

A kép illusztráció / Picture is for illustration only

Tölgyesi Ádám¹

Érkezett: 2019. december – Elfogadva: 2020. március

Poláros célkomponensek meghatározása: HILIC-MS módszerek az élelmiszer-analitikában

KULCSSZAVAK: hidrofil kölcsönhatási folyadékkromatográfia (HILIC), tömegspektrometria (MS), akrilamid, laktóz, laktózmentes termékek, B-vitaminok, karbamid

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A hidrofil kölcsönhatási folyadékkromatográfia (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) az elmúlt években a folyadékkromatográfias technika egyik legdinamikusabban fejlődő ága lett. Tömegspektrometriás elven működő detektorokkal összekapcsolva a HILIC-MS rendszerek lehetővé teszik a korábban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) nehezen vagy egyáltalán nem visszatartható és detektálható célkomponensek elválasztását olyan komplex mintákban, mint például a növényi vagy az állati eredetű élelmiszerek, takarmányok. Jelen dolgozat négy konkrét példán keresztül mutatja be a HILIC-MS alkalmazásának lehetőségét poláros vegyületek meghatározása esetében. A bemutatott vizsgálati eljárások között szerepel olyan élelmiszer-szennyező karcinogén anyag vizsgálata, mint például az akrilamid, amelynek bizonyos élelmiszercsoportokban történő meghatározását jogszabály írja elő. Ennek a dolgozatnak a célja továbbá az élelmiszerekhez adott vízoldható B-vitaminok kimutatására kidolgozott HILIC-MS módszer részletes áttekintése. A B-vitaminok vizsgálatára több nemzetközi szabvány is készült, amelyek az egyes B-vitamin-típusoknak megfelelően ajánlanak meghatározást. Ehhez képest HILIC-MS technikával a legtöbb B-vitamin együtt mérhető. Ez a vizsgálati lehetőség nagy előrelépést jelenthet a B-vitaminokat rendszeresen és nagy mintaszámmal vizsgáló laboratóriumok számára. Az ételintoleranciával élők számára fontos a tej alapú élelmiszerek laktóz tartalmának ismerete. A kis koncentrációban jelenlevő laktóz kimutatására szintén a HILIC-MS kapcsolt rendszer adhat gyors és pontos megoldást, amelynek bemutatása szintén dolgozatom tárgyát képezi. Végezetül a dolgozatban szerepel a karbamid (urea) takarmánymintákban történő meghatározása is. A jogszabály fotometriás mérést ír elő az ureára, ennek az eljárásnak a megbízhatósága kis koncentrációs szinteken azonban megkérdőjeleződött, ezért alternatív megoldásként előtérbe került a HILIC-MS módszer. Jelen vizsgálati módszerek alkalmazhatóságát igazolja a nemzetközi körvizsgálatokban való eredményes részvétel, a kontroll mintákban detektált kellően pontos koncentrációk, valamint a teljeskörűen validált módszerek tanúsítása a Nemzeti Akkreditáló Hatóság (NAH) által.

2. Bevezetés

A műszeres analitikai kémiai vizsgálatok nagyrészt elválasztástechnikai módszerek, amelyek közül ta-

lán a leggyakoribb a HPLC alkalmazása. A HPLC a folyadékfázisban teszi lehetővé a célkomponensek elválasztását a HPLC eluensében oldódó mintákban (például az élelmiszerekben) jelenlevő mátrixkom-

¹ ÉMI-TÜV SÜD Kft.

ponensektől. A HPLC alkalmazását ugyanakkor korlátozhatja a meghatározandó vegyületek polaritása; főképpen igaz ez nagy polaritású, hidrophil komponensek esetében [1]. Normál fázisú HPLC (NP-HPLC) elválasztásnál a HPLC kolonna állófázisa poláros karakterű, amely lehetőséget biztosít különböző kölcsönhatások kialakítására a töltet és a poláros célvegyületek között, ugyanakkor a mozgófázis (például alkán, halogénezett alkánszármazék, éter vagy acetát) apoláros jellege következtében a hidrophil komponensek nem oldódnak az eluensben (mozgófázisban), így nem vizsgálhatók NP-HPLC-vel. A fordított fázisú HPLC (RP-HPLC) elválasztásnál a polaritásviszonyok az álló- és a mozgófázis között megváltoznak, így a hidrophil célkomponensek jól oldódnak a poláros vizes eluensben, ugyanakkor visszatartásuk az alkil-módosított apoláros állófázison kicsi, vagy egyáltalán nincs retenciójuk. Emiatt a holtidőben eluálódnak. A HILIC jellegű elválasztásoknál nincs olyan éles polaritáskülönbség az álló- és a mozgófázis között, mint az NP-HPLC és az RP-HPLC esetén. A HILIC-et úgy jellemezhetjük, mint egy olyan HPLC rendszert, ahol az állófázis polárosabb, a mozgófázis pedig kevésbé az [1]. Ez lehetőséget biztosít egyrészt a célkomponensek oldódására az eluensben, valamint az állófázisban a visszatartásukhoz szükséges kölcsönhatások kialakítására is. A HILIC tehát nagy polaritású, ionos vegyületek HPLC-s elválasztására alkalmazható, apoláros vagy protonfunkcióval nem rendelkező vegyületekére azonban nem [2].

A HILIC kolonnák poláros állófázisok, amelyek lehetnek szilikagél alapúak, anion- vagy kationcserélő, kettős ionos állófázisok, illetve polárosan módosított fázisok. A szilikagél állófázis megegyezik a NP-HPLC-ben alkalmazott állófázissal, viszont a HILIC kolonnát nem apoláros szerves oldószerben tárolják, hanem víz-acetonitril elegyben, amely kis koncentrációban (5-10 mM) ammónium-acetátot is tartalmazhat. A HILIC elválasztás lényege, hogy a kolonnán áramló alacsony víztartalmú eluens hatására az állófázis felületén a fizikailag szorbeálódott vízből határfelületi réteg alakul ki [2]. Ebbe a rétegbe oldódnak bele a hidrophil célkomponensek, amelyek polaritásuktól függően vándorlásuk során hosszabb vagy rövidebb időt töltenek el az állófázison, és retenció tulajdonságaik alapján lesznek megkülönböztethetők. A HILIC rendszerben a nagyobb polaritású vegyületeknek lesz hosszabb vándorlási idejük, ami azt jelenti, hogy minél nagyobb egy komponens vízdoldékonysága, annál több időt tölt a határfelületi rétegben (és ezáltal az állófázison), vagyis annál nagyobb lesz a retenciója. Ha az eluens nem tartalmaz vizet, akkor az állófázison a határfelületi réteg nem alakul ki, ezért 100% szerves oldószerrel nem használhatunk mozgófázisnak. A HILIC mozgófázisok víz és valamely vízzel elegyedő kisviszkozitású szerves oldószer elegyei. A HILIC jellegéből adódik, hogy a víz, mint eluens, a legelűzibb, mivel ez a legpolárosabb oldószer. Szerves eluens-modifikátorként leggyakrabban acetonitrilt alkalmaznak, mert ennek viszkozitása kicsi, ami keskeny kromatográfiás csúcsokat és

kiseb nyomásesést eredményez. Az eluens víztartalma 2-40 v/v% között változik. Minél alacsonyabb víztartalmú eluenssel tudunk elválasztást elérni, annál jobb a HILIC kolonna. Ugyanakkor az eluensnek feltétlenül legalább annyi vizet kell tartalmaznia, hogy a vizsgált vegyületek oldódjanak benne. Ez a feltétel gátat szab a víz térfogatrészének csökkentésének. Gradiens elúció esetén a mozgófázis víztartalmának növelésével tehetjük elűzibbá az eluenst. Protonfunkcióval rendelkező, ionos állapotba hozható bázikus komponensek, például aminok HILIC elválasztásánál fontos, hogy a mozgófázis kémhatása savas legyen, mert a célkomponensek így lesznek poláros (ionos) állapotban, amivel retenciójuk is növekszik.

