-vitamin (alfa-tokoferol)	430,7	12,2
	K3-vitamin (menadion)	180,2	2,2

Ellentétben a vízben oldódókkal, ezeket a vitaminokat a szervezet akár hónapokig is képes tárolni. A vitaminokat a változatos táplálkozással tudjuk bevinni szervezetünkbe.

Megkülönböztetünk természetes, az élelmiszerekben előforduló vitaminokat és szintetikus, az élelmiszerekhez adalékolt vitaminokat. Sajnos az utóbbiak nem tudnak úgy hasznosulni, mint a természetes formájuk, illetve csökkentik más tápanyagok hasznosulását, és a vesét is megterhelik. A mintákhoz adalékolt vitaminok mellett ugyanis nincsenek a felszívódáshoz szükséges enzimek, koenzimek, kofaktorok, ellentétben az élelmiszerekben természetesen előfordulókkal. A 1169/2011/EU rendelet XIII. melléklete alapján a felnőttek számára ajánlott napi vitamin és ásványi anyag beviteli referencia értékek A-vitamin vonatkozásában 800 µg/nap, D-vitamin esetén 5 µg/nap, E-vitamin vonatkozásában 12 mg/nap és K-vitamin esetén 75 µg/nap [2]. A K3-vitamint állattenyésztésben alkalmazzák, a takarmányokhoz adalékolják [3]. viszont A K3-vitamin emberi fogyasztásra szánt élelmiszerekhez nem keverhető így étrend-kiegészítőkből sem fordulhat elő [12]

A vitaminok vizsgálatánál fontos jelezni, hogy az élelmiszerhez adott vitamin vizsgálatáról van-e szó vagy a teljes vitamintartalom meghatározásáról. A természetben előforduló B-vitaminok és vitamerek ugyanis sokszor kötött formában vannak jelen a mintában, melyből hidrolízissel vagy enzimikus előkészítéssel lehet őket felszabadítani [4]. Zsírban oldódó vitaminok esetén ugyanakkor a minta-előkészítés mindig tartalmaz szappanosítási lépést, mely során felszabadulnak kötött formájukból a vitaminok így lehetőség nyílik a teljes vitamintartalom meghatározására [5],[6],[7],[8],[9]. Jelen dolgozatban zsírban oldódó vitaminok meghatározásával foglalkozunk.

A vitaminok vizsgálatát szabvány szerint folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel kell végezni, optikai detektorral (HPLC-UV). Ezek a szabványok magas koncentrációban (>mg/100g) előforduló vitaminok meghatározását tartalmazzák. A kisebb koncentrációban (µg/100g) előforduló vitaminok vizsgálatához vagy hosszadalmasabb és bonyolultabb előkészítésre van szükség, amelynek során nagyfokú mintatisztítást és dúsítást végzünk (pl. preparatív HPLC-vel) [5],[6],[7],[8],[9], vagy olyan mérés technikát kényszerülünk alkalmazni, amely lehetővé teszi a komplex mátrixok vizsgálata során is a célkomponensek szelektív meghatározását. Ilyen kapcsolt technika a folyadékkromatográfia – tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS), melyet izotóphígítással alkalmazva a vizsgált vegyületek koncentrációja nagy pontossággal meghatározható. Izotóphígítás során a mintákat a célkomponensek izotópjelölt (²H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O) analógjaikkal, mint belső standardokkal (internal standard, ISTD) adalékolunk és keverünk el homogén módon. Ezen ISTD-k kompenzálják a célkomponensek veszteségeit mind a minta-előkészítés, mind a műszeres vizsgálat során [4]. Laboratóriumunk elkötelezett az izotópjelölt ISTD-k használata mellett, ezért olyan LC-MS/MS módszert dolgoztunk ki zsírban oldódó vitaminok kismennyiségű meghatározására, mely az összes izotópjelölt analógot (vitaminok deuterált vegyületeit) tartalmazza. A közleményünk célja zsírban oldódó vitaminok (A, D2, D3 és E) búzalisztból, üdítőből, pezsgőtablettából és étrend-kiegészítőből történő meghatározása LC-MS/MS műszeregyüttessel, illetve a módszer validálása és alkalmazása. További célunk volt a K3-vitamin étrend-kiegészítőkből történő meghatározására LC-MS/MS módszer kidolgozása, mely során a megfelelő érzékenység eléréséhez kémiai származékképzést próbáltunk ki.

3. Anyag és módszer

3.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A vitaminok (A, D2, D3, E és K3) analitikai minőségű standardjait, az izotópjelölt analógok közül a D2-vitamin-d3-at, D3-vitamin-d3-at, E-vitamin-d6-ot és K3-vitamin-d8-at, az L-ciszteint, aszkorbinsavat, nátriumhidroxidot, az Ascentis Express C8 (100 x 3 mm, 2,7 µm) HPLC oszlopot, a HPLC minőségű oldószereket és a hangyasavat a Sigma-Merck Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. Az A-vitamin-d6-ot a Cambridge Isotope Laboratories-től (Andover, MA, USA) rendeltük. A standardokat (A-vitamin kivételével) és az E-vitamin-d6, K3-vitamin-d8 belső standardokat etilalkoholban oldottuk, úgy hogy koncentrációjuk 1 mg/mL legyen. Az oldatokat hűtőben +4 °C-on legfeljebb fél évig tároltuk. A D2-vitamin-d3 (100 µg/mL metanolban) és D3-vitamin-d3 (1000 µg/mL metanolban) jelzett standardok oldat formában érkeztek. Az A-vitamint és az A-vitamin-d6-ot 0,1% (m/v) butil-hidroxitoluolt (BHT) tartalmazó metanolban oldottuk (1 mg/mL) és -18 °C-on legfeljebb fél évig tároltuk. A kalibrációhoz 10 µg/mL-es standard keveréket (A, D2, D3, E) és 10 µg/mL-es egyéni K3 standard oldatot készítettünk metanolban és hűtőben +4 °C-on 3 hónapig tároltuk. A belső standardokból 20 µg/mL-es ISTD standard keveréket (A-vitamin-d6, D2-vitamin-d3, D3-vitamin-d3, E-vitamin-d6) és 10 µg/mL-es egyéni K3-vitamin-d8 ISTD standard oldatot készítettünk metanolban és hűtőben -18 °C-on legfeljebb 3 hónapig tároltuk.