A magas acetonitril tartalmú savas eluens kifejezetten előnyös tömegszelektív detektorok alkalmazása esetén, az elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionisation, ESI) hatékonyságát ugyanis nagyban növelhetjük, ha az eluens nagyobb részben szerves oldószert tartalmaz, mert ennek párolgása és beszáritása az ESI-ben gyorsabb, mint a magas víztartalmú eluenseké. Az alacsony pH tovább növeli a pozitív módú ionizációt és ezáltal több ion képződik, majd lép be az analizátortérbe, ami növeli az érzékenységet. Tandem tömegspektrometriás (MS/MS) detektálást alkalmazva a jelentősen feljavított ionizációs hatásokon túl az MS/MS készülék nagyfokú szelektivitását kihasználva olyan applikációs lehetőségek adódnak, amelyekre korábban nem volt példa. A HILIC-MS/MS kapcsolt technika nagy érzékenység mellett, alacsony koncentrációs szinten biztosítja hidrophil célkomponensek biológiai mátrixokból történő meghatározását. Példaként említhetők a poláros növényvédőszer maradványainak vizsgálata, a hidrophil mikotoxinok meghatározása, vagy akár a tenazonsav vagy a flavonoidok növényi extraktumokból történő elválasztása [3, 4, 5]. Jelen dolgozat három élelmiszervizsgálati és egy takarmányvizsgálati HILIC-MS/MS módszert mutat be:

1. Akrilamid meghatározása többfajta élelmiszerből;
2. Szilárd vagy folyékony élelmiszermintákhoz adott vízoldható B-vitaminok meghatározása;
3. Laktózmentes termékek laktóztartalmának vizsgálata alacsony koncentrációs szinten;
4. Karbamid (urea) meghatározása takarmányokból.

3. Akrilamid meghatározása élelmiszerekből

Akrilamid az élelmiszerekben fehérjék és cukrok jelenlétében, 120 °C feletti hőkezelés közben keletkezik. Rákkeltő vegyület, amelynek élelmiszerekben előforduló maximális mennyiségét az EU 2017/2158 sz. rendelete szabályozza [6, 7]. Az akrilamidról részletes és átfogó hazai tanulmány jelent meg 2018-ban [7], a meghatározására kidolgozott szabványmódszert (EN 16618:2015) pedig élelmiszervizsgáló laboratóriumok világszerte széles körben alkalmazzák [8].

Az akrilamid ($\text{NH}_2\text{-C(=O)-CH=CH}_2$) egy kis molekulasúlyú, poláros vegyület (M_w : 71 g/mol; $\log P$: -0.67), amely gázkromatográfiával és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás technikával egyaránt vizsgálható. A gázkromatográfiás elválasztáshoz az akrilamidot származékolni kell [9], de folyadékkromatográfiás mérés esetén ez nem szükséges. A szabvány az akrilamid meghatározására HPLC-MS/MS módszert ír elő [8]. A HPLC-s elválasztásnál viszont gondot okoz, hogy a hagyományos RP-HPLC-s oszlopoknak akrilamidra nincs visszatartásuk. A szabvány porózus grafitált szén alapú állófázist (PGC, Hypercarb™) javasol, amelynek visszatartása akrilamidra 100% vizes eluens (0,1%, v/v, ecetsav vízben) mellett megfelelő [8]. A retenció tényező, $k' = 4$, 100% víztartalmú eluenssel mérve. Más RP-HPLC oszlopoknak gyakorlatilag elhanyagolható az akrilamidra történő visszatartása, ha azonban mégis lenne, az kizárólag 100% vizes eluens alkalmazása mellett fordulhatna elő. A magas víztartalmú eluens az ionizációt ESI ionizáció során nagyban csökkenti, az eluens párolgása és beszárítása az ionforrásban ugyanis annál kisebb hatékonyságú folyamat, minél több vizet tartalmaz a mozgófázis. Ezáltal az ionforrásban kevesebb ion keletkezik és így csökken a vegyületre elérhető alsó méréshatárt rontó érzékenység [10].

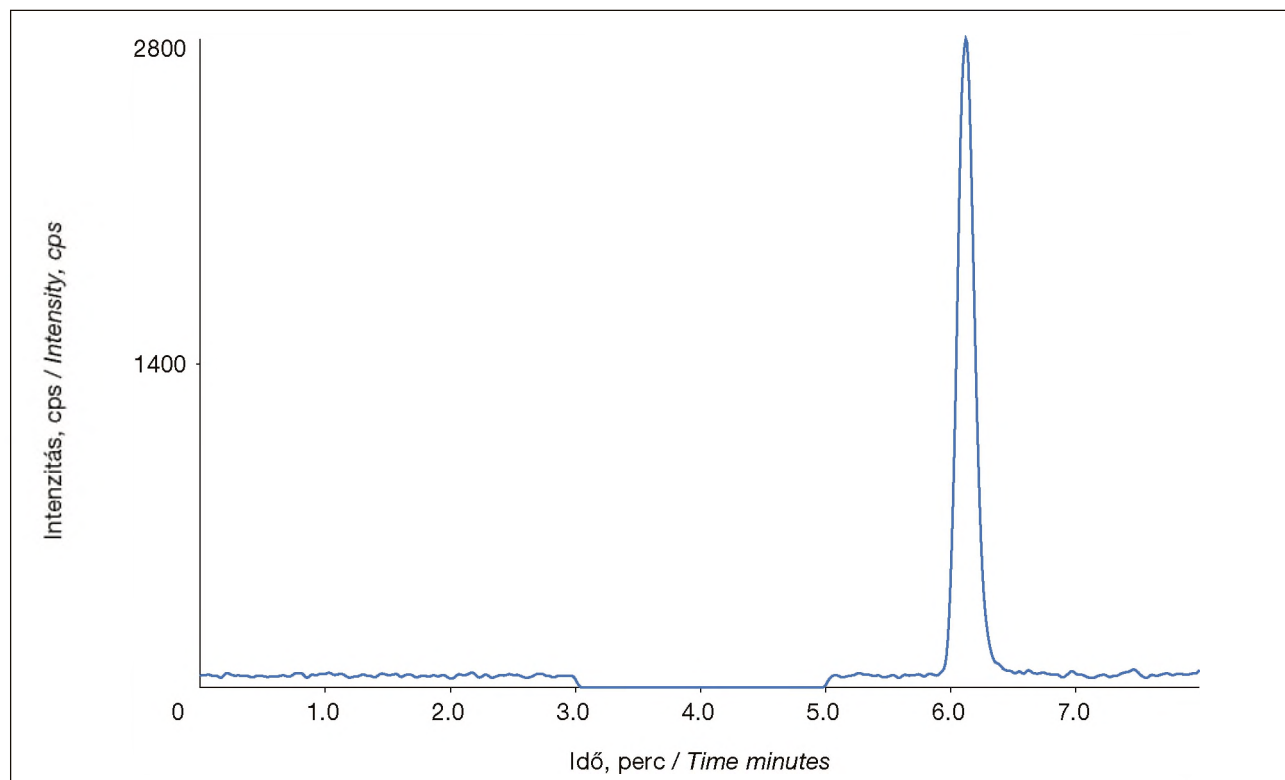
A szabvány szerinti minta-előkészítés során a mintákat vízzel extraháljuk és első körben multimód (anion- és kationcserélő egy töltetben) szilárd fázisú extrakcióval (SPE) tisztítjuk. Az SPE oszlopon átfolyt extraktumot ezután ENV+ SPE oszlopon tisztítjuk tovább, amelynek van visszatartása a metanol-víz eleggyel eluálható akrilamidra. Az SPE oszlopról tör-