Az LC-MS/MS vizsgálatokhoz Shimadzu Nexera UHPLC LC-30AD folyadékkromatográfiás rendszert használtunk, amely egy SIL-30AC auto samplert, CTO-20AC kolonna termosztátot és egy CBM-20A communications bus module-t (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) foglalt magában. Az UHPLC-hez kapcsolt hármass kvadrupol tömegspektrométer egy IonDrive Turbo V Source ionforrással rendelkező AB Sciex 6500+ QTRAP volt és egy Turbo V Source ionforrással szerelt 6500 QTRAP készülék (a két rendszert felváltva használtuk). A mérő szoftver Analyst (1.7.1) és a mennyiségi meghatározáshoz használt szoftver MultiQuant (3.0.3) volt (Sciex; Warrington, Cheshire, UK).

Az extrakcióhoz használt rázó gép egy CAT S50 flask shaker (M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, Németország) volt. A minták bepárlásához a TurboVap II (Biotage, Uppsala, Svédország) típusú bepárlót használtunk. A folyékony vitamin táplálék kiegészítő körvizsgálati és reggeliző pehely minőség ellenőrző (quality control, QC) mintákat a FAPAS-tól (Food Analysis Performance Assessment Scheme, Sand Hutton, UK) rendeltük, illetve a csecsemőtápszer körvizsgálati mintát a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivataltól (NÉBIH, Budapest, Magyarország) rendeltük.

3.2. Minta-előkészítés A-, D2-, D3- és E-vitaminok meghatározására

A vizsgálat búzalisztból, üdítőből, pezsgőtablettából és étrend-kiegészítőből történt. 1,00 g homogén mintát mértünk 60 mL-es üvegcsövekbe és 50 µL 20 µg/mL-es ISTD oldatot (A-vitamin-d6, D2-vitamin-d3, D3-vitamin-d3, E-vitamin-d6) pipettáztunk rájuk, majd 20 mL etanolt és 5 mL desztillált vizet adtunk hozzájuk. Ezt követően 0,5 g aszkorbinsavat és 5 mL 12,5 M nátriumhidroxid oldatot mértünk a mintákra. A mintákat 60°C-on mágneses kevertetőn kevertettük másfél óráig. Az extrakciót/szappanosítást követően a mintákat hagytuk szobahőmérsékleten lehűlni, majd 5 mL desztillált vizet és 5 mL n-hexánt adtunk a mintákhoz. A mintát 1 óráig ráztuk (700 rpm), majd 10 percig hagytuk a folyadék fázisokat szétválni. A hexános fázisból 1,0 mL-t üveg bepárlócsövekbe pipettáztunk és 40°C-on nitrogén áram alatt szárazra pároltunk. A mintamaradékot 1,0 mL metanolban oldottuk vissza és PTFE fecskendőszűrőn (Gen-lab Kft., Budapest, Magyarország) HPLC vial-ba szűrtük. A minta-előkészítés során a minta hígulása ötszörös volt.

3.3. LC-MS/MS módszer A-, D2-, D3- és E-vitaminok meghatározására

A vitaminokat C8-as HPLC oszlopon választottuk el lineáris és bináris gradiens elúcióval (**1. ábra**). A vizes mozgófázis (eluens A) 0,1% (v/v) hangyasavas víz volt, a szerves mozgófázis (eluens B) 0,1% (v/v) hangyasavas metanol volt. Az oldószer gradiensben a B eluens aránya 0 és 3 perc között 80%-ról 100%-ra nőtt, B eluens aránya 3 és 10 perc között 100% volt, B eluens aránya 10 és 10,1 perc között 80%-ra csökkent és 14 percig 80% volt. Az áramlási sebesség 0,5 mL/perc, az analízis idő 14 perc volt, az injektálási térfogat 5 µL, a kolonna termostát 30 °C volt. Az MS/MS detektálási körülményeket a **2. táblázat** tartalmazza. Az ionforrás beállításai a következők voltak: köpenygáz: 45 egység, gas 1 (porlasztó gáz): 40 egység, gas 2 (szárító gáz): 40 egység, szárítógáz hőmérséklete: 350 °C, kapilláris feszültség: +5500 V.

2. táblázat. Az A-, D2-, D3- és E-vitaminok MRM ionátmenetei és a hozzájuk tartozó feszültség értékek. A mennyiségi értékeléshez használt ionátmeneteket félkövérrel jelöltük.