tendő leoldás után bepárlás és visszaoldás következik. Ha figyelembe vesszük a két SPE lépést és a vizes metanol lassú párolgását, akkor levonhatjuk azt a következtetést, hogy ez egy költséges és időigényes előkészítés. A vizsgálati szabvány kávéminták esetében hexánnal történő zsirtalanítást is előír [8].

3.1. Akrilamid meghatározása HILIC-MS/MS módszerrel

Az akrilamid poláros jellegéből adódik, hogy HILIC oszlopon is lehet visszatartása. Kisméretű molekula lévén azonban behatárolt a kölcsönhatása az állófázissal, így a megfelelő HILIC oszlop alapos kiválasztása ajánlott annak érdekében, hogy a $k' \geq 1$ minimális kromatográfiás feltétel – amit az EU 2002/657/EC rendelete is előír [11] – teljesüljön. Amennyiben megfelelő HILIC elválasztással sikerül ezt a feltételt teljesíteni, úgy az RP-HPLC-hez képest magas acetonitril tartalmú mozgófázissal az elválasztás végrehajtható. Ez a nagymennyiségű acetonitrilt tartalmazó vizes eluens magas ionizációs hatásfokot eredményez és hatékonyan növeli a módszer érzékenységét.

Kísérleteink során több HILIC oszlopot is kipróbáltunk annak érdekében, hogy elfogadható visszatartást érjünk el akrilamidra [12]. Megfelelő visszatartást azonban csak nagyon magas acetonitril tartalmú eluenssel sikerült elérni, ami azért nehezítette a módszerfejlesztést, mert ennek megfelelően a vizsgálandó minták oldószerének is magas szervesanyag-tartalmúnak kellett lennie. A végső választás a TSKgel Amide-80 típusú oszlopra esett [12]. A TSKgel Amide-80 állófázisa karbamoil csoportokat



1. ábra. 10 ng/ml-es akrilamid standard HILIC-ESI(+)-MS/MS kromatogramja ($72 > 55$ m/z).
Figure 1. Chromatogram of 10 ng/ml acrylamide standard HILIC-ESI (+) - MS / MS ($72 > 55$ m/z).

tartalmaz, amely egyedi visszatartást eredményez a teljesen porózus állófázis és a poláros célkomponensek között. A TSKgel-Amide-80 kolonnán 95% (v/v) acetonitril mellett lehetett $k' \geq 1$ -et elérni, míg a többi kolonna esetén 98% (v/v) acetonitrilre volt szükség az eluensben ennek eléréséhez. A TSKgel Amide-80 kolonnán 0,1% (v/v) hangyasav és 1 mM ammónium-formiát tartalmú víz-acetonitril mozgófázissal (5/95, v/v) az akarilamid retenció tényezője 1,14 lett (**1. ábra**).

A magasabb ammónium-formiát tartalmú eluens (>1 mM) csökkentette, a magasabb savtartalom (>0,1%, v/v) viszont nem növelte tovább az érzékenységet. A magas acetonitril tartalmú mozgófázis az ESI-MS/MS detektálás során 1 nagyságrenddel növelte a kimutatási határt a magas víztartalmú (95%, v/v) eluenshez képest. Ez lehetőséget nyújtott a minta-előkészítés során a minta hígítására és az SPE lépések elhagyására, ami az úgynevezett „dilute-and-shoot” eljárásához vezetett. A „dilute-and-shoot” módszerekben a minta extrakcióját követően izotópjelölt belső standarddal hígítjuk az extraktumot, majd az LC-MS/MS készülékbe injektáljuk azt [**10**].

A HILIC elválasztás esetén fontos, hogy az injektált minta oldószerének összetétele azonos legyen az eluens összetételével, annál ne legyen elúzívable. Emiatt a szabványban szereplő nagy oldószer feleslegű vizes extrakció nem használható. A vizes extraktumot ugyanis tovább kellene hígítani acetonitrilrel az injektálás előtt, ez viszont emelné a mérés alsó határát (Limit of Quantification, LOQ) a minta további, legalább tízszeres hígulása miatt. Az akrilamidnak az acetone megfelelő oldószer, ezért gyakran alkalmazzák élelmiszerminták extrakciójára. Az acetonitriles extrakció külön előnye, hogy a HILIC rendszerrel kompatibilis oldószer; ebből adódóan az acetonitril alapú extrakció, valamint a szűrés után közvetlenül lehetne az extraktumot a HILIC-MS/MS rendszerbe injektálni. Az acetonitriles extrakció további előnye a 100% vizes extrakcióhoz képest, hogy a fehérjéket és a zsírokat az acetonitril kicsapja, a sókat nem oldja fel nagy koncentrációban, így a mintából ezen mátrixok eltávolítása a szilárd-folyadék extrakció során könnyedén megvalósítható. Kísérleti terv gyanánt vizsgálva a megfelelő extrakciós közeget azt találtuk, hogy természetesen szennyezett mézeskalácsból acetonitril-víz-hangyasav (69/30/1, v/v/v) eleggyel lehet a legmagasabb mennyiségű akrilamidot kivonni [**12**]. A mézeskalács ideális mintamátrix volt, mert az összetételéből (méz, cukor, fehérje, keményítő) következően feltételeztük, hogy magas lehet benne a hőkezelés hatására képződött akrilamid mennyisége. A mézeskalácsra vonatkozó határérték (800 µg/kg) ennek megfelelően szintén magas volt [**6**]. A HILIC elválasztás egyik jellemző területe a cukrok élelmiszerekből történő meghatározása [**1**], így HILIC-et alkalmazva a mintában maradt cukrok is elválaszthatók az akrilamidtól, ugyanis azok 95% (v/v) acetonitril mellett nem eluálódnak HILIC fázison.