Anyaiion (m/z)	Leányion (m/z)	Komponens	Klaszterbontó feszültség (V)	Belépő feszültség (V)	Ütközési energia (V)	Kilépő cella-feszültség (V)
431,4	165,1	E-vitamin1	120	9	40	15
431,4	137,1	E-vitamin2	120	9	68	19
437,4	171,1	E-vitamin-d6_1	120	9	40	15
437,4	143,1	E-vitamin-d6_2	120	9	68	19
385,4	90,9	D3-vitamin1	115	5	98	9
385,4	367,4	D3-vitamin2	115	5	21	17
385,4	259,2	D3-vitamin3	115	5	21	17
388,4	90,9	D3-vitamin-d3_1	150	10	46	11
388,4	259,2	D3-vitamin-d3_2	150	10	46	11
269,2	93,1	A-vitamin1	100	11	35	5
269,2	157,2	A-vitamin2	100	11	41	15
269,2	119,1	A-vitamin3	100	11	31	5
275,2	96,1	A-vitamin-d6_1	100	11	35	5
275,2	122,1	A-vitamin-d6_2	100	11	31	5
397,2	69,1	D2-vitamin1	96	10	51	8
397,2	91,1	D2-vitamin2	96	10	83	8
400,2	69,1	D2-vitamin-d3_1	96	10	51	8
400,2	91,1	D2-vitamin-d3_2	96	10	83	8

3.4. Minta-előkészítés K3-vitamin meghatározására étrend-kiegészítőből

60 mL-es üvegcsövekbe 1,00 g homogén mintát mértünk és 100 µL 10 µg/mL-es K3- vitamin-d8 ISTD oldatot pipettáztunk rájuk, majd 20 mL etanolt és 5 mL desztillált vizet adtunk hozzájuk. A mintákat szobahőmérsékleten 1 óráig rázógépen extraháltuk (700 rpm), majd 15 mL desztillált vizet és 5 mL n-hexánt adtunk hozzájuk. A mintát 1 óráig ráztuk (700 rpm), majd 10 percig hagytuk a folyadék fázisokat szétválni. A hexános fázisból 1,0 mL-t üveg bepárlócsövekbe pipettáztunk és 40 °C-on nitrogén áram alatt szárazra pároltunk. A mintamaradékot 0,5 mL metanolban oldottuk vissza és 0,5 mL frissen készült 0,2% (v/v) hangyasavas L-ciszteïn (1 mg/mL-es) oldatot adtunk hozzájuk. Vortex-kevertetést követően fél óráig hagytuk állni a mintákat szobahőmérsékleten, míg a reakció lezajlott, majd újabb kevertetést követően hidrofíll PTFE fecskendőszűrőn (Gen-lab Kft., Budapest, Magyarország) HPLC vial-ba szűrtük a mintákat. A minta-előkészítés során a minta hígulása ötszörös volt.

3.5. LC-MS/MS módszer K3-vitamin meghatározására

A K3-vitamint származékképzés után C8-as HPLC oszlopon választottuk el lineáris és bináris gradiens elúcióval (**2. ábra**). A vizes mozgófázis (eluens A) 0,1% (v/v) hangyasavas víz, a szerves mozgófázis (eluens B) 0,1% (v/v) hangyasavas metanol volt. Az oldószer gradiensben a B eluens aránya 0 és 1 perc között 20% volt, B eluens aránya 1 és 5 perc között 20%-ról 70%-ra nőtt, B eluens aránya 5,1 és 8 perc között 95% volt, majd 8,1 percnél 20%-ra csökkent a B eluens aránya és 12 percig 20% volt.

Az áramlási sebesség 0,45 mL/perc, az analízis idő 12 perc volt, az injektálási térfogat 10 µL, a kolonna termosztát 30 °C volt. Az MS/MS detektálási körülményeket a **3. táblázat** tartalmazza. Az ionforrás beállításai a következők voltak: köpenygáz: 45 egység, gas 1 (porlasztó gáz): 40 egység, gas 2 (szárító gáz): 40 egység, szárító gáz hőmérséklete: 350 °C, kapilláris feszültség: +5500 V.

3. táblázat. A származékolt K3-vitamin MRM ionátmenetei és a hozzájuk tartozó feszültség értékek. A mennyiségi értékeléshez használt ionátmeneteket félkövérrel jelöltük.

Anyaiion (m/z)	Leányion (m/z)	Komponens	Klaszterbontó feszültség (V)	Belépő feszültség (V)	Ütközési energia (V)	Kilépő cella-feszültség (V)
294,1	122,1	K3-vitamin1	51	10	13	14
294,1	173,1	K3-vitamin2	51	10	21	20
294,1	105,1	K3-vitamin3	51	10	47	12
294,1	205,1	K3-vitamin4	51	10	17	24
294,1	77,1	K3-vitamin5	51	10	77	34
294,1	115,1	K3-vitamin6	51	10	67	12
301,1	122,1	K3-vitamin-d8_1	51	10	13	14
301,1	180,1	K3-vitamin-d8_2	51	10	21	20
301,1	109,1	K3-vitamin-d8_3	51	10	47	12
301,1	212,1	K3-vitamin-d8_4	51	10	17	24
301,1	120,1	K3-vitamin-d8_5	51	10	67	12

3.6. Ionátmenetek optimalizálása

0,1% (v/v) hangyasavas metanollal hígított 1 µg/mL-es egyéni standard oldatokat infúziós fecskendőből fecskendő pumpával juttatunk a tömegspektrométerbe és az automata optimalizáló szoftver segítségével minimum 2 ionátmenetet állítottunk be mindegyik komponens esetén, kivéve a K3-vitaminnál. K3-vitamin esetén a standard oldatból (10 µg/mL) 0,5 mL-t származékoltunk 0,5 mL L-cisztein oldattal és a származékot optimalizáltuk 6 ionátmenettel a tömegspektrométerben, hogy megtaláljuk azokat az átmeneteket, melyekkel a mintában előforduló mátrix vegyületek nem rendelkeznek a K3-származék retenciósi időablakán belül.

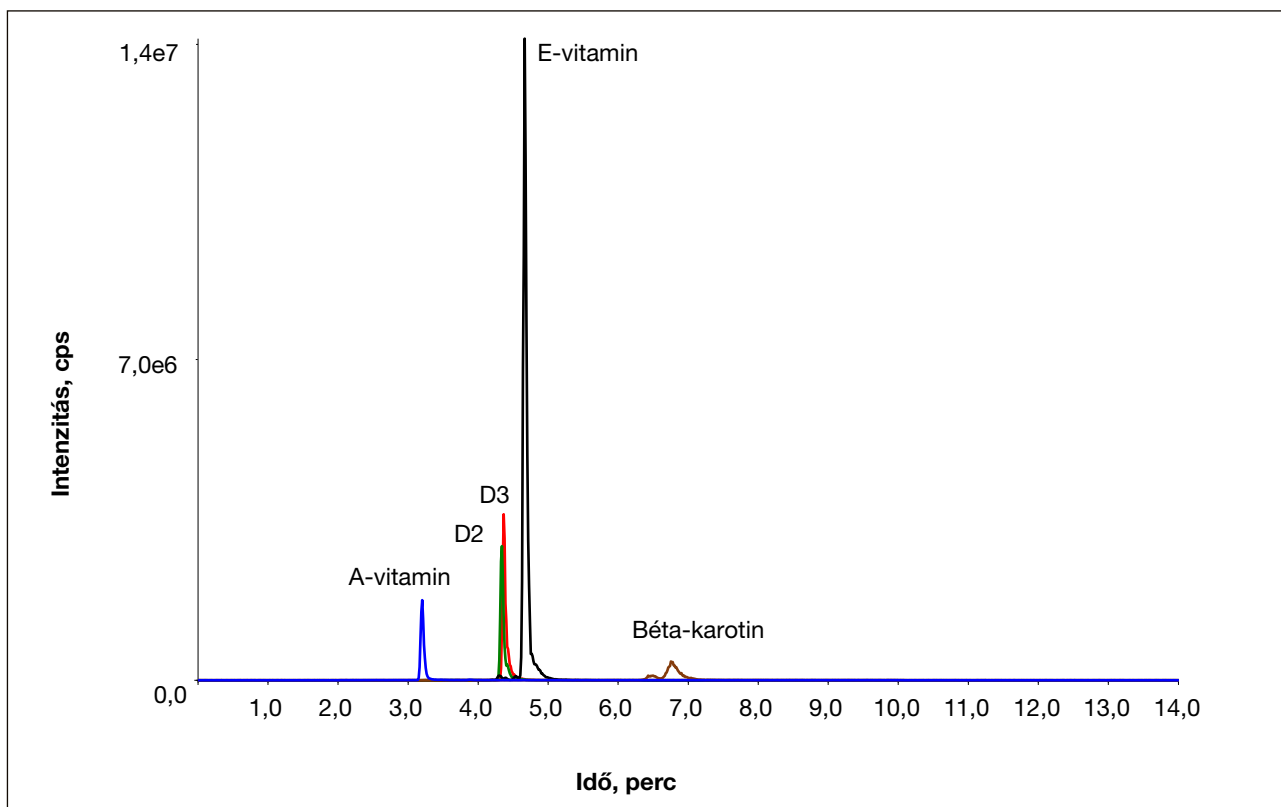
3.7. Módszer-validálás

A zsírban oldódó A-, D2-, D3- és E-vitaminok búzaliszt, üdítő, pezsgőtabletta és étrend- kiegészítő mintákból történő meghatározását laboratóriumon belüli validálással érvényesítettük. A vizsgált analitikai teljesítményjellemzők az következők voltak: szelektivitás, azonosítás (ion arányok), visszanyerés 0,5 és 5 mg/kg-os szinteken 10-10 párhuzamos minta vizsgálatával, ismételhetőség és reprodukálhatóság. A mennyiségi meghatározás határát (LOQ) a jel/zaj arányból határoztuk meg. A K3 vitamin étrend-kiegészítőből történő meghatározását azonos eljárás alapján validáltuk 0,1 és 1,0 mg/kg-os szinten 8-8 ismétléssel. A kalibrációt hétpontos mérőgörbe illesztéssel vizsgáltuk a pontok: 0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,10 µg/mL, 0,50 µg/mL, 1,0 µg/mL, 5,0 µg/mL és 10,0 µg/mL volt. Az ISTD-k koncentrációja 0,2 µg/mL volt.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. LC-MS/MS módszer zsírban oldódó vitaminok meghatározására

A zsírban oldódó vitaminok apoláros jellegükből adódóan atmoszférikus nyomású kémiai ionizációval (APCI), mint ionforrással vizsgálhatók LC-MS mérések során [10]. Az általunk használt készülék ugyanakkor electrospray (ESI) forrással is nagy érzékenység mellett ionizálta a vitaminokat, így APCI-ra nem volt szükség. Az ionátmenetek optimalizálását követően a kromatográfiás elválasztást C8-as HPLC oszlopon próbáltuk, mert az A-, D2-, D3- és E-vitaminok lipofil jellegükből (**1. táblázat**) adódóan a C18-as kolonnán túl nagy visszatartást mutatnak. Ezenfelül sok minta tartalmaz nagy mennyiségben természetes eredetű és/vagy hozzáadott béta-karotint, amelynek hidrofóbicitása még nagyobb, így C18-as kolonnáról csak hosszú mosást követően lehet eluálni. C8-as oszlopon a vitaminok visszatartása jelentősen csökkent a C18-as kolonnán mutattakhoz képest (**1. ábra**). A savas kémhatású eluensek használatát a pozitív ionizációs mód miatt választottuk.



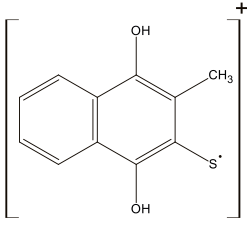
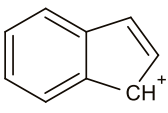
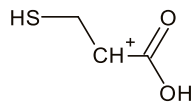
1. ábra. A-, D2-, D3- és E-vitaminok (1 µg/mL) elválasztása C8-as HPLC oszlopon.