A fent említett extrakciós eleggyel kivont minta extraktuma a centrifugálást és a fecskendőszűrést követően még nem injektálható, mert még mindig magas a víztartalma. Ezért az extraktumot injektálás előtt 1:1 (v/v) arányban acetonitrilrel kell hígítani. A „dilute-and-shoot” módszerek esetében a mátrixvegyületek nagy számban és magas koncentrációban holt időben eluálódnak, ezért a HPLC és az MS/MS készülék között lévő váltószeleppel célszerű a holt időben eluálódó komponenseket a hulladékoldószert befogadó tartályba irányítani. Ezzel a módszerrel ugyanis elkerüljük az ionforrás elszennyeződését. Az **1. ábra** azt mutatja, hogy 3 és 5 perc között a detektor alapvonala nullára zuhan, ugyanis nincs bemenő áram az MS/MS készülékbe. 2,0 g mintát 20 ml extrakciós közeggel extrahálva, majd a dekantált mintát acetonitrilrel 1:1 (v/v) arányban hígítva a minta teljes hígulása húszszoros. Az általunk használt LC-MS/MS készülék kimutatása 1 ng/ml akrilamidra; komponensvesztés nélkül az előkészítés során így ~20 µg/kg-os LOQ-t lehet elérni a mintákban, ami érzékenyebb MS/MS rendszerekkel még tovább csökkenthető. A módszer pontossága természetesen szennyezett minták (crispbread) esetén 101%, adalékolt mézeskalács mintánál (RSD < 7,2%) pedig 101-105% [**12**]. A módszer ellenőrzése végett megvizsgáltunk egy körvizsgálati kávémintát is. A kávéban 183 µg/kg akrilamidot detektáltunk. A körvizsgálati mintához deklarált érték 242 µg/kg volt akrilamidra. A számolt Z-érték így -1,2, ami megfelelő vizsgálatot jelent.

3.1.1. A HILIC módszer előnye

1. A mintatisztítás elhagyásával mindkét, a szabványban szereplő SPE lépés nélkülözhető. Ezzel az előkészítés leegyszerűsíthető, és így csak a szilárd-folyadék extrakciós lépésre, illetve a dekantált minta hígítására van szükség. A két SPE tisztítás kihagyása számottevően csökkenti az analitikai vizsgálat költségeit az SPE oszlopok és az oldószerek tekintetében egyaránt.
2. A szabvány szerint a második SPE lépés után a víz-metanol oldószereleggyű minta-eluátum oldószerejét el kell párologtatni. Az akrilamid tartalmú minta bepárlása azonban a célkomponens veszteségével jár [**9**]. Ez a koncentrációs lépés a HILIC módszer esetén elhagyható, mert az extraktumot csak hígítjuk, mintadúsítást tehát nem szükséges végeznünk.
3. Az acetonitril-víz-hangyasav extrakciós oldószereleggy a mintákban lévő fehérjéket és a zsírt kicsapja, így nincs szükség arra az SPE lépésre, amellyel a fehérjéket kellene elválasztani az akrilamidtól, sőt hexánnal történő zsírkivonás sem szükséges. Az acetonitril HILIC-kompatibilis oldószer, ezért alkalmazása optimális mind az extrakció, mind az azt követő HILIC-MS vizsgálat miatt.

4. ESI-MS/MS detektálás során a 95% (v/v) szerves oldószertartalmú mozgófázis nagyban növeli az ionizációs határfokot, így annak érzékenységét is. Ez teszi lehetővé a „dilute-and-shoot” eljárás alkalmazását. Izokratikus elúciót alkalmazva az analízisidő mindössze 8 perc [12]. A szabványban szereplő PGC kolonna egy speciális állófázis, alkalmazhatósága jóval korlátozottabb, mint egy HILIC oszlopé, amely széleskörben további applikációkban alkalmazható.
5. Amennyiben a célkomponens izotópjelzett belső standardja rendelkezésre áll és az LC-MS/MS készülék érzékenysége is lehetővé teszi a minta dúsításának elhagyását, akkor a „dilute-and-shoot” eljárás egyszerűen, gyorsan és költséghatékonyan garantálja a célkomponensek komplex mátrixokban történő vizsgálatát [10]. A „dilute-and-shoot” alapú HILIC-MS módszerek a műszeres analitikai kémia új trendjébe tartoznak, jelentőségük folyamatosan növekszik.

4. B-vitaminok meghatározása élelmiszerekből

A B-vitaminok vizsgálata előtt mindenképp fontos tisztázni, hogy az élelmiszerhez adott vitamin vizsgál-

ataról van szó vagy a teljes – eredeti és hozzáadott – vitamintartalom meghatározására van szükség. A mintában ugyanis a természetben előforduló B-vitaminok kötött formában vannak jelen, amelyből hidrolízissel vagy enzimes előkészítéssel lehet őket felszabadítani. Jelen dolgozat a mintákhoz adott vitamin meghatározására ajánl módszert.

A B-vitaminok meghatározására készült szabványok komponensenként, tehát külön B1-re, B2-re, B6-ra stb. készültek [13, 14, 15]. Ennek oka, hogy egy adott vitamin (például a B1) teljes – a mintában jelenlévő és a hozzáadott forma – meghatározására egyéni extrakciós előkészítés szükséges. Ezen felül sajátos HPLC elválasztásra és detektálásra, az UV detektáláshoz pedig származékképzésre is szükség lehet. Amennyiben csak a mintához adott vitaminokat vizsgáljuk, úgy többkomponenses szimultán meghatározásuk RP-HPLC-vel és optikai detektorral nem kivitelezhető. A B-vitaminok poláros jellegükből adódóan azonban jól mérhetők HILIC módszerrel. A koelúciós zavarás miatt, illetve a B1 vitamin meghatározása érdekében MS vagy MS/MS detektálásra van szükség, ami a HILIC-MS/MS kapcsolt technika alkalmazásához vezet (1. táblázat). Ezzel az analitikai megoldással a vitaminok egymás mellett mérhetők, és a nagy érzékenység következtében a mintaelőkészítés ismét csak egy szilárd-folyadék

1. táblázat. B-vitaminok retenciósi idejük és MS/MS ionátmenetei ESI pozitív ionizációs módban.
Table 1. Retention time and MS/MS ion transitions of B vitamins in ESI positive ionization mode.