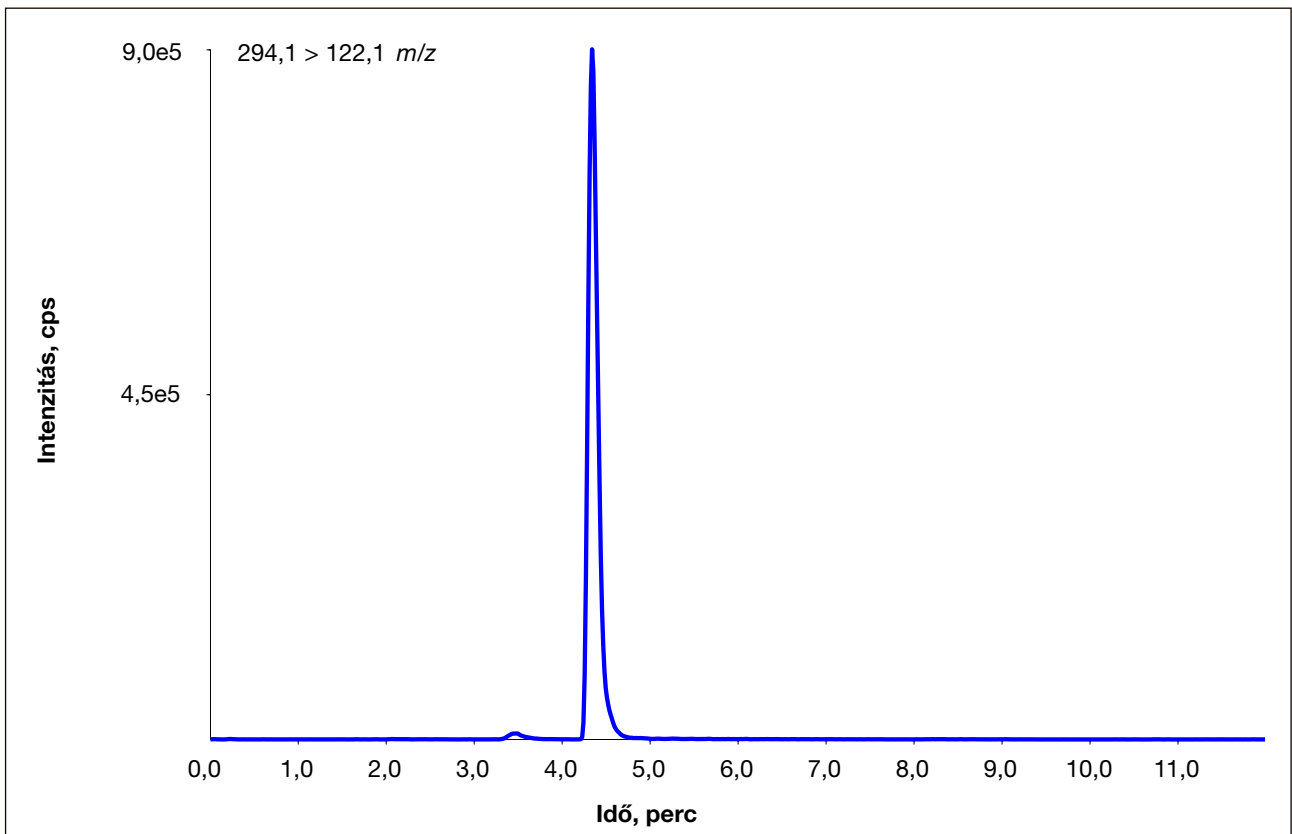
A K1- és K2-vitaminokhoz képest a K3-vitamin natív formában nehezen ionizálható, így LC-MS-sel nehezen vizsgálható. Yuan és munkatársai kémiai származékképzést javasoltak K3-vitaminra, ami után már megfelelő érzékenységgel detektálható ez a vitamin is MS készülékkel [11]. Az általunk alkalmazott származékképzés alapja Yuan és munkatársai módszere, melyben ciszteaminnal reagáltatják a K3-vitamint azonos körülmények között, amelynek során egy Michael addíciós reakció megy végbe [11]. Mi nem ciszteaminnal, hanem L-ciszteinnel végeztük a reakciót. A származék hidrofobicitása a cisztein bevitelét követően jóval alacsonyabb, mint a natív K3-vitaminé (4. táblázat) és visszatartása is ez által csökken a C8-as oszlopon (2. ábra).

4. táblázat. A származékolat K3-vitamin anyaiója (294,1 m/z) és leányionjai LC-ESI(+)-MS/MS műszeregyüttessel rögzítve.

Anyaión/leányion	m/z
	294,1
	122,1
	173,1

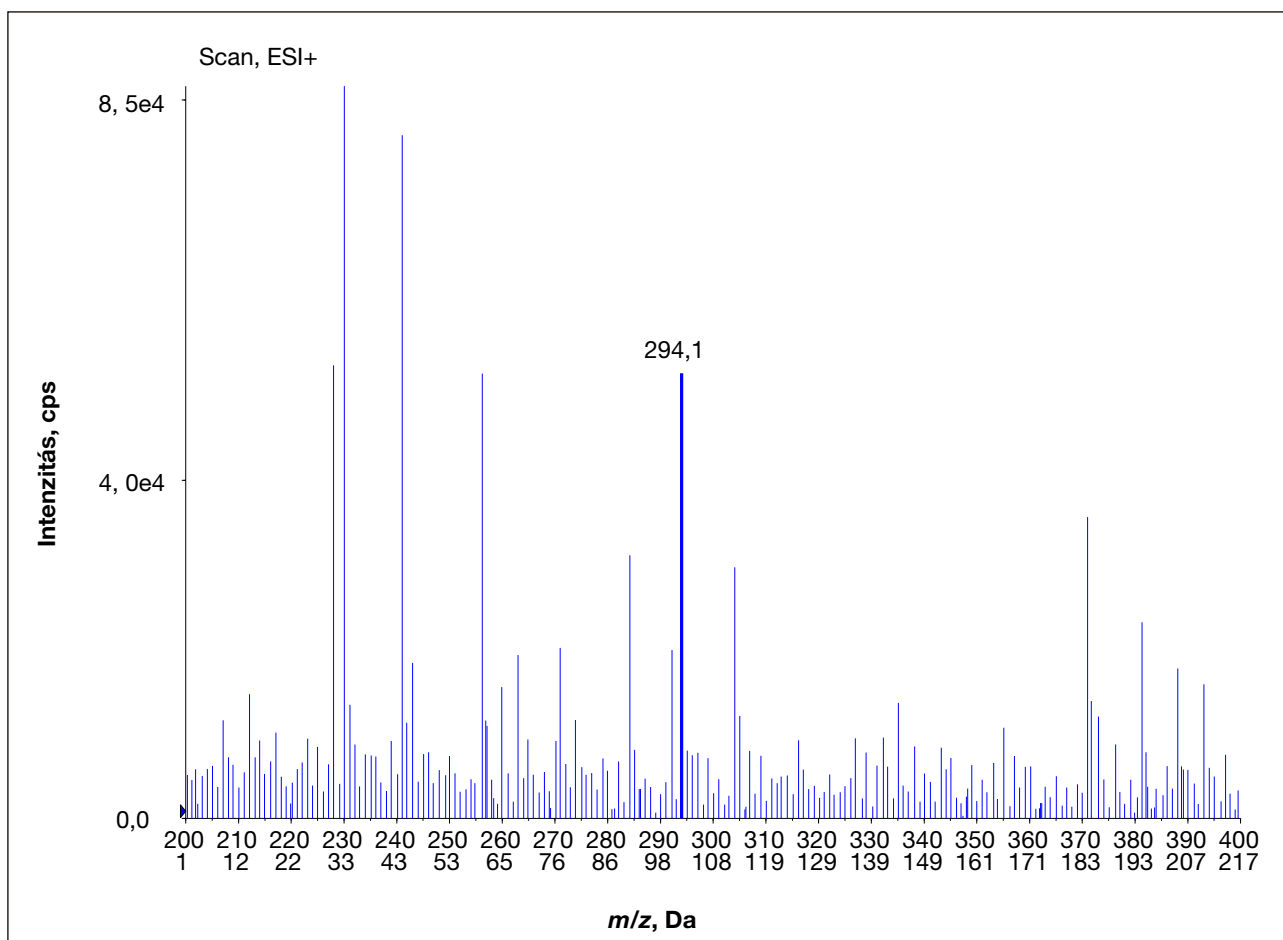
A táblázat a következő oldalon folytatódik!

Anyaiion/leányion	m/z
	205,1
	115,1
	105,1



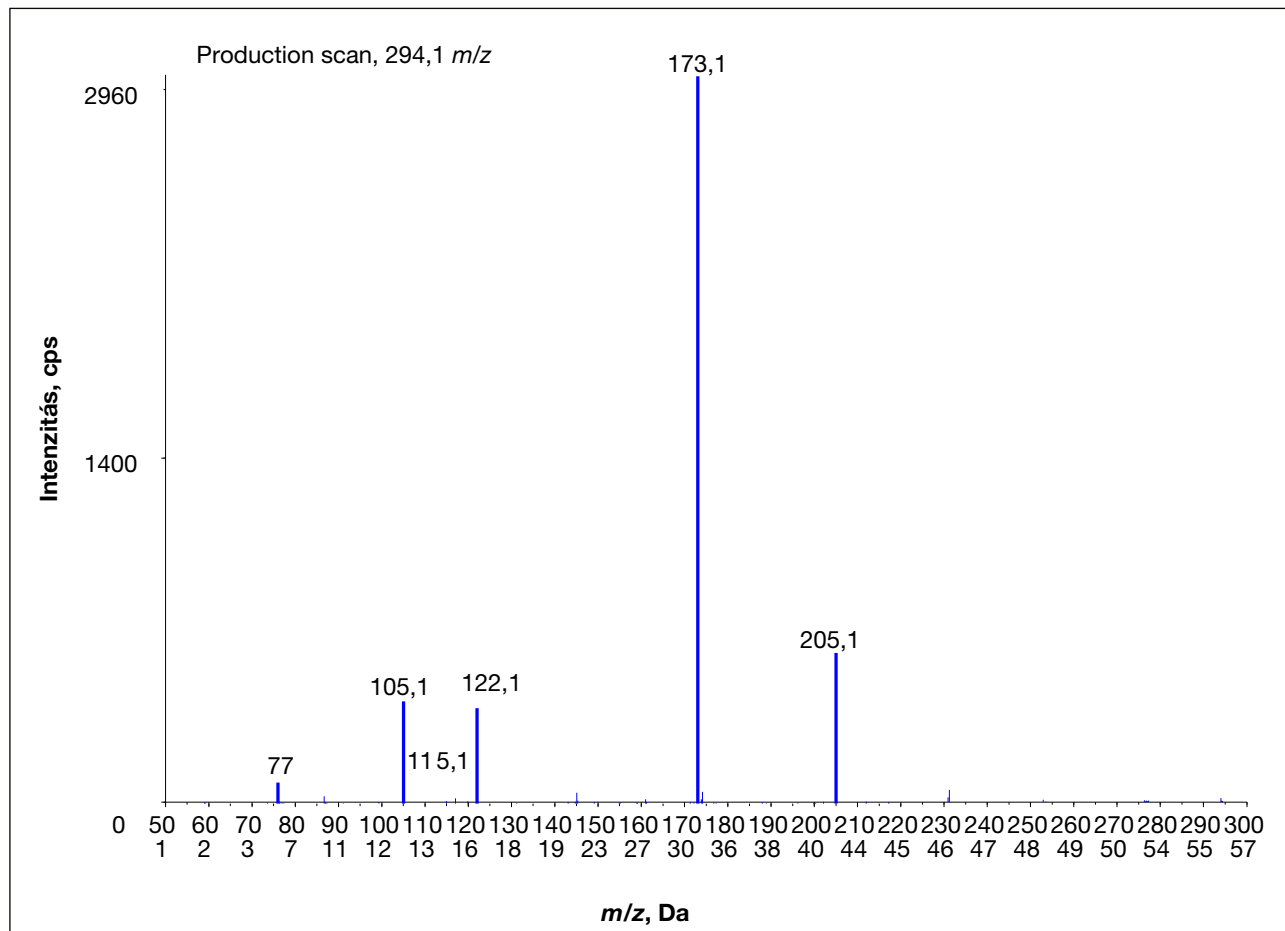
2. ábra. Származékolt K3-vitamin (1 µg/mL) elválasztása C8-as HPLC oszlopon.