Vitamin	Retenciósi idő (perc) <i>Retention time (minute)</i>	Prekursor ion (m/z) <i>Preursor ion (m/z)</i>	Leány ion (m/z) <i>Daughter ion (m/z)</i>	Gyűjtési idő (ms) <i>Dwell time (ms)</i>	Klaszterbontó feszültség (V) <i>Declustering potential (V)</i>	Belépési feszültség (V) <i>Entrance potential (V)</i>	Kilépési feszültség (V) <i>Cell exit potential (V)</i>	Ütközési energia (V) <i>Collision energy (V)</i>	Kilép. fesz. az ütközési cellából (V) <i>Collision cell exit potential (V)</i>
B1	9.1	265	81	75	41	5	18	41	4
			122	75				19	4
B2	4.0	377	172	75	106	12	20	49	4
			243	75				29	4
B3 amid <i>B3 amide</i>	4.3	123	78	75	71	4	10	29	4
			80	75				25	4
B3 sav <i>B3 acid</i>	3.5	124	78	75	66	3	10	29	4
			80	75				27	4
B5	3.2	220	72	75	51	5	15	27	4
			90	75				17	4
B6	9.3	170	134	75	51	3	12	27	4
			152	75				17	4
B7	3.8	245	97	75	61	5	16	39	4
			227	75				19	4
B9	3.9	442	176	75	81	6	22	51	4
			295	75				23	4
B12	9.3	678	147	75	111	9	26	53	4
			359	75				31	6

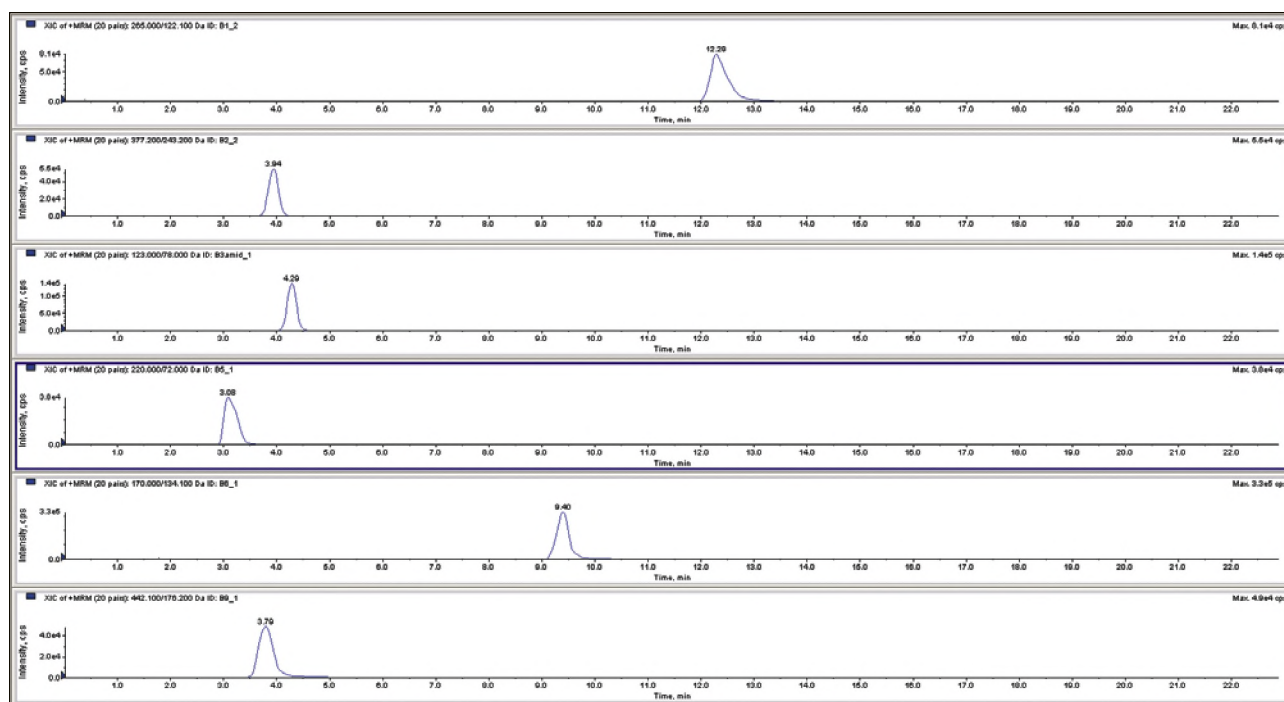
extrakcióra és további acetonitriles hígításra korlátozódik. A B-vitaminok hidrofil tulajdonságából adódik, hogy az élelmiszerekhez adott vitaminokat vízzel egyszerűen extrahálhatjuk. A magas koncentráció (>0,06 mg/100 g) miatt nagy feleslegű oldószerezrel (20 ml víz/1 g minta) a B-vitaminok a szilárd mintából kivonhatók, ami a hozzáadott vitaminok teljes extrakcióját eredményezi. Folyadékminták esetén vízzel, majd a mintaelőkészítés végén acetonitrillel lehet a mintákat tovább hígítani.

Izotópjelzett belső standard hiányában a „dilute-and-shoot” eljárás nem alkalmazható, mert a háttér még százszoros minta hígulás esetén sem kompenzálható. A mátrix nélküli oldószerez kalibráció tehát nem alkalmazható mennyiségi értékelésre. A módszer így mátrixhoz illesztett kalibrációt igényel. Ez azt jelenti, hogy a célkomponenseket kimutatási határ alatt tartalmazó vakminták extraktumait adalékoljuk vitaminokkal meghatározott koncentrációs szintre, majd ezeket használjuk kalibrációs pontokként [10]. Ezáltal a minta és a kalibrációs oldatok hátere közel azonos, a mennyiségi értékelést pedig a háttér számottevően nem befolyásolja. Fontos megjegyezni, hogy a mátrixhoz illesztett kalibráció csak annyira pontos, amennyire a kalibrációhoz használt vakminta és a tesztminta mátrixa egyezik. Tehát ezzel a kalibrációval nem tudjuk 100%-osan kompenzálni a háttérrel, csak megközelítjük azt. Alternatív megoldásként alkalmazhatjuk a standard addíciót, amikor is a tesztmintát adalékoljuk a vitaminokkal, és az adalékolt mintákban mért jelintenzitásokból, illetve a jelnövekedésből következtetünk a nem adalékolt tesztminta koncentrációjára.

Szilika HILIC állófázison 0,1% (v/v) hangyasavas víz-acetonitril eluenssel jól mérhető a B-vitaminok (2. ábra), amelyeket körvizsgálati pezsgőtabletta és dzsúsz mintákban, valamint FAPAS reggelizőpehely kontrollmintában is HILIC-MS/MS módszerrel detektáltunk. A pezsgőtablettát vízben való feloldást (4 g minta/200 ml) követően vízzel 1:9 (v/v) arányban, majd tovább acetonitrillel hasonlóan 1:9 (v/v) arányban hígítottunk. A dzsúszt a pezsgőtablettához hasonlóan először vízzel, majd acetonitrillel hígítottuk. A körvizsgálat során B1, B2, B3, B5, B6 és B9 vitaminok voltak kimutathatók a mintákban 0,058 mg/100 g és 5,44 mg/100 g között (2. táblázat). A mért értékekre kiszámolt valamennyi Z-érték -2 és +2 közötti tartományban volt, amely elfogadható. A FAPAS kontroll mintában detektált B-vitaminok koncentrációi is az elfogadhatósági tartományon belül voltak (2. táblázat).