A K3-vitamin és az L-cisztein közti származékolás végbemeneteléről tömegspektrum felvételével bizonyosodtunk meg. A **3.4. szakaszban** leírtak alapján 5 µg/mL-es származékolt oldatot készítettünk és a származék tömegspektrumát Q1 scan módban vettük fel 200 – 400 m/z tartományban pásztázva (**3. ábra**). A feltételezett származék kvázi molekulaionjának (protonált molekulának) $[M+H]^+$ monoizotópos tömege 294,1 Da, amelynek jele meg is jelent a spektrumban (**3. ábra**).



3. ábra. Származékolt K3-vitamin (5 µg/mL) tömegspektruma.

Tehát a reakció feltételezhetően L-ciszteinnel is végbement, amit product ion spektrum felvételével is igazoltunk (**4. ábra**).



4. ábra. Származékolt K3-vitamin (5 $\mu\text{g/mL}$) product ion spektruma.

A product ion spektrumban a 294,1 m/z iont fragmentáltuk 15 V ütközési energiával, a fragmenseket a **4. táblázat** tartalmazza. A 115,1 m/z és 205,1 m/z ionok egyértelműen a K3-vitaminhoz tartoznak, Yuan és munkatársai által közölt K3-vitamin fragmensek szerkezeteit igazolja **[11]**. A 173,1 m/z fragmens megfelel a K3-vitamin protonált molekulájának, a 122,1 m/z fragmens pedig az L-cisztein protonált molekulája.

4.2. A módszerek validálása, körvizsgálat

A módszerek validálása során a vakmintákban nem volt interferáló jel a célkomponensek retenció időablakain belül és a mintákban detektált célkomponensek ion-arányaik megegyeztek a kalibráló oldatokban számolt ion-arányokkal, így az MS/MS azonosítás feltétele teljesült. A kalibráció 0,01 és 1,0 µg/mL koncentráció között volt lineáris, felette (1,0 – 10,0 µg/mL) kvadratikus jellegűvé vált a görbe. Az ISTD-vel korrigált relatív visszanyerési értékek teljesítették a 80-120%-os kritériumot és a precizitás értékek (RSD%) se haladták meg a 10%-ot (5-9. táblázat).

5. táblázat. A-, D2-, D3-, és E-vitamin reprodukálhatósági vizsgálata búzalisztból 0,5 és 5,0 mg/kg-os szinten.

0,5 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	0,504	0,511	0,509	0,476
S (mg/kg)	0,008	0,008	0,016	0,062
RSD%	1,63	1,64	3,11	13,0
Visszanyerés%	101	102	102	95,2
5,0 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	5,12	5,21	5,05	5,16
S (mg/kg)	0,237	0,008	0,113	0,174
RSD%	4,63	1,64	2,24	3,38
Visszanyerés%	102	102	101	103

6. táblázat. A-, D2-, D3-, és E-vitamin reprodukálhatósági vizsgálata üdítóből 0,5 és 5,0 mg/kg-os szinten.

0,5 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	0,504	0,505	0,508	0,531
S (mg/kg)	0,013	0,010	0,013	0,054
RSD%	2,55	2,03	2,49	10,1
Visszanyerés%	101	101	102	106
5,0 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	5,07	5,05	5,07	5,30
S (mg/kg)	0,107	0,068	0,092	0,085
RSD%	2,11	1,35	1,81	1,61
Visszanyerés%	101	101	101	106

7. táblázat. A-, D2-, D3-, és E-vitamin reprodukálhatósági vizsgálata pezsgőtablettából 0,5 és 5,0 mg/kg-os szinten.

0,5 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	0,514	0,509	0,493	0,526
S (mg/kg)	0,015	0,007	0,013	0,012
RSD%	3,01	1,46	2,59	2,19
Visszanyerés%	103	102	98,5	105
5,0 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	5,20	5,22	5,49	5,68
S (mg/kg)	0,214	0,184	0,217	0,135
RSD%	3,98	3,43	3,87	2,31
Visszanyerés%	104	104	110	114

8. táblázat. A-, D2-, D3-, és E-vitamin reprodukálhatósági vizsgálata étrend-kiegészítőből 0,5 és 5,0 g/kg-os szinten.

0,5 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	0,520	0,521	0,505	0,515
S (mg/kg)	0,024	0,019	0,012	0,039
RSD%	4,58	3,58	2,30	7,54
Visszanyerés%	104	104	101	103
5,0 mg/kg	A-vitamin	D2-vitamin	D3-vitamin	E-vitamin
Átlag (mg/kg)	5,33	5,63	5,49	4,87
S (mg/kg)	0,322	0,387	0,211	0,134
RSD%	5,98	6,80	3,87	2,67
Visszanyerés%	107	113	110	97,5

9. táblázat. K3-vitamin reprodukálhatósági vizsgálata étrend-kiegészítőből 0,1 és 1,0 mg/kg-os szinten.