5. Laktóz meghatározása élelmiszerekből

A tejben található tejcukor, a laktóz diszaharid típusú vegyület. Hidrofil tulajdonsága miatt jól vizsgálható HILIC elválasztással. Nem rendelkezik protonfunkcióval, így az eluensben a pH beállítása nem szükséges. A laktóz ammónium-acetátot (10 mM) tartalmazó acetonitril-víz (75/25, v/v) elegyű mozgófázis segítségével izokratikusan vizsgálható szilikagél alapú HILIC oszlopon. Törésmutató index (Refractive Index, RI) detektorral a tejben százalékos (~4,5%) mennyiségben előforduló laktózt könnyű kimutatni, a „laktózmentes” jelzésű termékekre Magyarországon mégis 0,1%-os határérték (MSZ 1382/1-87) vonatkozik, míg Németországban mindössze 0,01% a



2. ábra. B-vitaminok HILIC-ESI(+)-MS/MS kromatogramjai juice mintában: B1 (0,31 mg/100 g), B2 (< 0,05 mg/100 g), B3 (3,91 mg/100 g), B5 (2,0 mg/100 g), B6 (0,38 mg/100 g), B9 (0,059 mg/100 g).
Figure 2. Chromatograms of B vitamins HILIC-ESI (+) - MS/MS in juice sample: B1 (0.31 mg/100 g), B2 (<0.05 mg/100 g), B3 (3.91 mg/100 g), B5 (2.0 mg/100 g), B6 (0.38 mg/100 g), B9 (0.059 mg/100 g).

megengedett laktóztartalom [16]. A mintában a 0,1% 1000 µg/ml vagy 1000 µg/g laktóz koncentrációnak felel meg. Ha az előkészítés során figyelembe vesszük a minta hígulását, akkor a 0,01%-0,1%-os laktóztartalom refraktívindex (RI) detektorral már nem kimutatható. Ekkor kerülhet előtérbe az MS vagy MS/MS alapú detektálás.

MS/MS detektálás esetén a laktóz $[M + CH_3COO]^-$ negatív ionizáció mellett acetát adduktként (401 m/z) mérhető (3. ábra). Az eluensben formiát sóit használva formiát addukt $[M + HCOO]^-$ anion keletkezik. A HILIC-MS/MS készülék LOQ értéke standard szinten általában 0,1 µg/ml, tehát négy nagyságrenddel kisebb, mint a magyarországi határérték. Ez lehetőséget biztosít a minta nagyfokú hígítására, amely a mennyiségi meghatározást javítja abban a tekintetben, hogy a laktózzal együtt eluálódó háttérvegyüle-

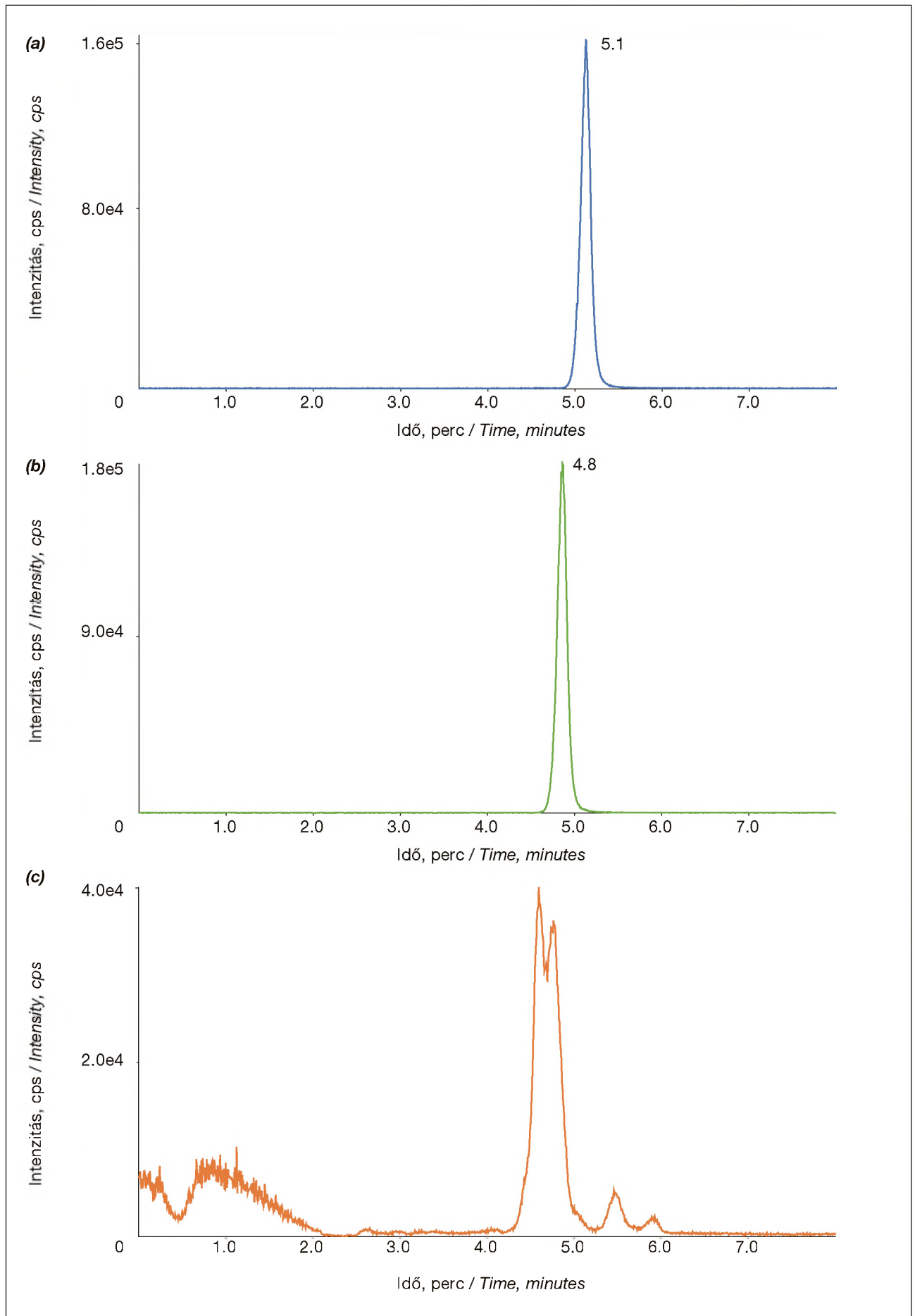
tek nem zavarják nagy mértékben a laktóz ionizációját a mintamátrixban (mátrixhatás). Ezzel a módszerrel a laktózmentesség egyszerűen ellenőrizhető, hiszen a mintát elegendő vízzel extrahálni vagy hígítani, a dekantált mintát acetonitrillel tovább hígítani, majd injektálás előtt fecskendőszűrővel kiszűrni. Tej vizsgálata esetén elegendő csupán acetonitrillel hígítani a mintát, ami egyben a fehérjéket és a zsirokat is leválasztja onnan. Ezt követő centrifugálás és szűrés után a minta közvetlenül injektálható a HILIC-MS/MS rendszerbe.

Egy másik diszacharid, a maltóz azonos monoizotópos tömeggel és szerkezettel rendelkezik, mint a laktóz (4. ábra), és mivel ionátmeneteik megegyeznek, ezért az MS detektor nem tudja külön tömegcsatornán detektálni őket. A két cukor egymás melletti, HILIC oszlopon történő mérése viszont nem okoz

2.táblázat. Körvizsgálati eredmények B-vitaminokra pezsgőtabletta és juice mintákban. FAPAS reggeliző pehely kontroll mintában (QC) detektált B-vitamin értékek.

Table 2. Professional test results for B vitamins in effervescent tablet and juice samples. Vitamin B values detected in FAPAS breakfast flake control sample (QC).

Minta Sample	Vitamin	Mért érték (mg/100 g) Measured value mg/kg	Hozzárendelt érték vagy elfogadhatósági tartomány (mg/100 g) Assigned value or acceptance range mg/100g	Z-érték Z-score	Értékelés Evaluation
Pezsgőtabletta Effervescent tablets	B1	0.39	0.40	-0.18	Jól megfelelt Well done
Dzsúsz / Juice		0.31	0.36	-0.71	Jól megfelelt Well done
FAPAS QC		0.85	0.53 – 0.86	-	Elfogadható Acceptable
Pezsgőtabletta Effervescent tablets	B2	0.52	0.50	0.17	Jól megfelelt Well done
Dzsúsz / Juice		< 0.05	-	-	Jól megfelelt Well done
FAPAS QC		1.63	1.33 -2.04	-	Elfogadható Acceptable
Pezsgőtabletta Effervescent tablets	B3 amid	5.44	5.61	-0.65	Jól megfelelt Well done
Dzsúsz / Juice		3.91	4.58	-1.05	Megfelelt Pass
FAPAS QC		17.8	15.7 – 21.1	-	Elfogadható Acceptable
Pezsgőtabletta Effervescent tablets	B5	1.95	2.35	-0.78	Jól megfelelt Well done
Dzsúsz / Juice		2.00	2.66	-0.96	Jól megfelelt Well done
FAPAS QC		-	-	-	-
Pezsgőtabletta Effervescent tablets	B6	0.45	0.51	-0.80	Jól megfelelt Well done
Dzsúsz / Juice		0.38	0.50	-0.67	Jól megfelelt Well done
FAPAS QC		1.15	1.02 – 1.59	-	Elfogadható Acceptable
Pezsgőtabletta Effervescent tablets	B9	0.058	0.057	0.07	Jól megfelelt Well done
Dzsúsz / Juice		0.059	-	-	Értékelés nem érkezett No evaluation received
FAPAS QC		0.154	0.104 – 0.194	-	Elfogadható Acceptable



3. ábra. 10 µg/ml laktóz (a), maltóz (b) és egy laktóz mentes tej (c) HILIC-ESI(-)-MS/MS kromatogramjai (401 > 341 m/z).
Figure 3. Chromatograms of 10 µg/ml lactose (a), 10 µg/ml maltose (b) and one lactose-free milk (c) HILIC-ESI (-) - MS / MS (401> 341 m/z).

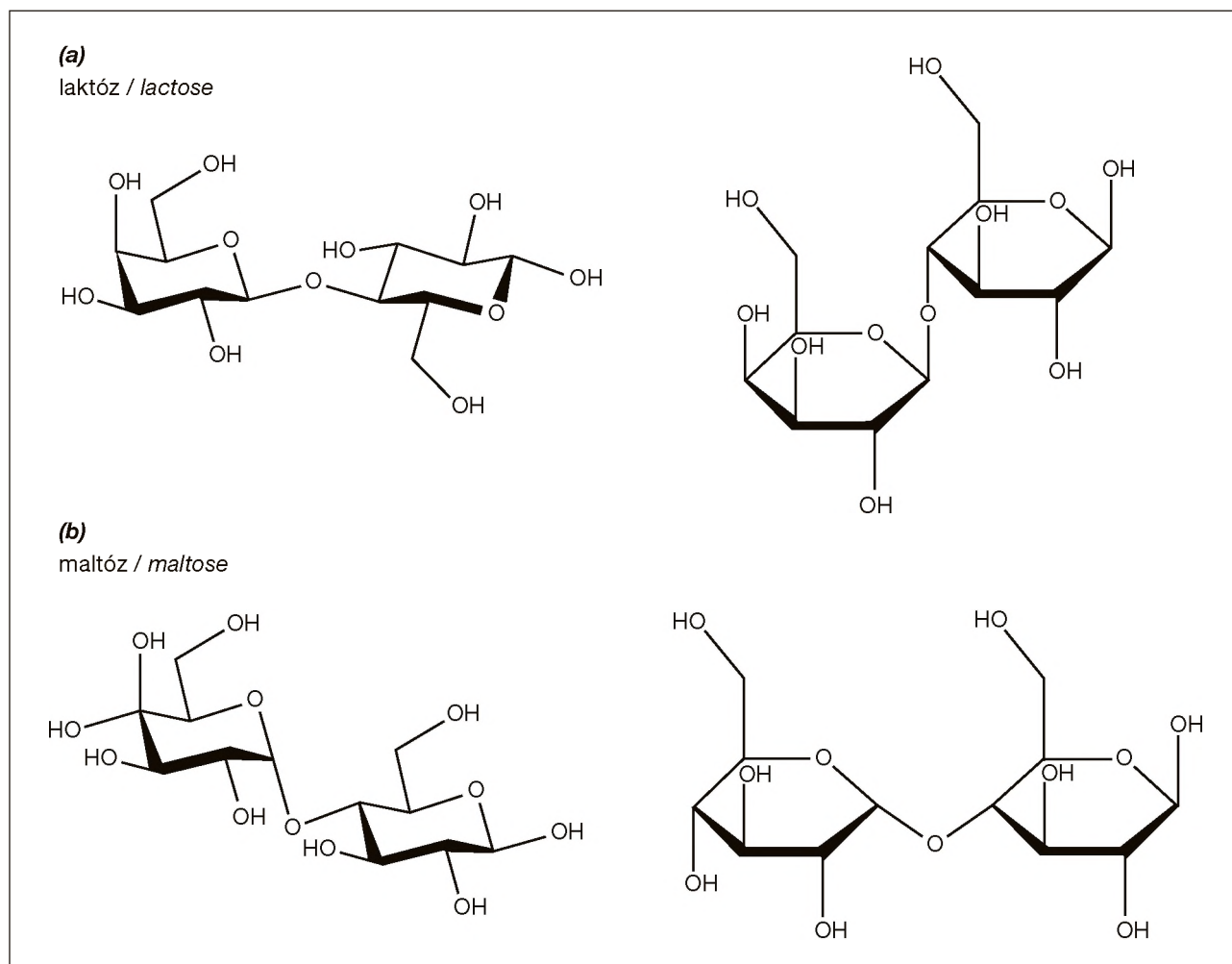
nehézséget, mivel az a cukrokat hasonló szerkezetük ellenére is elválasztja a folyadékfázisban a fent említett eluens segítségével (3. ábra).

6. Karbamid (urea) meghatározása takarmányból

Az urea a szénsav diamidja – $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ –, a fehérje-anyagcsere végterméke. Molekulatömege 60 g/mol. Az ureát kérődzők számára készült takarmányok adalékaként is használják. Az engedélyezett maximális karbamidtartalom 8800 mg/kg [17]. Más állatok (nem kérődzők) takarmányozása során viszont tiltott, a takarmányok ugyanis ezekben az esetekben nem tartalmazhatnak kimutatható mennyiségű ureát [17]. A karbamid mennyiségi meghatározására használt hivatalos spektrofotometriás vizsgálat [18] pontossága csak a nagymennyiségben jelenlévő urea kimutatása során megfelelő, a kismennyiségű célkomponens vizsgálata során azonban a módszer alkalmassága már megkérdőjelezhető. Az EU Joint Research Centre (JRC, Geel, Belgium) kutatólaboratóriuma 2019-ben laboratóriumok közötti összemérést, körvizsgálatot (PT UREA-19/2) szervezett, amelynek fő célja az volt, hogy megállapítsák azt, hogy a rendelkezésre álló analitikai módszerek közül melyek a legmegfelelőbbek az urea meghatározására

a nem kérődző állatok számára készült összetett takarmányminták esetében (compound feed).

A körvizsgálatban résztvevő laboratóriumok bármely számukra rendelkezésre álló technikát alkalmazhatták. A JRC által javasolt módszer egy HILIC-MS/MS vizsgálat volt, mely a „dilute-and-shoot” eljárás, valamint az Institute of Food Safety, Animal Health and Environment Laboratórium (BIOR, Riga, Lettország) módszerén alapult. A minta-előkészítés során hangyasavas vízzel (1%, v/v) extrahálják a mintákat, majd a dekantált mintát acetonitrilrel és izotópjelölt belső standarddal (urea- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$) hígítják. HILIC szilikagél állófázison 0,1% (v/v) hangyasavas víz-acetonitril mozgófázissal az urea jól mérhetővé válik (5. ábra). A megvizsgált háromféle takarmánymintában detektált urea koncentrációk 260 mg/kg és 890 mg/kg között változtak (3. táblázat), az utolsó sarzsban lévő minták (J-sarzs) pedig nem tartalmaztak kimutatható mennyiségben ureát (< 50 mg/kg). A körvizsgálati jelentés alapján a J-sarzs 18,4 mg/kg ureát tartalmazott, ami az LOQ szintünk alatt volt. A C-sarzs és a G-sarzs esetén a mintákhoz rendelt értékek 249 mg/kg és 935 mg/kg voltak. A két utóbbi mintára számolt Z-értékünk -0,2 és 0,2, ami megfelelő értékeket jelent.



4. ábra. A laktóz (a) és a maltóz (b) szerkezeti képlete.
Figure 4. Structural formula of lactose (a) and maltose (b).

7. Következtetések

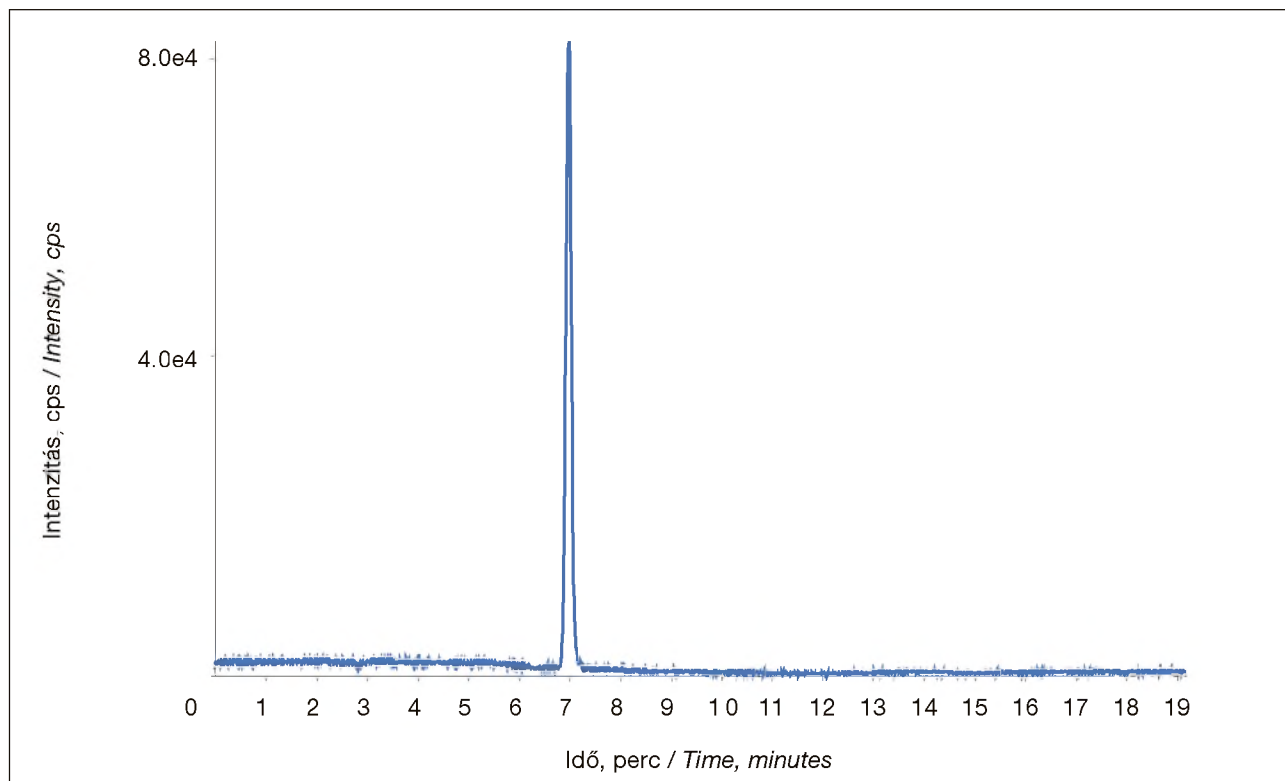
A HILIC technika alkalmazásának számos előnye van, amelyek közül ez a dolgozat csak néhányat említ. Az élelmiszeranalitikán túl a gyógyszer- és a környezetanalitikában is terjed a HILIC használata. A HILIC alkalmazásával például az ionpár-kromatográfia poláros, protonfunkciós vegyületek vizsgálatára váltható ki. A HILIC típusú elválasztások nem tartoznak a nagyfelbontású LC technikák közé, de a HILIC rendszert tömegszelektív detektálással összekapcsolva a komponensek jelei a detektorban elkülöníthetővé válnak, és a fent említett nagy érzékenység mellett a poláros célkomponensek megvizsgálhatók.

8. Köszönetnyilvánítás

A HILIC típusú elválasztásokkal Dr. Dernovics Mihály javaslatára kezdem el foglalkozni. Szeretném megköszönni ötleteit és tanácsait.

3. táblázat. Körvizsgálati eredmények karbamidra takarmány mintákban.
Table 3. Circular test results for urea in feed samples.

Minta kódja Code of sample	Mért érték (mg/kg) Measured value mg/kg	Mért érték 12% nedvességre vonatkoztatva (mg/kg) Measured value based on 12% mois- ture content mg/kg	Hozzárendelt érték (mg/kg) Assigned value mg/kg	Z-érték Z-score	Értékelés Evaluation
C	269	260	249	0.2	Jól megfelelt Well done
G	920	890	935	-0.2	Jól megfelelt Jól megfelelt Well done
J	<50	<50	18,4	-	Elfogadható Acceptable



5. ábra. 0,5 µg/ml-es urea standard HILIC-ESI(+)-MS/MS kromatogramja (61 > 44 m/z).
Figure 5. Chromatogram of standard 0.5 µg/ml urea HILIC-ESI (+) - MS / MS (61 > 44 m/z).