0,1 mg/kg	K3-vitamin	1,0 mg/kg	K3-vitamin
Átlag (mg/kg)	0,0931	Átlag (mg/kg)	1,083
S (mg/kg)	0,0041	S (mg/kg)	0,0835
Visszanyerés%	93,1	Visszanyerés%	108
RSD%	4,40	RSD%	7,71

A meghatározás alsó határának (LOQ) az alsó kalibrációs pontot határoztuk meg, mely a minta 5-szörös hígulása miatt így 0,05 mg/kg-nak felel meg. Az LOQ-t kisebb mintahígítással vagy az injektálási térfogat növelésével lehetne tovább csökkenteni. A módszer pontosságát hazai és nemzetközi körvizsgálatokban történő részvételekkel igazoltuk. A NÉBIH által szervezett programban a csecsemő tápszer A- és E-vitamint tartalmazott; a mintához rendelt értékek A- és E-vitamin vonatkozásában 0,495 és 13,6 mg/100 g voltak. Az általunk detektált értékek: 0,465 és 13,6 mg/100 g, ami -0,3 és 0,0 Z-score-nak felelt meg. A sikeres körvizsgálat feltétele a $-2 \leq Z \leq 2$. A FAPAS szervezésében a második körvizsgálati mintában egy folyékony vitamin étrend-kiegészítő D3-vitamin tartalmát vizsgáltuk és 0,206 mg/100 g D3-vitamint detektáltunk. A célérték 0,211 mg/100 g volt, amire a számolt Z-score -0,2, így az elfogadható. Körvizsgálati eredményeinket a **10. táblázatban** foglaltuk össze.

10. táblázat. Körvizsgálati eredmények.

Mátrix	Komponens	Mért érték (mg/100 g)	Mintához rendelt érték (mg/100 g)	Z-score érték	Értékelés
Csecsemő tápszer	A-vitamin	0,465	0,495	-0,3	Megfelelő
	E-vitamin	13,6	13,6	0,0	Megfelelő
Folyékony vitamin étrend-kiegészítő	D3-vitamin	0,206	0,211	-0,2	Megfelelő

5. Következtetések

Jelen dolgozat célja egy új LC-MS/MS módszer kidolgozása volt zsírban oldódó vitaminok meghatározására élelmiszer és étrend-kiegészítő jellegű mintákban. A vizsgálatot izotóphígítással kombinálva sikerült nagy pontosságú és magas precizitású módszert fejleszteni, melyet laboratóriumon belül validáltunk, illetve hazai és nemzetközi körvizsgálatokban sikeresen alkalmaztunk.

6. Irodalom

- [1] Zempleni, J., Suttie, J.W., Gregory III, J.F., Stover, P.J. (2013): Handbook of Vitamins, 5th Edition, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- [2] Az Európai Parlament és a Tanács 1169/2011/EU rendelete (2011): a fogyasztók élelmiszerekkel kapcsolatos tájékoztatásáról, az 1924/2006/EK és az 1925/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet módosításáról és a 87/250/EGK bizottsági irányelv, a 90/496/EGK tanácsi irányelv, az 1999/10/EK bizottsági irányelv, a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv, a 2002/67/EK és a 2008/5/EK bizottsági irányelv és a 608/2004/EK bizottsági rendelet hatályon kívül helyezéséről. Az Európai Unió Hivatalos Lapja L 304/18.
- [3] FDA (2021), Vitamin K Substances and Animal Feed, <https://www.fda.gov/animal-veterinary/safe-feed/vitamin-k-substances-and-animal-feed>
- [4] Tölgyesi, Á. (2021): Gyakorlati példák a folyadékkromatográfiával kapcsolt hármas kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometria élelmiszer-, bio- és textilanalitikai alkalmazására, Kromatográfus különszám, Gen-lab Kft., Budapest, Magyarország https://www.gen-lab.hu/kromatografus_21
- [5] MSZ EN 12822:2014. Élelmiszerek. Az E-vitamin meghatározása nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával. Az alfa-, béta-, gamma- és delta-tokoferol mérése.
- [6] MSZ EN 12823-1:2014. Élelmiszerek. Az A-vitamin meghatározása nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával. 1. rész: Az all-E-retinol és 13-Z-retinol mérése.
- [7] MSZ EN ISO 6867:2001. Takarmányok. Az E-vitamin-tartalom meghatározása. Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás módszer (ISO 6867:2000).
- [8] MSZ EN 12823-2:2000. Élelmiszerek. Az A-vitamin meghatározása nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával. 2. rész: A béta-karotin mérése.
- [9] MSZ EN 12821:2009. Élelmiszerek. A D-vitamin meghatározása nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel. A kolekalciferol (D³-vitamin) vagy az ergokalciferol (D²-vitamin) mérése.
- [10] Arachchige, G.R.P., Thorstensen, E.B., Coe, M., McKenzie, E.J., O'Sullivan, J.M., Pook, C.J. (2021): LC-MS/MS quantification of fat soluble vitamins – A systematic review, Anal. Biochem. 613,113980. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113980>
- [11] Yuan, T.-F., Wang, S.-T. Li, Y. (2017): Quantification of menadione from plasma and urine by a novel cysteaminederivatization based UPLC–MS/MS method, J. Chromatogr. B 1063 p.107-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.026>
- [12] Az Európai Parlament és a Tanács 1925/2006/EK rendelete (2006. december 20.) a vitaminok, ásványi anyagok és bizonyos egyéb anyagok élelmiszerekhez történő hozzáadásáról / Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on the addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods