

D-vitamin meghatározása füstölt szalonnából HPLC-MS-MS módszerrel

Készítette: Ecsedi Anita Beatrix

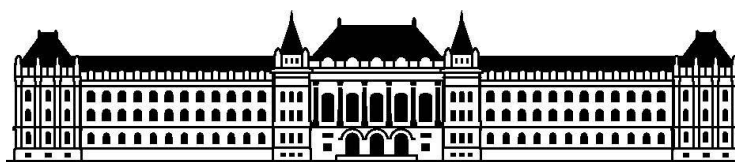
Vegyésszmérnöki szak

4. évfolyam

Témavezető: Dr. Horváth Viola

Beosztása: tudományos főmunkatárs

**A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009
"Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos
műhelyeiben" című program támogatta.**



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék
Budapest, 2012**

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Bevezetés.....	3
3. Irodalom	5
3.1. Általánosan a D-vitaminról	5
3.2. A D-vitamin, illetve metabolitjainak analitikai mérése élelmiszermintákból	10
4. Kísérleti rész	18
4.1. Anyagok, vegyszerek	18
4.2. Felhasznált műszerek, eszközök	18
4.3. Oldatok készítése	19
4.4. Tandem tömegspektrometriás módszerfejlesztés	19
4.5. Folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés	21
4.6. Minta-előkészítési módszer fejlesztése	24
4.7. Validálási paraméterek.....	27
5. Eredmények és értékelésük	29
5.1. Szelektivitás	29
5.2. Kimutatási és meghatározási határ.....	31
5.3. Linearitás vizsgálat	32
5.4. Rendszeralkalmasság	34
5.5. Módszerprecizitás	34
5.6. Visszanyerés.....	35
5.7. Stabilitás vizsgálat	40
5.8. Mátrixhatás vizsgálat	41
5.9. Szalonna minták mérése	43
6. Összefoglalás	48
7. Köszönetnyilvánítás	49
8. Irodalomjegyzék	50
9. Függelék	52
9.1. Detektálási határon felvett kromatogramok (D3:5ppb)	52
9.2.: Kimutatási határon felvett kromatogramok (D3: 10 ppb)	53
9.3. Kalibrációs sorozat	54
9.4. Visszanyerés vizsgálat	55
9.5. Szalonna minták mérési eredményei.....	57
9.6. Visszanyerési vizsgálatok kromatogramjai vízből 300 ppb-nél	58

2. Bevezetés

A D-vitamint az 1920-as években izolálták először hosszú kutatások után Adolf Windaus és munkatársai, ezt a munkájukat később Nobel díjjal jutalmazták [1]. Már korábban kiderítették azonban, hogy ennek a táplálék-összetevőnek a hiánya vezet az angolkór kialakulásához. A D-vitamin elősegíti és fenntartja a megfelelő kalcium és foszfát koncentrációt a szervezetben, ezáltal hozzájárul a csontok normális ásványianyagtartalmának megőrzéséhez. Ez a vitamin kiemelt szerepet játszik az immunrendszer megfelelő működésében is és csökkenti bizonyos rákfajták kialakulásának esélyét. A D-vitamin nem a szó szoros értelmében vett vitamin, hiszen a napfényben levő UVB sugárzás (a napfény közepes hullámhosszú ibolyántúli sugárzásának) hatására a bőrünkben is képződik. Manapság azonban az emberek nagy többsége D-vitamin hiányban szenved a napkerülő életmód miatt. Ezért kiemelt fontosságú a D-vitamin megfelelő táplálékokból, illetve táplálékkiegészítőkből történő felvétele. Ez egyben azt az igényt is felveti, hogy a különböző élelmiszerek D-vitamin tartalmát mérni tudjuk. A D-vitamin meghatározása analitikai szempontból nehéz feladat, mivel általában nagyon alacsony koncentrációban van jelen az élelmiszerekben. Mind a minta-előkészítés, mind a mérési technika komoly szaktudást kíván.

Dolgozatom célja, hogy bemutassa egy analitikai módszer fejlesztését és validálását, mely arra irányult, hogy füstölt szalonnából meghatározzam a D-vitamin mennyiségét. Felvetődött ugyanis, hogy zsíroldható vitaminról lévén szó, esetleg a szalonnában- főként szabad tartásban nevelt disznók szalonnájában- is megtalálható nagyobb mennyiségben, ami a közép-európai lakosság számára vonzóbb forrás lehet, mint a zsíros tengeri halak, amelyek köztudottan nagy D-vitamin tartalmúak. A szakirodalom áttekintése során nem találtam olyan hivatkozást, ahol ilyen mátrixból mérték volna a D-vitamint.

Elszappanosításon és folyadék-folyadék extrakción alapuló minta-előkészítést dolgoztam ki és a technika kidolgozása során optimalizáltam a különböző lépéseket. A tisztított minta elemzését tandem-tömegspektrometriás detektorral kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC-MS/MS) hajtottam végre, amelynek mérési körülményeit, paramétereit is optimaltam a módszer fejlesztése során.

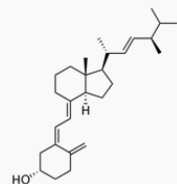
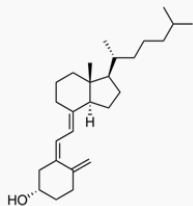
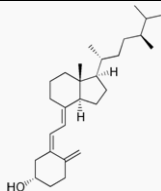
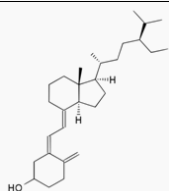
Meghatároztam a módszer analitikai teljesítményjellemzőit és értékeltem a validálási mérések során. Végül, a kidolgozott és validált módszerrel meghatároztam a Mangalica & Társai Húspatika hentes boltjában vett szalonna és Prof. Pretsch Ernőtől kapott, szabadon tartott sertésből származó szalonna D-vitamin tartalmát.

3. Irodalom

3.1. Általánosan a D-vitaminról

3.1.1. A D-vitamin, szintézise és metabolizmusa

A D-vitaminok a zsírolható vitaminok egy csoportját alkotják. Hatásmechanizmus és anyagcsere szempontjából inkább szteroid hormonnak, mint vitaminnak számítanak. Nem esszenciális vitaminok abból a szempontból sem, hogy az emlősök napfény hatására képesek szintetizálni. Különböző formái léteznek (vitamerek), ezek az 1. táblázatban láthatóak. Kémiailag szekoszteroidok, vagyis olyan szteroidok, amelyekben az egyik gyűrű fel van nyílv. A D-vitamin két legfontosabb formája a D2-vitamin (ergokalciferol) és a D3-vitamin (kolekalciferol) [2].

Név	Kémiai összetétel	Szerkezet
D1-vitamin	molekuláris keveréke az ergokalciferolnak és a lumiszterinnek, 1:1	
D2-vitamin	ergokalciferol (provitaminja: ergoszterol)	
D3-vitamin	kolekalciferol (provitaminja: 7-dehidrokoleszterin a bőrben).	
D4-vitamin	22-dihidroergokalciferol	
D5-vitamin	szitokalciferol (provitaminja: 7-dehidroszitoszterin)	

1. táblázat: A D-vitamin formái [3]

Az ergoszterin egyszerűbb élő szervezetekben fordul elő, ilyenek a fitoplanktonok, néhány gerinctelen állat és a gomba. A 7-dehidro-koleszterin a tejben és az emlősök bőrében fordulhat elő. Mindkettő provitamin, UVB (280-315 nm) fény hatására lesz az előbbiből D2-, illetve utóbbiból D3-vitamin.

A máj a D2- és a D3-vitamint 25-hidroxi-D-vitaminná ($25(\text{OH})\text{D}$), más néven calcidiollá alakítja át. A calcidiol a vesében vagy a vérben cirkuláló makrofágokban 1,25-dihidroxi-D-vitaminná ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), más néven calcitriollá alakul át. Ez a forma a biológiailag legaktívabb D-vitamin forma. A calcitriol D-vitamin-kötő fehérjéhez kapcsolódva a vérárammal eljut a különböző szervekhez. A sejtekben levő D-vitamin a receptorokhoz kötődve fejti ki hatását.

3.1.2. A D-vitamin biológiai szerepe

A D-vitamint az 1920-as években fedezték fel, amikor megpróbálták kideríteni, hogy milyen táplálék összetevő hiánya vezethet az angolkór kialakulásához [1,4]. A D-vitamin elősegíti a kalcium felszívódását a belekben és fenntartja a megfelelő kalcium és foszfát koncentrációt, amely a csontok normális ásványianyag-tartalmának megőrzését segíti elő. D-vitamin nélkül a kalciumnak mindössze 10-15%-a, a foszfornak 60%-a szívódik fel. Szükséges a csontok növekedéséhez is. Kellő mennyiségű D-vitamin nélkül a csontok vékonyá, torzzá és törékennyé válnak, ami gyerekeknél angolkórhoz, felnőtteknél osteomalacia-hoz vezet. Mindkettő betegség tulajdonképpen a csontok mineralizációjának, vagyis ásványi anyag beépülésének csökkent képességét jelenti. Kalciummal együtt a D-vitamin segíti megvédeni a felnőtteket a csonttritulástól és az izomgyengeségtől is.

Az utóbbi évek kutatásai azt mutatták, hogy a D-vitamin szerepe az élő szervezetben ennél sokkal többértű [5]. Annak felfedezése, hogy a szervezet legtöbb sejtje rendelkezik D-vitamin receptorokkal, új megvilágításba helyezte a D-vitamin biológiai funkcióit. A közelmúltban számos vizsgálat zajlott, amelyek részben igazolták, hogy ez a vitamin az immunrendszer megfelelő működésében is kiemelt szerepet játszik: csökkenti bizonyos rákfajták kialakulásának esélyét, valamint a kardiovaszkuláris, az autoimmun és a fertőző megbetegedések számát. A D-vitamin hiány által leginkább fenyegetett népesség csoportok a szoptatott csecsemők, az idősebb felnőttek, a keveset napozó emberek és a sötét bőrű emberek.

Mivel a D-vitamin zsírolható vitamin, terápiás alkalmazása során ritkán előfordulhat túladagolás is. Ennek tünetei: gyomor-bélrendszeri panaszok, fejfájás, kalcium elvándorlás a csontokból. A hipervitaminózissal együtt magas kalciumszint is kialakulhat, ami miatt a vizeletben fehérje mutatható ki, a vesefunkció károsodhat, esetleg veseelégtelenség is bekövetkezhet. Az ergokalciferol túladagolás következményei az alkalmazás leállítása után még hetekig eltarthatnak, míg a kalcitriol mérgezés tünetei néhány nap után elmúlnak [2].

A szervezet D-vitaminnal való ellátottságának mérésére a minta 25(OH)D koncentrációjának meghatározását használják. A 25(OH)D szint tükrözi az előállított D-vitamin mennyiségét és a felezési ideje is elég hosszú, 15 nap. Ellentétben a 25(OH)D-vel, az 1,25(OH)₂D nem igazán jó indikátora a D-vitaminnak, mert rövid a felezési ideje, 15 óra, ezért nehezen mérhető [2,6-7].

A 25(OH)D vitamin optimális szérumszintje jelenleg nincs egyértelműen meghatározva, a korábban ajánlott szintekhez képest manapság nagyobb koncentrációkat javasolnak. Az élet különböző szakaszaiban különböző szintek a megfelelőek. Az alábbi táblázat az Institute of Medicine, Food and Nutrition Board-által javasolt szérumszint 25(OH)D koncentráció szint felosztást mutatja [8].

nmol/L**	ng/ml*	Egészségi állapot
<30	<12	Angolkórhoz vezet a csecsemőknél és a felnőtteknél
30–50	12–20	Nem megfelelő
≥50	≥20	Megfelelő
>125	>50	Lehetséges mellékhatások jelentkezhetnek, főleg 150 nmol/L (60 ng/ml) felett.

*A szérumszint 25(OH)D koncentrációja nmol/L-ben és ng/ml-ben is fel lettek tüntetve.

** 1 nmol/L = 0.4 ng/ml

2. táblázat: A vérérszérumszint 25(OH)D koncentrációja és annak hatása az egészségre [8]

3.1.3. D-vitamin források

A szervezet a megfelelő D-vitamin mennyiséget elsősorban napozás során állítja elő. Természetes ételforrásokból nehéz beszerezni, mert kevés ételben található meg a D-vitamin, és azokban is nagyon alacsony a D-vitamin koncentráció. Sok ember számára a D-vitaminnal dúsított élelmiszerek és ezen felül valamennyi napozás szükséges az egészséges szint eléréséhez [2].

3.1.4. D-vitamin bevitel napozással

D-vitamin szükségletünknek egy részét legegyszerűbben a napozás során elégíthetjük ki. Az ultraviola B sugárzás áthatol a fedetlen bőrön, és átalakítja a 7-dehidrokoleszterint a D3-vitamin previtaminjává, mely később átizomerizálódik D3-vitaminná. Az évszak, a napszak, az időpont, a felhőzet, a szmog, a bőr melanin tartalma és a fényvédő krémek mind befolyásolják az UV sugárzás expozícióját és a D-vitamin szintézist. Talán meglepő, de a földrajzi szélesség nem képes megjósolni 25(OH)D-vitamin átlagos szérumszintjét a népességben. 5-30 perc napozás 10 és 15 óra között legalább kétszer egy héten napvédő krém nélkül általában a megfelelő D-vitamin mennyiség előállításához vezet [2].

3.1.5. D-vitamin bevitel természetes élelmiszerekből

A zsíros halak húsa (mint a lazac, tonhal, tőkehal) és a halolajak a legjobb D-vitamin források. Kis mennyiségű D-vitamin található a marha májában, a sajtban és tojássárgájában is. A D-vitamin ezekben az élelmiszerekben főleg D3-vitamin és ennek 25(OH)D metabolitja formájában található meg. Néhány gombafajtában különböző mennyiségekben van D2-vitamin. A 3. táblázatban néhány természetes élelmiszer D-vitamin tartalma található.

Étel	IU adagonként*	százalék DV**
Tőkehalmáj olaj, 1 evőkanál	1,360	340
kardhal, főzött, 3 dkg	566	142
lazac főtt, 3 dkg	447	112
Tonhal, szárított, 3 dkg	154	39
Szardínia, konzerv olaj, szárított, 2 szardínia	46	12
Máj, marhahús, főtt, 3 dkg	42	11
Tojás, 1 nagy (D-vitamin található a tojássárgájában)	41	10
sajt, svájci, 1 uncia	6	2

* IU = International Unit. 1 IU= biológiailag ekvivalens mennyiségű 0,025 µg D-vitaminnal. A farmakológiában az Internal Unit egy mértékegység az anyag mennyiségének jellemzésére. Az anyag biológiai aktivitását vagy hatását veszi alapul.

** DV = napi bevitel

3. táblázat: Különböző D-vitamin források [9]

A napi ajánlott bevitel értéke a D-vitaminra 400 IU felnőttek és 4 évesnél idősebb gyermekek számára. Látható tehát a táblázatból, hogy csak természetes táplálékból nagyon nehéz a megfelelő D-vitamin mennyiséget bevinni a szervezetbe. Az élelmiszerek címkéin nem kell feltüntetni a D-vitamin tartalmat, kivéve, ha egy bizonyos élelmiszer dúsított ezzel a tápanyaggal [9].

3.1.6. D-vitamin bevitel étrend kiegészítővel és dúsítással

Azoknak az idősebb gyerekeknek és felnőtteknek ajánlott étrend kiegészítőt bevenniük, akik nem tudnak naponta legalább 400 IU D-vitaminhoz jutni.

Az élelmiszerek D-vitaminnal történő dúsítása főleg az USA-ra és Kanadára jellemző, Európára kevésbé. Például az USA-ban a tejben a dúsítás miatt 100 IU/pohár D-vitamin van. Kanadában a tej 35–40 IU/100 ml-el, a margarin ≥ 530 IU/100 g-mal van dúsítva. A zabpelyhek, gabonapelyhek is tartalmaznak hozzáadott D-vitamint. A 4. táblázatban néhány dúsított élelmiszer D-vitamin tartalma látható.

Az étrend kiegészítőben és a dúsított élelmiszerekben a D-vitamin két formában van jelen: D2- (ergokalciferol) és D3-vitaminként (kolekalciferol). A D2-vitamint az élesztő UV besugárzásával az ergoszterolból szintetizálják. A D3-vitamint a lanolin besugárzásával 7-dehidrokoleszterinből, vagy kémiai átalakítással koleszterinből készítik. Kutatások azt mutatják, hogy ha a táplálkozási adagok egyenértékűek, akkor a D2-vitamin kevésbé hatásos a 25(OH)D szintjének emelésében [2,7].

Étel	IU adagonként*	százalék DV**
3 dl narancslé D-vitaminnal dúsított, 1 csésze (tekintse meg a termék címkéjén, a hozzáadott mennyiségű D-vitamin változó)	137	34
Tej, zsírszegény, csökkentett zsírtartalmú, teljes zsírtartalmú, D-vitaminnal dúsított, 1 csésze	115-124	29-31
Joghurt, dúsított, 6 dkg	80	20
Margarin, dúsított, 1 evőkanál	60	15
Azonnal fogyasztható gabonafélék, dúsított, 0,75-1 csésze	40	10

* IU = International Unit

** DV = napi bevitel

4. táblázat: Különböző D-vitaminnal dúsított élelmiszerek D-vitamin tartalma [9]

3.2. A D-vitamin, illetve metabolitjainak analitikai mérése élelmiszermintákból

Füstölt szalonnából végzett D-vitamin meghatározásra nem találtam példát a szakirodalomban. Egy közlemény foglalkozott a D-vitamin meghatározásával sertés zsírszövetből [10], más eredetű zsírszövetre és egyéb élelmiszerekre több irodalmi hivatkozást találtam [12-16].

A minta-előkészítés során a minta mátrixot olyan formára hozzuk, amely megfelel az analízis követelményeinek. A D-vitamin élelmiszer mintákból történő meghatározása a legtöbb esetben a minta elszappanosítását, egy extrakciós lépést, a komponensek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztását (HPLC) és detektálását foglalja magában. A D-vitamin analitikai mérésével kapcsolatos szakirodalmat ilyen felosztásban tárgyalom. A különböző analitikai módszerek lépéseit összehasonlítottam és az 5. és a 6. táblázatokban külön összefoglaltam.

A D-vitamin fényérzékeny vegyület, ezért a minta-előkészítést elsötétített helyiségben célszerű végezni és a mintákat fénytől védve kell tárolni és feldolgozni. A lehetséges oxidációtól megvédendő, vákuum csomagolni is célszerű a mintákat.

3.2.1. Elszappanosítás

Az első minta-előkészítési lépés az elszappanosítás. Az elszappanosítás során zsírokat (glicerideket) bázisos oldatban hidrolizálnak, amely során glicerin és a zsírsavak sói keletkeznek.

A minta-előkészítés történhet nagyobb és kisebb méretben is, attól függően, hogy mekkora mennyiség áll rendelkezésre az adott mintából. Nagy mennyiségek feldolgozására kifejezetten az állati eredetű élelmiszereknél van szükség, mivel ezek D-vitamin tartalma általában alacsony. Halak vagy halolajok D-vitamin tartalmának meghatározásához elég kis mennyiségek előkészítése is. A szakirodalomban zsírmintákból történő D-vitamin meghatározására mindössze két cikket találtam. Blum és társai 0,2-0,25 g-ot mértek be emberi zsírszövetből, mivel ez esetben korlátozott mennyiségű mintavételre van csak lehetőség [11]. Höllet és társai 20-100 g sertés eredetű zsírszövetet mértek be [10]. Tejből származó mintákból 1-100 g-ot mértek be a minta-előkészítések során [12-15]. Tojássárgájából, halból, gombából 0,5-30 gramm mintát használtak fel a mérésekhez

[13,14,16]. A bemérendő mennyiségeket a fentebb említett táblázatokban (3-4.táblázat) található feltételezett D-vitamin tartalomból és a kimutatási határokból állapították meg.

Az elszappanosítás KOH adagolással történt. A felhasznált KOH mennyisége különbözött, attól függően, hogy mennyi volt az adott minta elszappanosítani kívánt zsírtartalma. A kifejezetten magas zsírtartalmú emberi zsírszövethez 1,5 gramm KOH-ot használtak fel 1 gramm mintához [11]. A tej mintáknál a KOH és a minta aránya az előkészítések során 0,25-1 g KOH/ 1g minta volt [12,13,15]. Az elszappanosítások során a tojássárgájához, halhoz és a gombához 1 gramm feldolgozandó mintához 1-10 gramm kálium-hidroxidot adtak. [13,16]. A KOH-ot szilárd állapotban, illetve, vízben vagy etanolban feloldva használták.

Az elszappanosítás történhet melegítés nélkül, illetve melegítéssel. A melegítés nélkül történő elszappanosításnál szobahőmérsékleten egy éjszakán át mágneses keverővel kevertetik a mintákat, miután nitrogént buborékoltatnak át rajta [11,12,15,16]. A melegen történő elszappanosításnál 40-100°C -os vízfürdőn tartják a mintákat 20-60 percen keresztül. A melegítést nem csak vízfürdőben végezhetik, hanem reflux alatt is [13,15,17,18].

A KOH mellett gyakran aszkorbinsavat is adagolnak a mintákhoz. Ez megvédi a mintát az oxidációtól. Például 1 gramm margarinhoz, tejhez, tejporhoz, halhoz, zsírszövethez, tojássárgájához és anyatejporhoz: 0,02-0,1 grammot mértek be különböző szerzők az aszkorbinsavból [11-13,15,16].

A melegítés vagy a rázatás előtt általában etanolt adagoltak a mintákhoz. 1 gramm margarinhoz, tejhez, tejporhoz, zsírszövethez, gombához, halhoz és anyatejporhoz 5-50 ml etanolt találtak szükségesnek [11-13,15-17].

A Magyar Szabvány (MSZ EN 12821:2009) nátrium-szulfid használatát is javasolja, mert megakadályozhatjuk vele a nyomokban előforduló fémek katalitikus oxidációját. [17]

Väänänen és társai a tej minták előkészítésénél az oxidáció megakadályozására aszkorbinsav mellett pirogallol-t is felhasználtak. Az elegybe történő KOH adagolásakor 0,5 ml EDTA-t is bemértek, hogy megkössék vele az előforduló fémionokat. A hal minták esetében viszont az elszappanosítás után 10%-os NaCl adagolására volt szükség az emulzió keletkezésének elkerülése végett [13].

Höllet és társai zsírszövetből mérték a D-vitamin metabolitját, de nem alkalmaztak elszappanosítást. A homogenizált mintákhoz ionos felületaktív anyagot, Na-dodecilszulfátot és metanolt adtak, majd őrlés után centrifugálták. Az extraktumot tovább tisztították szilárd fázisú extrakcióval [10].

3.2.2. Extrakció

Az extrakciók során az etanollal megegyező mennyiségű vizet használtak fel az emulzió keletkezésének elkerülésére. Az elszappanosított minták folyadék-folyadék extrakciójához az irodalomban különféle oldószereket alkalmaznak: dietil-éter, diklórmetán, petróleum, petróleum éter: dietil-éter 1:1 elegye, n-hexán, etil-acetát [11-17]. A D3-vitamin kiextrahálása után centrifugálással választották szét a fázisokat.

Folyadék-folyadék extrakció mellett [11,14-16], illetve helyett [10,18] szilárd fázisú extrakció is alkalmazható a D-vitamin élelmiszermintákból történő kinyerésére. Normál fázisú tölteteket, leggyakrabban szilika tölteteket használnak, illetve aminopropil módosított szilikagélt.

Väänänen és társai az extrakció után további mintatisztításra normál fázisú fél-preparatív HPLC-t használtak [13].

3.2.3. Folyadékkromatográfiás elválasztás

Az előkészített élelmiszermintákban a D-vitamin, illetve metabolitjainak folyadékkromatográfiás elválasztására leggyakrabban fordított fázisú kolonnákat használtak fel. Erősen apoláris vegyületekről lévén szó a C₁₈-as, és az általános gyakorlatban ritkán használt, de nagyon hidrofób vegyületek esetén jó elválasztást adó C₃₀-as módosított szilikagél töltetek a leggyakoribbak [10,12,15,17].

3.2.4. Detektálás

Korábban a D-vitamin detektálására az UV abszorbanciamérés szinte kizárólagos volt. A HPLC-hez kapcsolt tömegspektrometriás detektálás elterjedésével a D-vitamin analitikájában is megjelent ez a módszer. A D-vitamin és metabolitjainak hidrofóbicitása miatt kézenfekvő az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáción alapuló ionforrás használata [10,11,15,18]. Jarvis és társai viszont pozitív eletrospray ionforrással ionizálták a molekulákat [19]. SIM és MRM módban is történtek mérések a meghatározások során.

A Magyar Szabvány által javasolt elszappanosítási és extrakciós körülmények:

Szappanosítás	Extrakció
16 g zsír+150 ml metanol+ 1g pirogallol+(75 ml víz + 30 g KOH)+ nitrogén buborékolatás: 70 °C 30 percet	PE+DEE (9+1) 2*100 ml, vizes mosás 5*100 ml
8g zsír+100 ml etanol+1g nátrium-aszkorbát+0,04g nátrium-szulfid+12g KOH+50 ml víz+nitrogén átbuborékolatás: 80 °C 30 percet	n-hexán, 3*100 ml és 3*50 ml; vizes mosás 4*100ml
8g zsír+35 ml etanol+2g nátrium-aszkorbát+10 g KOH+50 ml víz+100°C 45 percet	n-hexán 1*100 ml; 5% KOH mosás, 1*100ml; 30%-os etanol 9 %-os nátrium-kloridban ezzel mosás 1*100 ml; 0,9 %-os nátrium-klorid mosás 1*100ml
12g zsír+30 ml etanol+30 ml metanol+0,1 g aszkorbinsav+30 ml 50%-os KOH+ nitrogén átbuborékolatás+100 °C 30 percet	DEE, 2*100ml; vizes mosás, 4*50 ml
6-8 g zsír+100ml etanol+1g aszkorbinsav+50 ml 50%-os KOH+nitrogén átbuborékolatás: 100°C reflux alatt 30 percet	PE+DEE (1+1), 2*200ml, vizes mosás, 6*50 ml
8g zsír+1g pirogallol + 150 ml 28 %-os KOH etanolban és víz (9+1)+nitrogén átbuborékolatás: 100 °C reflux alatt 30 percet	DEE+PE (1+1),2*500ml, vizes mosás, 5*150 ml
24 g zsír+90 ml etanol+0,5 g nátrium-aszkorbát+30 ml 60%-os KOH+ nitrogén átbuborékolatás: 100 °C 45percet, reflux alatt	DEE, 1*150ml, 3*75ml, mosás 5*200 ml

KOH= Kálium-hidroxid
PE= petróleum-éter
DEE= dietil-éter

A Magyar Szabvány által javasolt HPLC körülmények:

Példák a félpreparatív HPLC rendszerekre. (A minta tisztításához használták)

Kolonna	Dimenziók mm	Eluens (V+V)	Detektálási hullámhossz
Polygosil 60, 5 µm	250*8	izo-oktán+iso-butanol (99+1)	265 nm
LiChrospher Si 60, 5µm	250*4	n-hexán+2-propanol (99+1)	265 nm
LiChrospher Si 100, 5 µm	250*8	n-hexán+ 2-propanol (98+2)	265 nm
µPorasil silica	300*3,9	n-hexán + THF+2-propanol (98-1-1)	265 nm
Partisil PAC, 5 µm	250*4,6	n-hexán+ isoamilalkohol (99+1)	265 nm
LiChrosorb Si 60	250*4	n-hexán+ 2-propanol+THF (98+1+1)	265 nm
LiChrosorb Si 60	250*4	n-hexán+2-propanol (95+5)	265 nm
LiChrosorb Si 60	250*4	n-hexán +2-propanol (97+3)	265 nm

Példák analitikai HPLC rendszerekre, amiket a D-vitamin detektálásához használtak:

Kolonna	Dimenziók mm	Eluens (V+V)	Detektálási hullámhossz
Hypersil ODS, 5 µm	250*4,6	metanol	265 nm
LiChrospher 100 RP 18,5 µm	250*4	metanol+víz (95+5)	264 nm
Vydac 201TP54	250*4,6	metanol+víz (93+7)	265 nm
Vydac 201TP54	250*4,6	acetonitril+metanol (80+20)	265nm
Spherisorb ODS 2,5 µm	250*4,6	acetonitril+diklórmétán+metanol (93+4+3)	dióda sor
Nucleosil C ₁₈ , 5 µm	250*4	acetonitril+metanol (70+30)	265 nm
Zorbax ODS	250*4,6	acetonitril+metanol (95+5)	265 nm

5. táblázat: A Magyar Szabványból vett példák lehetséges extrakciós, elszappanosítási és HPLC körülményekre [17].

Hivatkozás	Minta	Elszappanosítás	Extrakció	SPE	Félpreparatív HPLC	HPLC körülmények	Detektálás
[19]			200 µl plazma +vortex 15 perc+1 ml hexán+15 perc kevertetés+ centrifuga 15perc 14000 rpm +felső hexán fázisból 800µl+nitrogén alatt szárítás 45°C + 175 µl 50:50 metanol-víz			Phenomenex Kinetex PFP KOLONNA (100*3.0 mm,2.6 µm, 100A), 30°C, 400 µl/perc, Eluens A: víz+0.1 hangyasav Eluens B: metanol +0.1 % hangyasav, 6 perc,	ESI(+) MRM mód
[17]	margarin, tej, tejpör,sütőolaj, halolaj	110 g- 30 g minta +Nitrogén alatt refluxáltatás+ etanol, víz, antioxidáns (aszzkorbinsav) és KOH oldat +Nátrium-szulfid, Lehetséges mennyiségek: minta: 10-30 g+ etanol:100 ml+ aszkorbinsav: 1- 2.5 g+ KOH: 50 ml 50g/100 ml-ből+ 20-45 perc 70-100°C-on melegítés+ KOH és idő, ha nem tökéletes az elszappanosodás+Etanolos szappanosító oldat: 28 g KOH/100 ml etanol: víz 90: 10 elegyben.	Az etanollal megegyező mennyiségű víz, az emulzió elkerülése miatt +Oldószerek az extrakcióhoz: dietil-éter, diklórmétán, petróleum, n-hexán, etil-acetát.+ 2-4-szer extrahálás +Az extrahált fázisokat ph:7-es desztillált vízzel mosták ötször +Víz helyett 2.6 mol/l Na-acetát 0.9 % NaCl és 3-5 % KOH oldata használható +40°C bepárolás. +Vízmentes Na-szulfátot a vízmentesítés céljából.			C18 5 µm, 4mm* 250 mm, eluensek: fordított fázisnál: metanol, metanol-víz 95:5 vagy 93:7, ACN és metanol 80:20 vagy 90:10 és 70:30 (további lehetséges HPLC körülmények a 5.táblázatban)	UV
[16]	tojás sárgája	szobahőmérsékleten szappanosítva: 93%, 100 fokon: 85 %, csökkentett fényviszonyok mellett+ botturmixal homogenizálták,+ 20g minta +250 ml-es Erlenmeyerben +1-2 µg D2 +20 ml aszkorbinsav 10 W/W %-os vízben, + 50 ml KOH 50 W/W%-os desztillált vízben, + 100 ml etanol + 30 sec nitrogén átbuborékolgatás +éjszakán át mágneses keverővel kevertetés,	Kétszer 2 percet 200 ml pertoleum éter, dietil-éter 1:1 elegyével extrahálták+ A gyűjtött fázist addig mosták vízzel míg semleges nem lett +Szárították vízmentes Na-szulfáttal, +leszűrték, és bepárolták +10 ml n-hexánban visszaoldották.	SPE:Bakerbond Silica 0.5g, Bond Elut silica 0.5g, Blond Elute Amino 0.5 g, n-hexán vagy n-hexán izopropanol elegy az oldószer		Vydac TP54 25cm*4.6 mm, 5 µm, Eluens: 94 % metanol és 6 % víz, 1 ml/min, 25 µl : inj. térfogat.	UV
[11]	zsírszövet, aprózva, szárítva	minta 0.2-0.25 g +1.3 ml víz, +1.3 ml etanol, homogenizálták PowerGen 125 Homogenizer-el. +200 µl -t ebből az elegyből egy kémcsőbe bémértek+ 200 µl 288 nmol/l D3 belső standard +bepárlás 45°C,nitrogén alatt + 1 ml 30 %-os KOH +1 ml víz +Kevertetés szobahőmérsékleten 250 rpm 3 óra	2 ml víz és 3 ml hexán + összekevertetés + 3 ml abszolút etanolt +vortex 5 perc+ centrifuga 3000 rpm 4°C +felső hexános fázist bepárolták nitrogén alatt 45°C-on +(SPE-C18 használat + 20 µl metilén-klorid és 180 µl metanol			4.6*250 mm, 30 °C, 1 ml/min, Eluens A: metanol, Eluens B: metilén-klorid, Gradiens elúció: 1-10 perc: 100% Eluens A, 10-25. perc: 50 % A és 50 % B, 25-35 perc: 100 % eluens A.	APCI (+), SIM

Hivatkozás	Minta	Elszappanosítás	Extrakció	SPE	Félpreatatív HPLC	HPLC körülmények	Detektálás
[12]	tej, tejpör, szójabab olaj,	30 g minta+ 3 g aszkorbinsav +65 ml KOH-etanol oldat (50 ml etanolban 15 ml 60 W/V% KOH) + Egész éjszaka rázás szobahőmérsékleten.	Elválasztó tölcserben: +25 ml hexánt+ 5 percet rázás+ 3-szor megismételték +A szerves fázisokat egyesítették +25 ml víz +40°C bepárolták szárazra + 5 ml metanol			C18, 250mm*4.6 mm, 5 µm, 30 fok, 20 percet 2 ml/perccel kondíciáltak. Eluens: SDS 0.1-3 W/V% butil-alkohol 10, 12 vagy 15 %. 1 literre kiegészítve 20 mmol/liter foszfát pufferral. PH=7. Használat előtt 0.45 µm-es membránnal szűrték át.	UV
[10]	sertés zsírszövet:	20-100g minta	Homogenizálás botmixerrel + A homogenátumból 0.5 g keverődénybe + 2 ml 0.2 N Na-dodecil-szulfát + 2 perc örlés+ 2 ml metanol+ 250 ng ISTD-t és 50 µl metanol+ 10 perc 3000 rpm centrifugáltatás +A felülzóból 1000 µl -t kimertek és +4000 µl metanol: víz 1:1 arányú elegye	Chromabond SPE C18. 500 mg redukált nyomáson. Cartridge 1 ml metanollal lett aktiválva és 1 ml vízzel lett ekviribálva. 1000 µl extraktum lett a Cartridgeba töltve.Majd 1 ml vízzel mosták az oszlopot, és 2 ml etanollal eluálták. Az eluátumot bepárolták csökkentett nyomáson.(rotálás) Visszaoldották 250 µl víz-etanol 1:1 arányú elegyében.		50 µl : inj. Térfogat. Aquisil C18 3mm*100 mm, 3 µm, Forward flush mód	APCI positive, SIM 25-OH-D3 = 401.3 m/z drying gas: 9.5 l/min 225 fokon, spray gas: 50 psig 250 °C-on, ionisation potential: 3000V, corona current: 10 µA,fragmentor: 90 V
[13]	tej termosztált 40 °C-on	1g minta+Csökkentett fényviszonyok +AAS etanol (4 ml) + kevés pyrogallol és aszkorbinsav +votex+10 percet várakozás + Nitrogénnel átbuborékkoltatták +0.5 ml EDTA és 0.5 ml KOH (KOH50) (KOH 50: 50 g 100 ml vízben feloldva) +rázás+forrásban levő vízfürdőbe rakták 20 percre +10 percenként a csöveket megrázták	Minták lehűtése+2 ml víz és n-hexán-etil acetát (8+2, v/v) + 500 rpm centrifugáltatás10 perc+ 2 ml n-hexán-etil acetát (8+2)+ rázás+A szerves fázisokat összeöntötték és 30°C-on nitrogén alatt bepárlás +1 ml-n-hexán		Normal fázisú LC: µPorasil kolonna 10 µm, 30 cm*3.9 mm, Eluens: n-hexán, tetrahidrofuran és 2- propanol (98:1:1). 1 ml/perc. Inj. Térfogat: 300 µml. Az összegyűjtött frakciókat nitrogén alatt bepárolták és 150 µl 7 % vizes metanolban feloldották.	Vydac TP 54 5 µm, 25 cm*4.6mm, 25 fokon, Eluens: 93 % metanol és 7% víz. 1 ml/perc 75 µl: inj. Térfogat.	UV 265 nm
	hal	1g homogenizált minta +5 ml 2%-os aszkorbinsav(vizes) +10 ml etanol +1 ml belső standard (0,2 µg D2)+Vortex+ mosás nitrogénnel + 4 ml KOH-t a KOH100-ból. (KOH100: 100 g KOH 100 ml vízben)+ Forrásban levő vízfürdőben 20 perc + 10 perc után vortexelték + jeges vízfürdő 10 perc+ 10 ml 10 %-os NaCl-t	20 ml n-hexán-etil acetát (8+2) elegye+2 perc rázás Desaga mixer-rel+3-szor +szerves fázisokat 100 ml-es csöbe gyűjtötték +20 ml 5%-os NaCl-al mosás +Bepárlás 30°C-on+5 ml etanol+5 ml n-hexán+bepárlás.		Normál fázis LC: µPorasil kolonna 10 µm, 30 cm*3.9 mm, Eluens: n-hexán, tetrahidrofuran és 2- propanol (98:1:1). 1 ml/perc. Inj. Térfogat: 300 µml. Az összegyűjtött frakciókat nitrogén alatt bepárolták és 150 µl 7 % vizes metanolban feloldották.	Vydac TP 54 5 µm, 25 cm*4.6mm, 25 fokon, Eluens: 93 % metanol és 7% víz. 1 ml/perc 75 µl: inj. Térfogat.	

Hivatkozás	Minta	Elszappanosítás	Extrakció	SPE	Félpreparatív HPLC	HPLC körülmények	Detekálás
[18]	Csecsemőknek készült ételek: gabona és anyatej por	Elhomogenizált ételminta (50 g)+ 100 ml meleg víz (40°C)+rázás+ 30 g ebből a mixből+0.2 g takadiastase+ 30 perc 45°C-on+folyamatos rázogató+7 g KOH+ 50 ml etanol+1 g szódium-szulfid+1 g aszkorbinsav+ Nitrogén alatt összerázták+ reflux alatt 30 perc 5°C-onmelegítés+ 2 g nátrium-1-pentánszulfonát+100 ml-re kiegészítették az elegyet vízzel.		SPE: Cartridge: Chromabond XTR, 70 ml cartridge (Macherey-Nagel, Düren) 20 ml elszappanosított oldat +15 perc adszorbeálódás+ 100 ml n-hexán (5 mg BHT-t tartalmazott) + Bepárlás+4 ml HPLC eluens+ 0.45 µm-es membrán szűrőn		inj. Térfogat: 40 µl , Nucleosil 100-5, 250mm*4.6 mm. 1.45 ml/perc, Eluens: hexán/dioxán/2-propanol (96.7:30.3, v/v/v)	APCI, 200 V: fragmento voltage, gas flow: 5 l/min, nebulizer nyomás: 60 psig, 350 °C ckapillaris feszültség. 3000V,korona feszültség: 4.0 µA, SIM D3: 379.1 397,1 398,2 m/z D2:385.2,386.2,367.2 m/z
[14]	50-100 g tej és tejtermékek, 1 g gomba 20 g hal,tojássárgája, hús,margarin, máj	elszappanosítást egy éjszakán át végezték. (Matilla 1992)	Kétszer kiextrahálták dietyl-éter és petróleum éter 1:1 elegyével.	SPE: tojássárgájánál és margarinnál silica SPE kolonnán. (2 g tojássárgája és 0.5 g margarin). Az oldószer: n-hexán-2-propanol.	Minden mintához használtak.	RP és SP is lehet	UV
[15]	Dúsított tehén tej és csecsemőknek adható tejpor	10 ml minta +0.5 g aszkorbinsav +40 ml etanol +10 ml 100 % (w/v) KOH-al vízben +Reflux alatt melegítés 30 perc + jeges fürdő	50 ml víz+10 ml etanol + Elválasztó tölsérbe öntötték + 50 ml hexán, ami tartalmazott 15 mg/l BHT-t +kirázás+ még kétszer,de 20 ml hexánal+ hexános fázisokat 3*100 ml vízzel mosták + 40°C-on bepárlás +1 ml internal standard oldószert+3 mm-es 0.45 µm Teflon szűrőn átnyomták.			autosampler 4 °C 2.1*150 mm 5 µm Polaris C18-A kolonna 30 °C-on. Eluens: metanol/víz (92:8 v/v) 0.2 ml/perc.	APCI hőmérséklet: 200 °C, ion feszültség: 4.5 µA,Fűtött kapillaris: 200 °C sheath és auxiliary gázok: 20 és 5 units. Forrás feszültség: 4.4 kV,kapillaris feszültség: 16 V
	Nem dúsított tej és friss tehéntej	10 ml minta + 0.5 g aszkorbinsavval +40 ml etanol +10 ml 100 % (w/v) KOH-al vízben +Reflux alatt melegítették 30 percet + Lehűtötték jeges fürdőben.	51 ml víz+10 ml etanol + Elválasztó tölsérbe öntötték + 50 ml hexán, ami tartalmazott 15 mg/l BHT-t +kirázás+ még kétszer,de 20 ml hexánal+ hexános fázisokat 3*100 ml vízzel mosták + 40°C-on bepárlás +1 ml internal standard oldószert+3 mm-es 0.45 µm Teflon szűrőn átnyomták.	2 ml hexán-t öntöttek 500 mg Silica SPE cartridge-ra. A cartridgeg mosták 3 ml hexánal és 3 ml hexán: etil-acetát (80:20 v/v) elegyével. Bepárolták és 0.25 ml internal standard oldószertben visszaoldották.			

6. táblázat: Összefoglaló táblázat a szakirodalomban talált, élelmiszerekből történő D-vitamin meghatározásokról

4. Kísérleti rész

4.1. Anyagok, vegyszerek

- KOH: Gyártó: Siegfried AG K: 162900 T367
- Etanol abszolút: Gyártó: Molar Chemicals KFT. 02910-101-340
- N-hexán. Gyártó: Prolabo Product code: 20864.320 95%-os,
- Acetonitril: Gyártó: Merck KGaA HPLC gradiens minőség, Index No: 608-001-00-3
- D2-vitamin standard (Ergokalciferol), Gyártó: Applichem, Lot: 9T000046,
- D3-vitamin standard (Kolekalciferol), Gyártó: Supelco, Lot: LB71018
- Ultratiszta víz (18 MΩcm): Millipore Corporation, USA

4.2. Felhasznált műszerek, eszközök

- Nagynyomású folyadékkromatográfiás pumpa: Perkin Elmer Series 200 micro LC pump (Perkin Elmer, MA, USA)
- Degasser (buborékmentesítő): Perkin Elmer Series 200 Vacuum Degasser
- Mintaváltó: Perkin Elmer Series 200 Autosampler
- Kolonna fűtés: Perkin Elmer Series 200 Column Oven
- MS: PE SCIEX API 365 LC/MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Kémcsőkeverő: Heidolph Reax 2000 (Heidolph Elektro GmbH, Keilheim, Németország)
- Automata Pipetták: Eppendorf 1000 µl-es és 200 µl-es
- Centrifuga: Eppendorf Centrifugea 5430R (Eppendorf GmbH, Hamburg, Németország)
- Bepárlókészülék: TurboVap LV (Zymark, Hopkinton, MA, USA)
- Folyadéktermosztát: Typ: M5 (Prüfgeräte WERK, Medingen sitz Freital, NDK)
- Ultramikromérleg: 4504 MPB-1 (Sartorius GmbH. Göttingen, Németország)
- Analitikai mérleg: RC 250S (Sartorius GmbH. Göttingen, Németország)

4.3. Oldatok készítése

A D2- és D3-vitaminok törzsoldatait szilárd anyagból pontos tömegbeméréssel készítettem acetonitril oldószerben 200 ppm ($\mu\text{g/ml}$) koncentrációban. A kalibrációs oldatsorozat készítése ezekből acetonitriles hígítással történt. A belső standardként használt D2-vitamin koncentrációja 5 ppm volt, a D3-vitaminé pedig rendre 5 ppb, 10 ppb, 30 ppb, 50 ppb, 75 ppb, 100 ppb, 300 ppb, 500 ppb, 750 ppb, 1 ppm, 3 ppm és 5 ppm.

4.4. Tandem tömegspektrometriás módszerfejlesztés

A D3-vitamin az irodalmi adatok alapján feltehetően nagyon alacsony koncentrációsinten van jelen a füstölt szalonnában. A szalonna, mint mátrix, ráadásul nagyon sok egyéb hidrofób zavaró komponenst tartalmazhat. Emiatt a D3-vitamin detektálására a folyadékkromatográfiás elválasztás után tandem tömegspektrométert választottunk, annak nagy szelektivitása és érzékenysége miatt. A minta-előkészítés és mérés reprodukálhatóságának növelése céljából D2-vitamint választottuk belső standardnak. Ez a vegyület természetes eredetű húsmintákban nem fordul elő, tulajdonságai nagyon hasonlóak a D3-vitaminhoz és jóval olcsóbb, mint a D3-vitamin deuterált formája.

A mérendő anyagok ionizálására atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs (APCI) ionforrást használtam, mivel az általam vizsgált vegyületek nagyon apolárisak, ezért elektropray ionforrással nem jól mérhetőek. Az APCI ionforrást pozitív ionizációs módban használtam. Az 1. ábrán az általam használt APCI ionforrás képe látható [20,21].



1. ábra: APCI ionforrás [21]

APCI ionforrás működése: A mintát tartalmazó eluens egy kapillárison keresztül érkezik az ionforrásba.

Egy koncentrikus kvarccső veszi körbe, amelyben fűtött gáz áramlik. A kapillárisból kilépő folyadékot a porlasztógáz apró cseppekre porlasztja, amik szinte azonnal elpárolognak. A térbe benyúló tűn korona kisülés jön létre, amely elsősorban az oldószer molekulákat ionizálja. Ezek adják át töltésüket a minta molekuláknak.

A módszerfejlesztés első lépése a tandem tömegspektrométer optimalizálása volt. A D2- és D3-vitamint tartalmazó standard oldatot infúziós pumpával folyamatosan, kis áramlási sebességgel (10 $\mu\text{l}/\text{perc}$) juttattam a tömegspektrométerbe. A molekulaionokat teljes scan módban kerestem meg. A két molekulaion $[\text{M}+\text{H}]^+$ protonált molekulaion volt. A molekulaionok megtalálása után megkerestem a fragmens ionokat leányion scan üzemmódban. Kiválasztottam a legintenzívebb fragmenseket. A D3-vitamin esetén: 385,4 m/z a molekulaion és 107 m/z a legintenzívebb fragmens, D2-vitamin esetén 389,7 m/z a molekulaion és 69 m/z a legintenzívebb fragmens.

MRM üzemmódban a Q1 kvadrupólon a molekulaiont, a Q3 kvadrupólon a fragmensionnt átengedve optimalizáltam a detektálást a következő négy paraméterre: deklaszteráló potenciál (DP), belépési potenciál (EP), ütközési energia (CE) és ütközési cella kilépési potenciál (CXP).

Áramló oldatos injektálós üzem módban (FIA, flow injection analysis) optimalizáltam a függőnygázt, a GS1-et (szárító gáz) és a hőmérsékletet a fragmens ionok maximális intenzitásának érdekében.

A tömegspektrométer optimált paraméterei a D3-vitaminra pozitív üzem módban: hőmérséklet: 350°C, függőnygáz: 10 l/h, GS1: 40, NC:2 (kisülési áram), CEM: 2000 (elektronsokszorozó feszültség), CAD gáz (ütközési gáz): közepes, DP: 40 V, EP: 4 V, CE: 40 eV, CXP: 15 V.

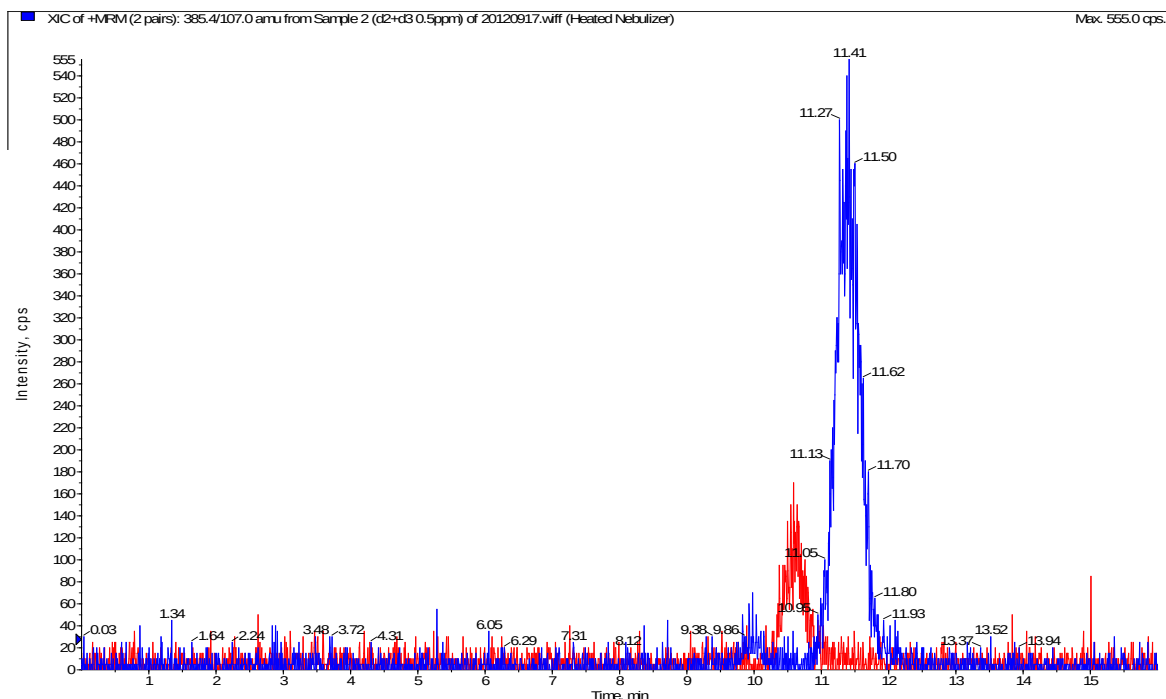
A tömegspektrométer optimált paraméterei a D2-vitaminra pozitív üzem módban: hőmérséklet: 350°C, függőnygáz: 10 l/h, GS1: 40, NC:3 (kisülési áram), CEM: 2000 (detektor feszültség), CAD gáz (ütközési gáz): közepes, DP: 48-64 V, EP: 5 V, CE: 40-60 eV, CXP: 6-15 V.

A tömegspektrometriás mérő módszerben bizonyos paraméterek nem állíthatók vegyület szerint, így ezek esetén a D3-vitamin optimalizált paramétereit használtam, mivel ez a mérendő anyag és ezt kell érzékenyebben mérni. A 3. ábrán megfigyelhető, hogy a D3-vitamin intenzitása négyszeres a D2-vitaminéhoz képest ugyanannál a koncentráció értéknél. Ez részben annak köszönhető, hogy a D2-vitamin esetében nem minden paraméter optimalizált a módszerben.

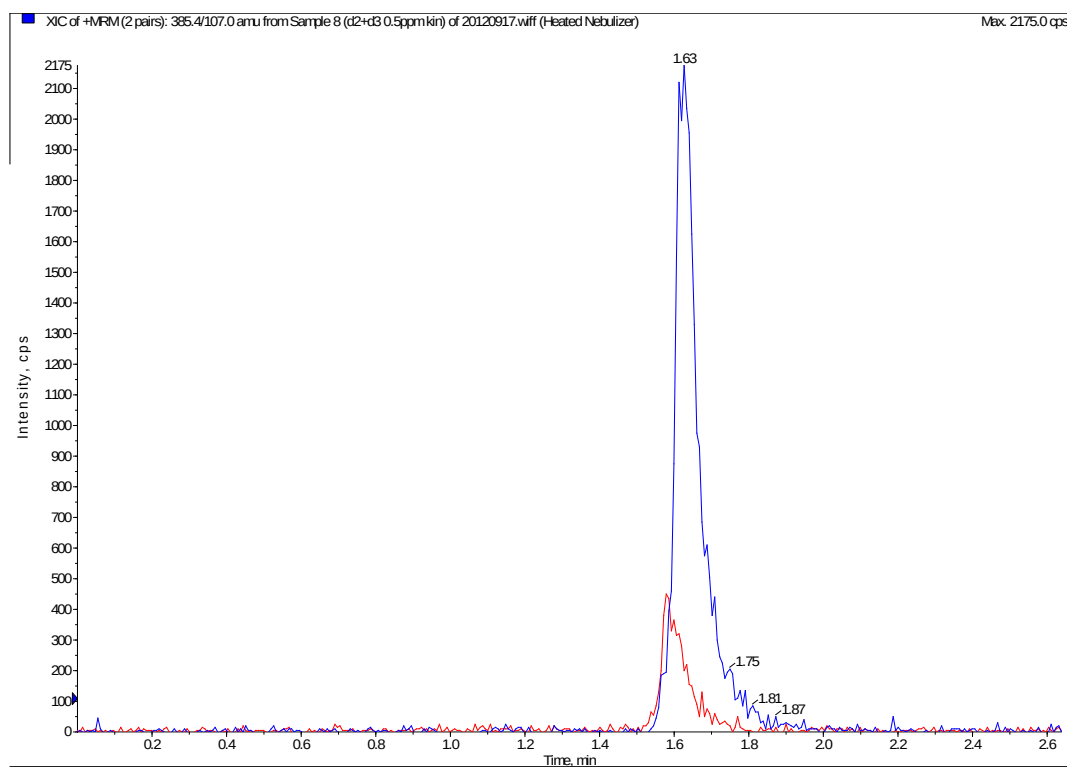
4.5. Folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés

A minta folyadékkromatográfiás elválasztására két különböző oszlopot próbáltam ki. Az első egy polimerfázisú C₁₈-as, Asahipak ODP-50 4.0x125mm-es 5 µm-es kolonna volt. A második oszlop egy héjszerkezetű C₁₈-as, Kinetex 2,1x50 mm-es, 1,7 µm-es kolonna volt.

Eluensként tiszta acetonitrilt használtam. Az áramlási sebesség 500 µl/perc volt, a minta injektálási térfogat 10 µl, a mintaváltót 20 °C-on termosztáltam. A két különböző oszlopon mért kromatogramokat a 2. és a 3. ábra szemlélteti 0,5 ppm D2- és D3-vitamin injektálása esetén.



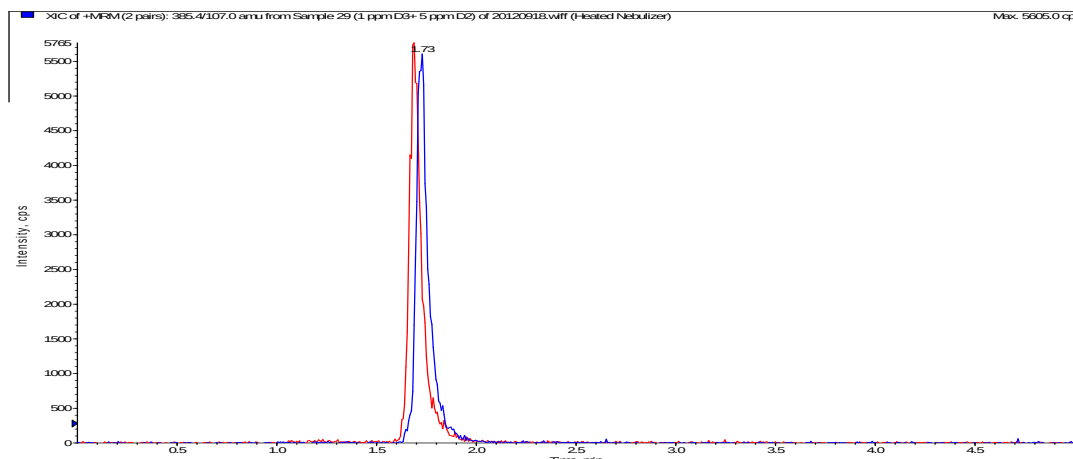
2. ábra: Asahipak oszlopon felvett kromatogram D2- és D3-vitamin injektálásakor. 0,5 ppm koncentrációnál. (D3-vitamin-kék, D2-vitamin-piros)



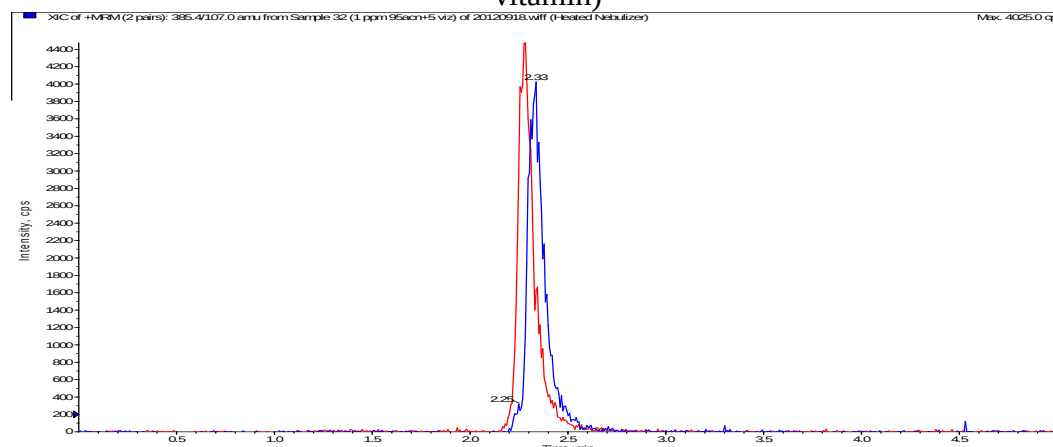
3. ábra: A Kinetex oszlopon felvett kromatogram 0,5 ppm koncentrációjú D2- és D3-vitamin injektálásakor. (D3-vitamin-kék, D2-vitamin-piros)

A két anyag a hagyományos polimer fázisú oszlopon szinte alapvonalig elvált, de 13 perc volt a retenciós idő. A héjszerkezetű Kinetex oszlop használata során a két csúcsteljesen átlapolt, de 2 perc alatt eluálódtak a csúcsok. Látható továbbá, hogy a Kinetex oszlopon a csúcsok jóval kevésbé kenődtek szét, magasabbak, emiatt a jel/zaj viszony is nőtt, ami érzékenyebb detektálást tesz lehetővé. A további munkához a Kinetex C₁₈-as oszlopot választottam, mert ezen jóval kevesebb idő alatt eluálódott a D3- és D2-vitamin, így az analízis sebessége jelentősen nőtt.

Kísérletet tettem a hatékonyabb elválasztás elérésére. Megvizsgáltam, hogy hogyan változik az intenzitás és a két csúcse luálódása, ha 95% acetonitrilt és 5% vizet használók eluensként. A 4. és 5. ábrán a 100% ACN és a 95% acetonitrilt és 5% vizet tartalmazó eluenssel felvett kromatogramokat szemléltetem.



4. ábra: 1 ppm D3 és 5 ppm D2 oldat, 100% ACN eluens (kék: D3-vitamin, piros: D2-vitamin)



5. ábra: 1 ppm D3 és 5 ppm D2 oldat, 95% ACN és 5 % víz eluens (kék: D3-vitamin, piros: D2-vitamin)

Látható, hogy a két csúcshoz kb. 0,7 perccel hátrébb tolódott és eléggé kiszélesedett, a felbontás viszont nem javult jelentősen. A csúcshélesedés miatt a D3-vitamin csúcsmagassága lecsökkent 5500 cps-ről 4000 cps-re, a D2-vitaminé 5700 cps-ről lecsökkent 4400 cps-re. Mivel ez a jel/zaj viszony, azaz az érzékenység csökkenését jelenti, a továbbiakban a 100% acetonitrilt használtam eluensként. Az alapvonalig történő kromatográfiás elválasztás nem fontos a tandem tömegspektrometriás detektor használata esetén, hiszen az egymagában biztosítja a megfelelő szelektivitást. Mivel a mérendő anyag is és a belső standard is kis koncentrációban van jelen az előkészített mintában, így koelúciójuk során feltehetően nem zavarják egymás ionizációját.

4.6. Minta-előkészítési módszer fejlesztése

A minta-előkészítési módszer fejlesztésénél a szakirodalomban [11] zsírszövetből történő D-vitamin meghatározásra leírt módszerből indultam ki (lásd 6. táblázat). A módszeren több módosítást, egyszerűsítést hajtottam végre, mert feleslegesen túl bonyolultnak bizonyult.

A következőkben az általam kidolgozott minta-előkészítési módszert és annak optimalizációs lépéseit írom le. A szalonnákat hűtőben, alufóliába csomagolva, fénytől védve tartottam. A mintát a szalonnából vágtam le, majd apró darabokra vágtam fel. Analitikai mérlegen bemértem 0,2 g zsírszövetet. Hozzáadtam 1,3 ml etanolt és 1,3 ml vizet. A KOH-t pasztillaként adagoltam. Változtatva a KOH mennyiségét megvizsgáltam az elszappanosodás határfokát. 0,3, 0,5, 0,9 és 2 gramm KOH pasztillát adagoltam a mintákhoz. 0,9 g KOH hozzáadásakor fél nap rázatás után is még sötét sárga volt az oldat és apró fehér zsírszemcsék maradtak benne. 2 g KOH hatására sötét sárga sűrű oldatot kaptam. Feltehetőleg kevés volt 1,3 ml víz, ahhoz hogy teljesen feloldódjanak a KOH pasztillák. 0,3g KOH mennyiségnél kevés volt a KOH mennyisége, egy egész éjszakai rázatás után is zsíros volt az oldat. 0,5 gramm KOH majdnem megfelelőnek tűnt, de három párhuzamosból egy egész éjszakai rázatás után is csak maximum 2 minta szappanosodott el teljesen. Az elszappanosodás során a sűrű fehér oldatból tiszta, kicsit sárgás oldatot kaptam. Ezt a 6. ábrán szemléltetem. A képeket a mérések során készítettem.



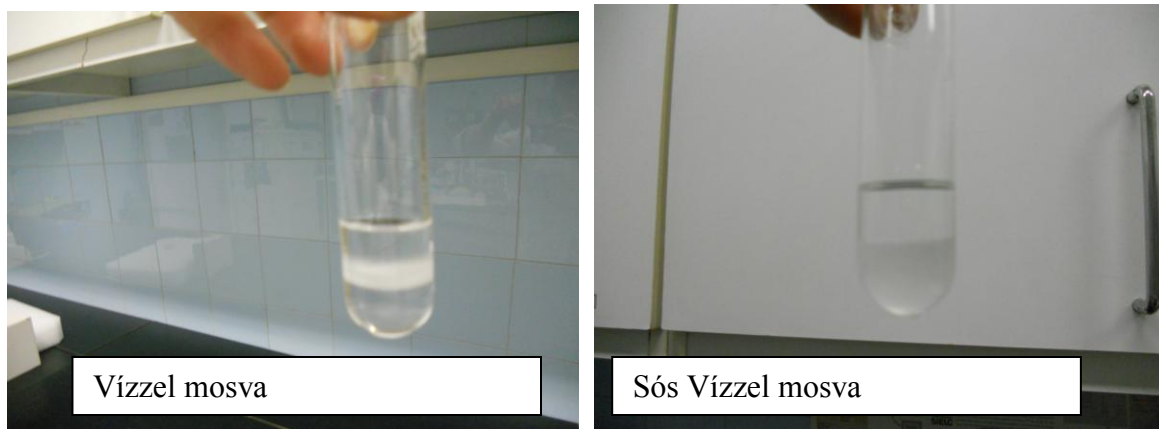
6. ábra: Homogenizálás és elszappanosítás után a zsírszövet

Mivel a három párhuzamos mintából csak kettő minta szappanosodott el egy éjszaka alatt, további megoldásokat kerestem, hogy az elszappanosodás hatásfokát növeljem. Az irodalomban néhányan leírták, hogy a szappanosítást emelt hőmérsékleten végezték. Ezért kipróbáltam viszonylag alacsony hőmérsékleten, 50°C-os vízfürdőben a szappanosítást. 0,5 gramm KOH mennyiség esetén 60 perc alatt a homogenizált szalonna oldatok nagyobb arányban szappanosodtak el, mint szobahőmérsékleten rázatással egy éjszaka alatt. 0,7 gramm KOH mennyiségnél viszont mindegyik minta kitisztult, így ezt az eljárást választottam.

Miután kihűltek a minták, a D-vitaminokat kiextraháltam. Az extrakció során 2 ml vizet és 3 ml hexánt adtam hozzájuk, majd összekeverés után még 3 ml abszolút etanolt. A plusz etanol hozzáadására azért volt szükség, hogy az etanol:víz arány 1:1 maradjon és így ne alakuljon ki emulzió. A mintákat 5 percig vortexeltem, majd 3000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltattam. A felső hexános fázist átpipettáztam egy tiszta kémcsőbe és 45°C-on nitrogén alatt szárazra pároltam. A bepárlási maradékot 0,3 ml acetonitrilben oldottam vissza. Ekkor fehér, zavaros oldatot kaptam, vagyis a minta nem lett megfelelően tiszta.

Ennek elkerülésére a hexános extrahálás után egy mosási fázist próbáltam beiktatni a bepárlás előtt. 2 ml vízzel mostam a hexános részt. Ekkor a centrifugálás után három fázist kaptam. Az alsó fázis volt a víz, a középső egy lúgos fehér pelyhes oldat, (valószínűleg szappanos víz) a felső pedig a hexános fázis. Az elején belerakott 3 ml hexán extraháló

szernek csak a harmadát tudtam a legvégén lepipettázni és bepárolni. A középső fázis megszüntetésére a vizes mosás helyett sós vizes mosást alkalmaztam. A sós vizes mosáshoz 4g NaCl-ot oldottam fel 50 ml vízben. Eredményül három fázis helyett két fázist kaptam. Ennek a folyamatnak a szemléltetése a 7. ábrán követhető végig.



7. ábra: Vízzel vagy sós vízzel mosva

Legvégül méretnöveltem a módszert. 0,2 g minta helyett 1 grammot mértem be. A kidolgozott minta-előkészítési módszer a következő:

- +1g minta
- +6,5ml víz
- +6,5ml etanol
- +3,5 g KOH
- +30 μ l 50 ppm-es D2-vitamin oldatból
- +50 perc 50 °C –os vízfürdő
- +2 ml víz
- +5ml hexán
- +2ml etanol
- +10 perc centrifuga 5000 rpm
- +4 ml sós víz a felső hexán fázishoz
- +10 perc centrifuga 5000 rpm
- +bepárlás 45 °C-on (felső hexán fázist)
- +0,3 ml ACN

4.7. Validálási paraméterek

A validálási protokolt a Bálint Analitika Kft.-ben a vitaminok meghatározására használt validálási guideline alapján dolgoztuk ki, helyenként módosítva és kiegészítve. A következő validálási paramétereket határoztuk meg.

4.7.1. Szelektivitás:

A szelektivitás meghatározása során háromszor injektáltam az oldószert, az előkészített vak mintát és egy standard oldatot. A vak minta készítésénél szalonna helyett desztillált vizet készítettem elő az általam kidolgozott minta-előkészítési módszerrel. A módszer szelektivitásának feltétele, hogy a meghatározandó anyag retenciós idejénél ne elulálódjon zavaró csúcs, illetve a zavaró csúcs nagysága maximum a meghatározási határhoz tartozó jelszint ötöde lehet. A módszer belső standardra vonatkozó szelektivitását szalonna mátrix-szal is vizsgáltam.

4.7.2. Kimutatási és meghatározási határ

A kimutatási és meghatározási határ meghatározásához addig hígítottam a standard oldatokat, míg el nem értem a 10-es és a 3-as jel/zaj viszonyhoz tartozó koncentráció szinteket. Ekkor a 10-es vagy 10 feletti jel/zaj viszonyból lesz a QL szint (meghatározási határ) (QL- quantitation limit). 3-as jel/zaj szintnél vagy annál feljebb lesz a kimutatási határ (DL- detection limit). Háromszor mértem meg mindkét szintet és a jel/zaj viszonyok átlagát vettem figyelembe. A meghatározási határtól kezdődik a mennyiségi meghatározás, a kimutatási határtól a minőségi meghatározás.

4.7.3. Linearitás

A linearitást standard oldatokból határoztam meg 11 pontos kalibrációs egyenes felvételével. A QL szint volt a legalacsonyabb kalibrációs pont. A kalibrációs standardok D3-vitamin koncentrációja rendre: 10 ppb, 30 ppb, 50 pp, 75 ppb, 100 ppb, 300 ppb, 500 ppb, 750 ppb, 1 ppm, 3 ppm és 5 ppm. A belső standard koncentrációja 5 ppm volt a kalibrációs oldatokban. Minden pontot 3-szor injektáltam. A linearitás feltétele, hogy a kalibrációs pontok precizitása 80-120% közé essen és a korrelációs koefficiens 98%-nál nagyobb legyen. A pontosságot a kalibrációs pontok kalibrációs egyenes alapján visszszámolt koncentrációinak a névleges koncentrációhoz viszonyított %-os értéke adja.

4.7.4. Rendszeralkalmasság

A rendszeralkalmasság segítségével információt szerezhünk a HPLC-MS/MS rendszer megbízhatóságáról. Az 50ppb-s és a 300ppb-s koncentrációjú standard oldatokat 3-szor beinjektáltam. A rendszeralkalmasság megfelelő, ha a csúcsterületek és a retenciók idők szórása $\pm 10\%$ -nál kisebb.

4.7.5. Módszerprecizitás

A módszerprecizitás vizsgálata során D2- és D3-vitaminnal spike-olt vízmintákat készítettem elő három-három párhuzamossal két koncentrációsinten (300 ppb és 3 ppm). Az előkészített szalonna mintákból szintén meghatároztam a módszer precizitását, ekkor a belső standard koncentrációját 5 ppm-nek választottam. Mindegyik mintát háromszor injektáltam. Akkor fogadjuk el precíznek a módszert, ha a szórások 5%-on belül esnek.

4.7.6. Visszanyerés

Vizes közegből két koncentráció értéknél (300 ppb és 3 ppm) vizsgáltam meg a visszanyeréseket. Először az előkészített spike-olt vízmintákra kapott csúcsterületeket hasonlítottam össze a standard oldat területével, majd kiszámítottam a visszanyerést. Az extrakció közben az átmérésekből származó veszteséggel korrigálva kiszámítottam az extrahálás hatásfokát. Végül kiszámítottam a relatív visszanyerést is ahol az előkészített mintában mért D3-vitamin/belső standard csúcsterület arányt hasonlítottam a standard oldatban mért arányhoz.

A D2-vitamin visszanyerését szalonna mintából is vizsgáltam. 5 ppm koncentrációsintre spike-olt, előkészített szalonnamintákra kapott detektorjelet hasonlítottam össze a standard oldatok jelével.

A visszanyerés elfogadható, ha a szórása nem haladja meg a 15%-ot.

4.7.7. Mátrixhatás vizsgálat

A minta koeluálódó mátrix komponensei leronthatják a célvegyületek ionizációját. Ennek vizsgálatára a HPLC-rendszerbe az előkészített üres mátrixot injektáltuk, és a kolonna után fecskendőpumpából egy T-elágazás beiktatásával a mérendő vegyület oldatát vezettük be az ionforrásba. Vizsgáltuk, hogy az analát retenció idejénél van-e intenzitás csökkenés, amit az esetleges együtt eluálódó zavaró komponensek ionizációs szupressziója okoz.

4.7.8. Szalonnaminták mérése

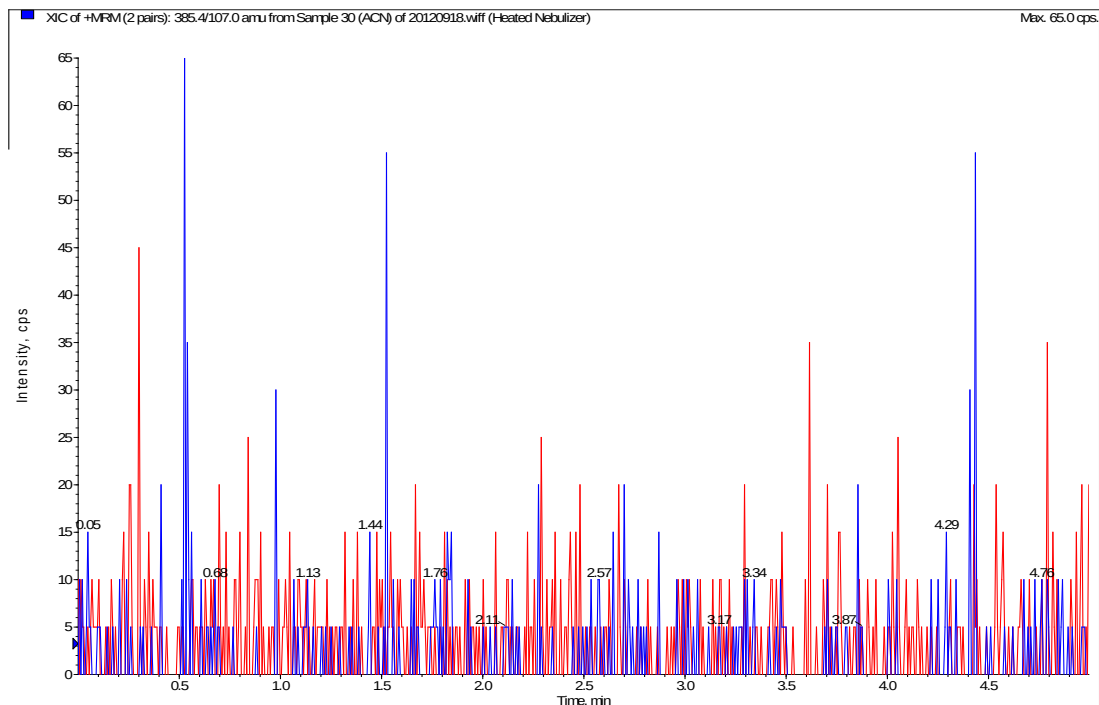
Megvizsgáltam a Mangalica & Társai Húspatika hentes boltjában vett szalonna és a napfényben nevelt sertés szalonna vitamin tartalmát. Három párhuzamos szalonnamintát készítettem elő a kidolgozott módszerrel mindkét mintából. Mindegyik mintát háromszor injektáltam be. Ezután a kalibráció alapján kiértékeltem a mintákat. Minden méréshez aznapi kalibrációt készítettem.

5. Eredmények és értékelésük

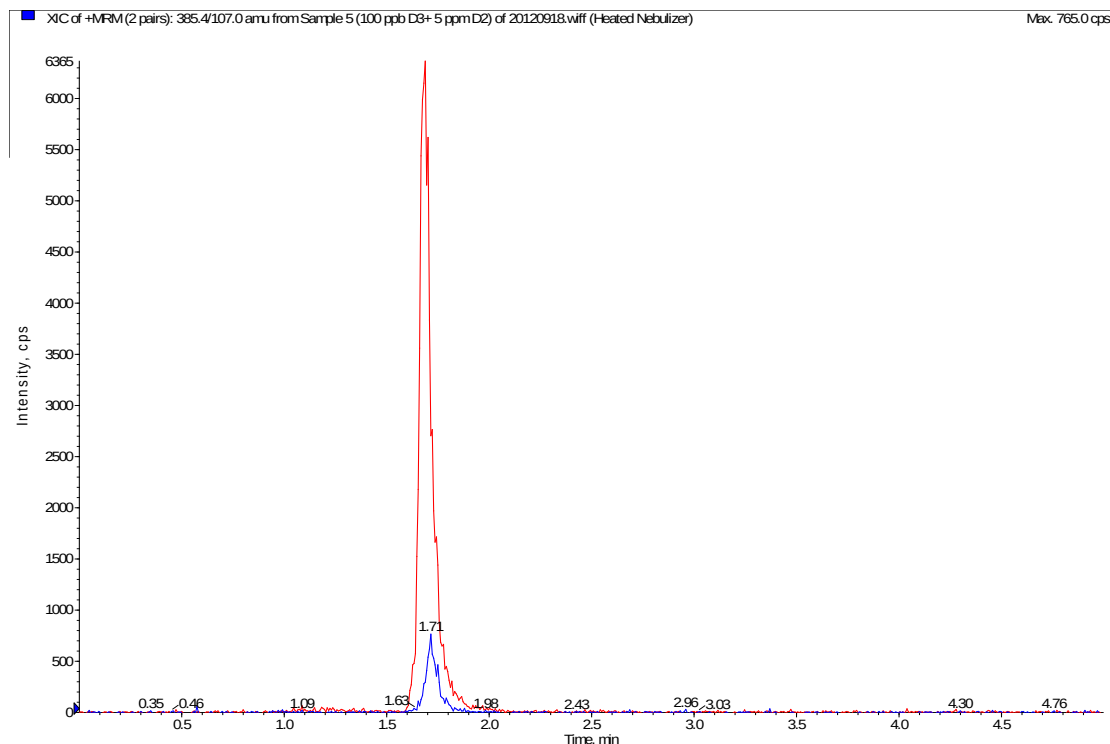
5.1. Szelektivitás

A módszer szelektivitásának vizsgálatához olyan vakmintákat használtam, amelyben nem találhatóak meg a vizsgált vitaminok. Egyrészt ultratiszta vízmintákat, másrészt D2-vitaminnal nem adalékolt szalonnamintákat készítettem elő a 4.7.1. pontban leírtak alapján. Az összehasonlítást egy 100 ppb-s standard oldat kromatogramjaival végeztem el.

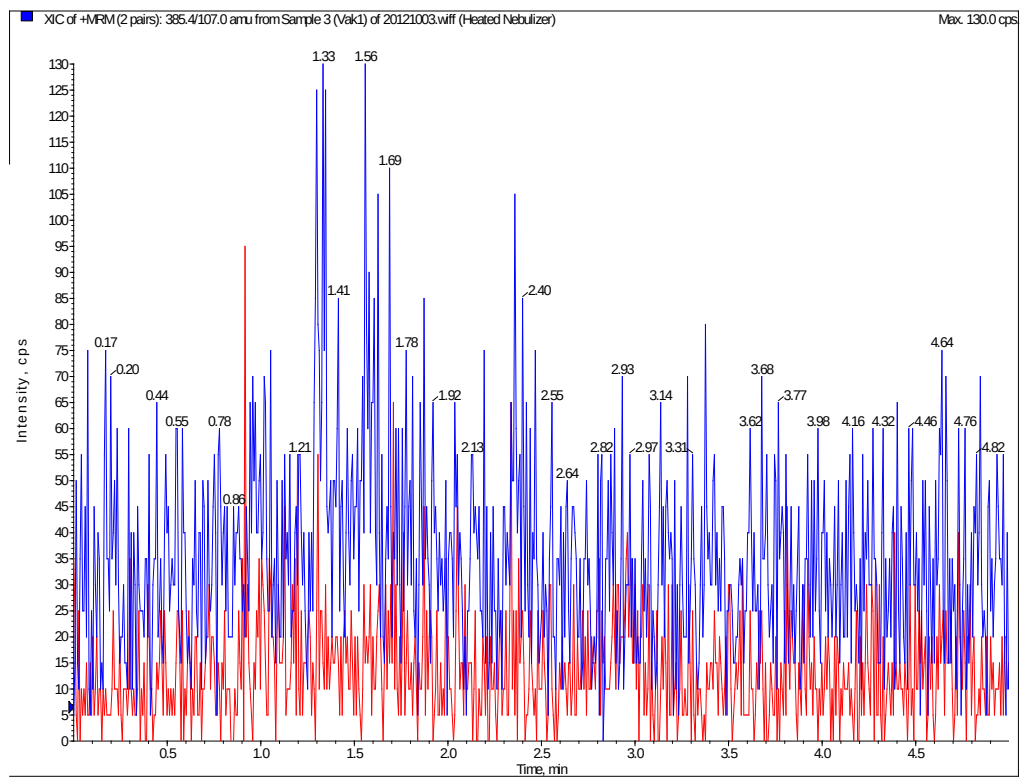
A 8-11. ábrán mutatom be a kapott kromatogramokat.



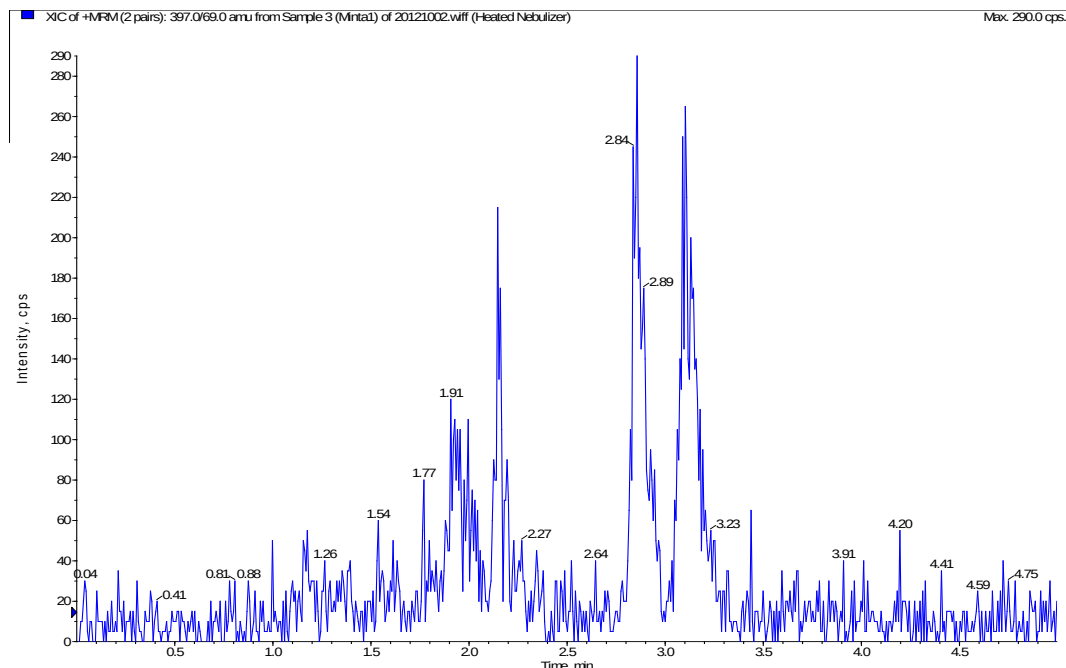
8. ábra: A tiszta acetonitril (eluens) kromatogramja



9. ábra: Standard oldat (100 ppb) kromatogramja



10. ábra: Vak vízminta kromatogramja

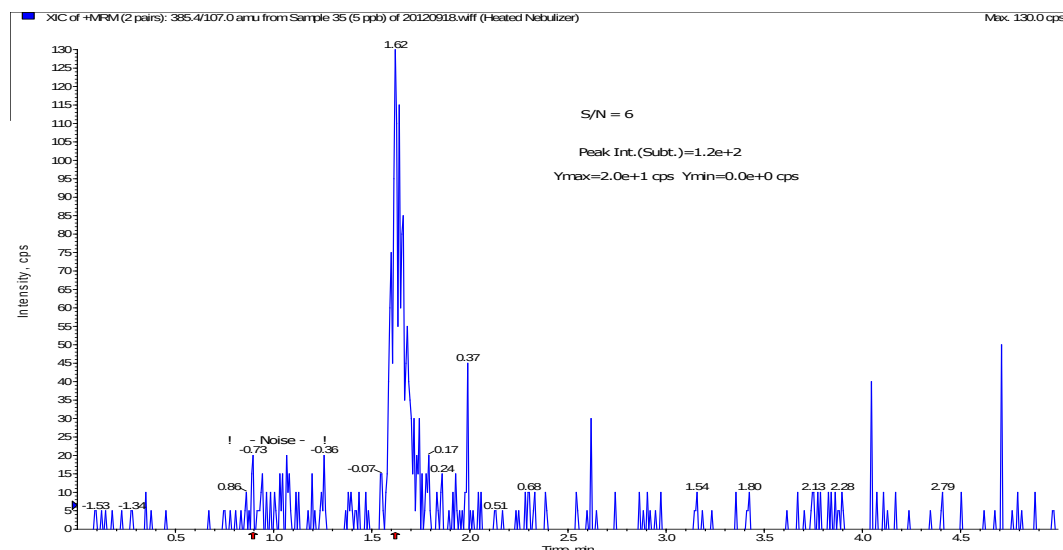


11. ábra: D2-vitaminnal nem adalékolt szalonna minta kromatogramja

Az analít és a belső standard retenciós idejénél egyik vizsgált mintában sem eluálódik zavaró komponens, tehát a módszer szelektív.

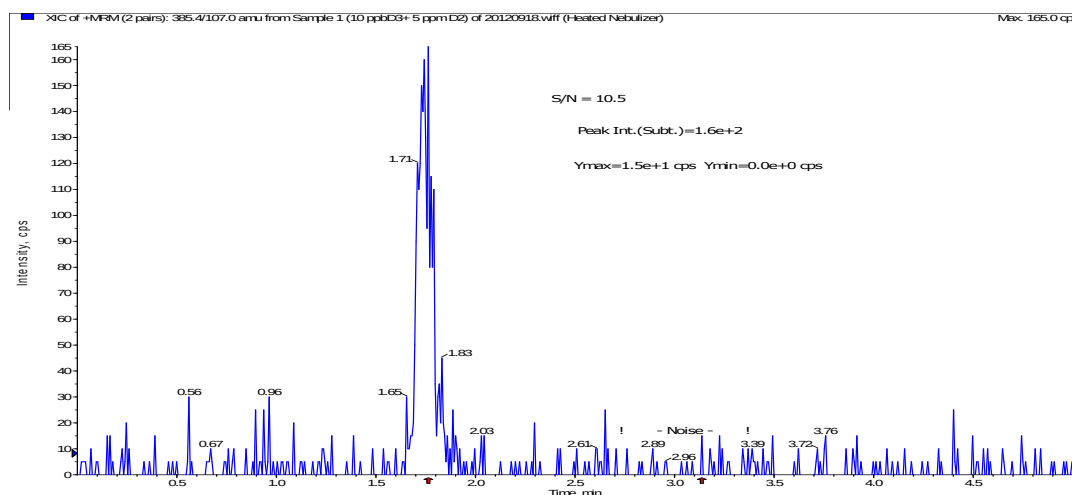
5.2. Kimutatási és meghatározási határ

A kimutatási és meghatározási határt standard oldatok háromszori injektálásával határoztam meg. A függelék 9.1. és 9.2. pontjában találhatók a kapott kromatogramok. A 12. ábrán látható egy példa a detektálási határhoz tartozó kromatogramok közül. A detektálási határ 5 ppb-nek bizonyult, mert itt az átlag jel/zaj= 6,2, azaz nagyobb, mint 3.



12. ábra: 5 ppb-s standard oldat-detektálási határ

A 13. ábrán látható a meghatározási határhoz tartozó kromatogram.



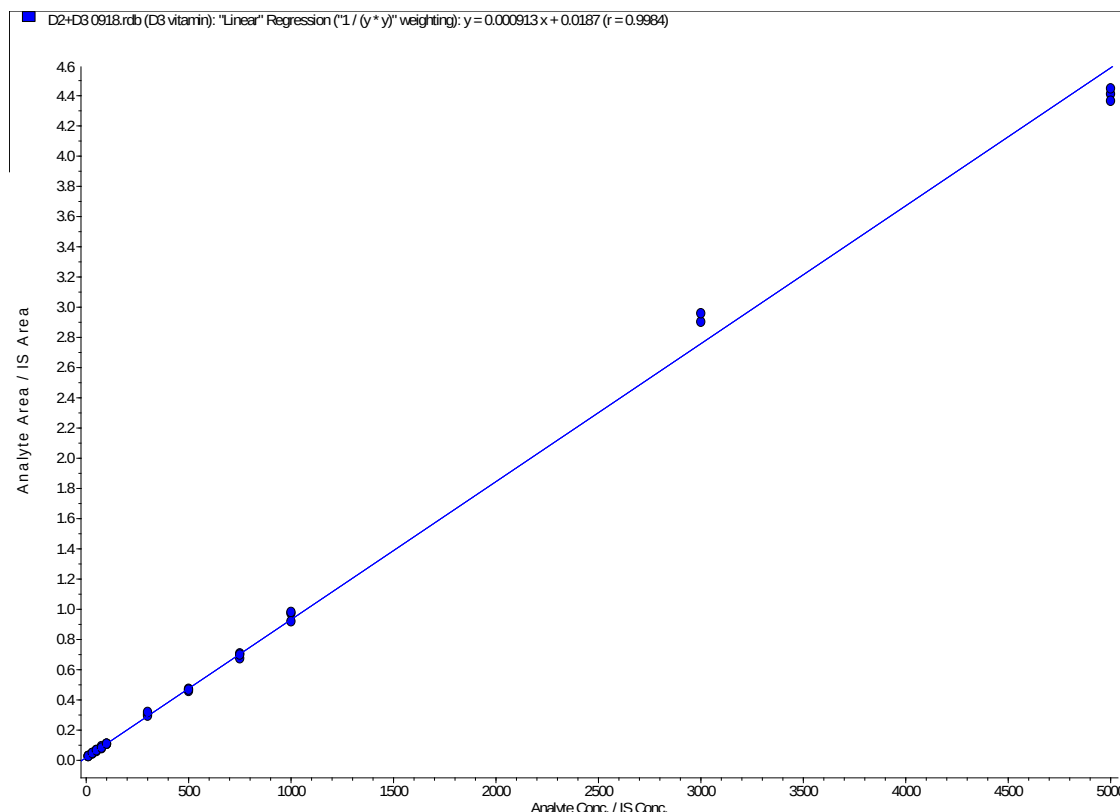
13. ábra: 10 ppb standard oldat - meghatározási határ

A meghatározási határnak a 10 ppb koncentráció szintet jelöltem meg, mert itt az átlag jel/zaj viszony 15,2, azaz nagyobb, mint 10.

5.3. Linearitás vizsgálat

A HPLC-MS/MS módszer linearitását 11 kalibrációs standard oldat háromszori injektálásával végeztem el a 4.7.3 fejezetben leírt módon. A D3-vitaminra kapott csúcsterületet elosztottam a belső standard csúcsterületével, majd a hányadost a minta és a

belső standard koncentráció arányának függvényében ábrázoltam. A pontokra az $1/y^2$ -tel súlyozott legkisebb négyzetek módszerével illesztettem egyenest. A kalibrációs egyenes jellemzésére az r^2 értéket (korrelációs koefficiens) használtam. Az egyenes korrelációs koefficiense $r^2 = 99,54\%$, ez megfelel a követelményeknek. A kalibráció méréséhez tartozó mérési eredmények a 9.3-as függelékben találhatóak. A kalibrációs egyenest a 14. ábra mutatja.



14. ábra: Kalibrációs egyenes az 10 ppb-5 ppm tartományban.

5.4. Rendszeralkalmasság

A rendszeralkalmasságot 50 ppb és 300 ppb koncentrációsztinteken vizsgáltam 3-3 párhuzamost injektálva a standard oldatokból. A 7. táblázatban látható, hogy a módszer megfelel a kitűzött követelményeknek. A relatív csúcsterületek szórása 300 ppb-nél 4.0%, 50 ppb-nél 6,2%. A retenciós idők szórása 300 ppb-nél 1,2% és 50 ppb-nél 2,1%.

Koncentráció	D3 csúcsterülete	belső standard csúcsterülete	Relatív csúcsterület	Átlag	RSD (%)	Retenciós idő (min)	Átlag	RSD (%)
300 ppb	7930	25900	0,306			1,74		
	7610	25800	0,295	0,307	4,0	1,72	1,7	1,2
	7980	25000	0,319			1,70		
50 ppb	1690	24600	0,069			1,65		
	1660	25200	0,066	0,065	6,2	1,70	1,7	2,1
	1670	27500	0,061			1,72		

7. táblázat: Rendszeralkalmasság

5.5. Módszerprecizitás

A D3-vitamin módszer precizitását két koncentrációsztinten spike-olt (300 ppb és 3 ppm), 3-3 párhuzamosban előkészített vízmintából határoztam meg. A vizsgálat eredményeit a 8.-9. táblázat foglalja össze.

Minta	Számolt koncentráció (ppb)	Átlag (ppb)	Szórás (%)
Minta1	301,0		
Minta2	300,3		
Minta3	300,7		
		300,7	0,1

8. táblázat: Módszerprecizitás 300 ppb-s koncentrációsztinten vízmintákban

Minta	Számolt koncentráció (ppb)	Átlag (ppb)	Szórás (%)
Minta1	2846,7		
Minta2	2806,7		
Minta3	2796,7		
		2816,7	0,9

9. táblázat: Módszerprecizitás 3000 ppb-s koncentrációsinten vízmintákban.

A minták visszaszámolt koncentrációjának szórása 3 ppm adalékolásnál 0,9 % volt, 300 ppb adalékolásnál pedig 0,1 %.

A szalonna mintákban is meghatároztam a módszer precizitását. A vizsgálat eredményét a 10. táblázat foglalja össze. Ekkor a szórás 2,6%-nak adódott.

Minta	Számolt koncentráció (ppb)	Átlag (ppb)	Szórás (%)
Minta1	3047,0		
Minta2	3110,0		
Minta3	3207,0		
		3121,3	2,6

10. táblázat: Módszerprecizitás az éles szalonna mintákban.

Mindhárom szórás érték 5%-on belül van, tehát kijelenthető, hogy a módszer precíz.

5.6. Visszanyerés

A visszanyerés vizsgálatokat két koncentrációsinten és vízhez illetve szalonna mátrixokhoz spike-olva vizsgáltam meg.

5.6.1. Vízből történő visszanyerés vizsgálatok

A visszanyerés vizsgálatokat a 4.7.6 fejezetben leírtak alapján végeztem. A visszanyerés kiszámításához az adalékolt mintákra kapott csúcsterületeket standard oldatokhoz viszonyítottam. Mivel az extrakció során a hexános felülúszó átmérésénél mindig volt veszteség, amit mérni tudtam, ezzel korrigáltam a visszanyerést, így az extrakciós hatásfokot kaptam. Végül a kapott értékek átlagát és szórását kiszámítottam. Az eredmények a 11.-14. táblázatokban és a 9.4. függelékben találhatóak.

Név	Átlag (counts)	Visszanyerés (%)	Átmérés hatásfoka (%)	Extrakciós hatásfok (%)
3 ppm standard	74400			
Minta1	35750	48,0	54	89,0
Minta2	37700	50,7	60	84,4
Minta3	40450	54,4	60	90,6
Átlag		51,0		88,0
Szórás (%)		6,2		3,6

11. táblázat: D3-vitamin visszanyerése vízből 3ppm koncentrációnál vizsgálva és az átmérési veszteséggel korrigálva.

Név	Átlag (counts)	Visszanyerés (%)	Átmérés hatásfoka (%)	Extrakciós hatásfok (%)
5 ppm standard	27600			
Minta1	13900	50,4	54	93,3
Minta2	13800	50,0	60	83,3
Minta3	15400	55,8	60	93,0
Átlag		52,0		89,9
Szórás (%)		6,2		6,3

12. táblázat: D2-vitamin visszanyerése vízből, 5ppm koncentrációnál vizsgálva és az átmérési veszteséggel korrigálva (D3 3 ppm-es szintjénél)

Név	Átlag (counts)	Visszanyerés (%)	Átmérés hatásfoka (%)	Extrakciós hatásfok (%)
300 ppb standard	8485			
Minta1	4747	56,0	54	103,6
Minta2	4390	51,7	54	95,8
Minta2	4377	51,6	54	95,5
Átlag		53,1		98,3
Szórás (%)		4,7		4,7

13. táblázat: D3-vitamin visszanyerése vízből, 300 ppb koncentrációnál vizsgálva és az átmérési veszteséggel korrigálva

Név	Átlag (counts)	Visszanyerés (%)	Átmérés hatásfoka (%)	Extrakciós hatásfok (%)
5 ppm standard	28467			
Minta1	16600	58,3	54	108,0
Minta2	15400	54,1	54	100,2
Minta3	15333	53,9	54	99,7
Átlag		55,4		102,6
Szórás (%)		4,5		4,5

14. táblázat: D2-vitamin visszanyerése vízből, 5 ppm koncentrációnál vizsgálva és az átmérési veszteséggel korrigálva (D3 300 ppb-s szintjénél)

3 ppm-re adalékolt koncentráció szintnél a D3-vitamin visszanyerése 51,0% (R.S.D.: 6,2%), az extrakciós hatásfok pedig 88,0 % volt. A D2-vitamin visszanyerése ugyanebből az oldatból vizsgálva 5 ppm-re adalékolva 52,0% % (R.S.D: 6,2%), az extrakciós hatásfok 89,9 % volt. 300 ppb-re adalékolt koncentráció szintnél a D3-vitamin visszanyerése 53,1% (R.S.D: 4,7%), az extrakciós hatásfok 98,3 %, a D2-vitamin visszanyerése 55,4% (R.S.D.: 4,5%) extrakciós hatásfoka pedig 102,6%.

A visszanyerések szórása jóval a megengedett 15% alatt maradt és a különböző koncentrációszinteken jó egyezést mutatott. A két D-vitamin forma visszanyerése is azonos, ezért a D2-vitamin jól használható belső standardként a D3-vitamin meghatározására.

Ezt igazolja a következő számítás is, ahol ugyanezen mintáknál a csúcsterület arányból számított koncentrációkat hasonlítjuk a minták névleges koncentrációjához (15.-16. táblázat).

Minta	Átlag (ppb)	Névleges koncentráció (ppb)	Visszanyerés %
Minta1	301,0	300	100,3
Minta2	300,3	300	100,1
Minta3	300,7	300	100,2
Átlag	300,7		100,2
Szórás	0,2		0,1

15. táblázat: Visszanyerés vizsgálat 300 ppb-re adalékolt vízminták esetén belső standarddal számolva.

Minta	Átlag (ppb)	Névleges koncentráció (ppb)	Visszanyerés %
Minta1	2846,7	3000	94,9
Minta2	2806,7	3000	93,6
Minta3	2796,7	3000	93,2
Átlag	2816,7		93,9
Szórás	0,9		0,9

16. táblázat: Visszanyerés vizsgálat 3000 ppb-re adalékolt vízminták esetén, vízből, belső standarddal számolva.

3 ppm-re adalékolt koncentráció szintnél a D3-vitamin visszanyerése 93,9% (R.S.D: 0,9%). 300 ppb-re adalékolt koncentráció szintnél a D3-vitamin visszanyerése 100,2% (R.S.D: 0,1%), A visszanyerés vizsgálatához felhasznált minták kromatogramjai a Függelék 9.6. pontjában találhatók.

5.6.2. D2-vitamin visszanyerés vizsgálata szalonnához adalékolva

Mivel a szalonna feltételezéseink szerint tartalmaz D3-vitamint, ezért annak adalékolás után történő visszanyerését nem vizsgáltuk. A vízből való visszanyerés nagyon hasonlóan adódott a D3-, illetve D2-vitaminra. A szalonna maga nem tartalmaz D2-vitamint, ezért a D2-vitamin visszanyerését vizsgáltuk 5 ppm koncentrációszintre adalékolt szalonnamintából. A kapott csúcsterületeket az 5 ppm standard oldatra kapott csúcsterületekkel hasonlítottam össze. Az eredményeket a 17. táblázatban tüntettem fel.

Név	Átlag (counts)	Visszanyerés (%)	Átmérés hatásfoka (%)	Extrakciós hatásfok (%)
5 ppm standard:	34300,0			
Minta1	3436,7	10,0	28	35,8
Minta2	3536,7	10,3	28	36,8
Minta3	2736,7	8,0	28	28,5
Átlag (%)		9,4		33,7
Szórás (R.S.D.%)		1,6		13,4

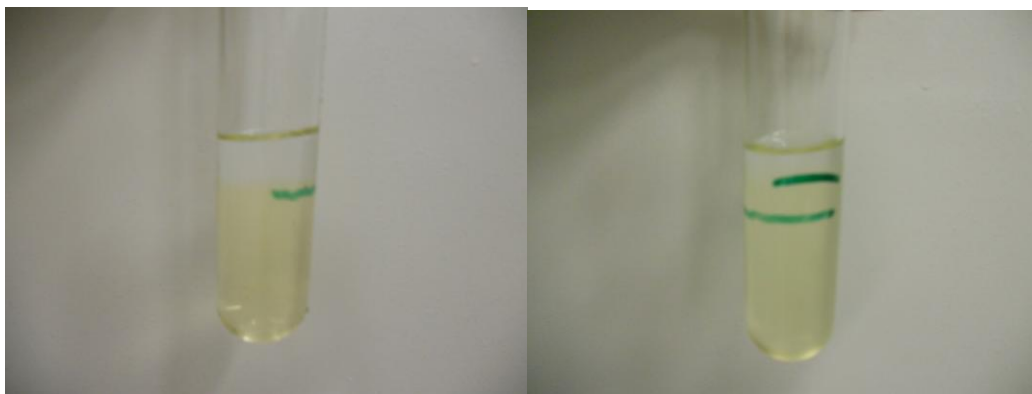
17. táblázat: A belső standard (D2-vitamin) visszanyerése szalonna mintákból

A visszanyerési hatásfok a vízmintákhoz képest nagyon alacsony, mindössze 9,4 % volt. Látható, azonban, hogy az extrakció során történt átmérés hatásfoka is nagyon alacsony, 28%, szemben a vízmintákkal, ahol ez kb. 60% volt. Ennek a csökkenésnek az

okát az 5.6.3. pontban fejtem ki. Az extrakciós hatásfok ily módon 33,7 %-nak mutatkozott. Bár a visszanyerés és az extrakciós hatásfok nagyon alacsony, a reprodukálhatóságuk jó, az RSD kisebb, mint 15%. A vízmintákból történő visszanyerés vizsgálatok azt mutatták, hogy a D3-vitamin és a belső standard visszanyerési hatásfoka jól egyezik. Feltételezhetjük, hogy ez igaz a szalonnamintákra is, ezért a módszer alkalmas a D3-vitamin meghatározására, amennyiben elég érzékeny a kis visszanyeréssel előkészített minta koncentrációjának mérése.

5.6.3. Átmérési hatásfok vizsgálata az extrakció során

Szalonnaminták előkészítése során 5000 μ l hozzáadott n-hexánnak mindössze 28 százalékát tudtam csak bepárolni az extrakció végén. A fő térfogatcsökkenés akkor történt, mikor az elszappanosodott szalonnamintákhoz hozzápipettáztam a hexánt, és összeráztam a mintákat. Feltehetőleg emulzió jött létre. Ennek végbemenetele a 15. ábrán követhető végig. A szappan micellák a hexán oldószer cseppek egy részét valószínűleg diszpergálták és az elszappanosodott beleoldották, így azt nem lehetett lecentrifugálni. Emiatt az extrakció végén az alsó vizes fázis térfogata megnőtt, a hexános fázis térfogata lecsökkent



15. ábra: Elszappanosodott oldathoz adott hexán mennyisége összerázás előtt (1. kép) és után (2. kép)

Szalonna helyett ultratiszta víz mátrix esetén az extrakciós hatásfokok 60 % körül ingadoztak, ami abból adódik, hogy nem lehet a teljes hexános fázist lepipettázni. A 10 perces centrifugálás során nem történt térfogatcsökkenés a hexános fázisban. A sós vízzel történő mosás során csak kevéssel változott a hexán oldószer mennyisége.

5.7. Stabilitás vizsgálat

A stabilitás vizsgálatok során tömény D3-vitamint tartalmazó oldatokat tárolhatóságát vizsgáltam mélyhűtőben -20°C alatt, szobahőmérsékleten fénytől védve és szobahőmérsékleten fénynek kitéve. Adott tárolási idő elteltével a mintákat lemértem és csúcsterületüket frissen készített oldatok csúcsterületéhez hasonlítottam. Az eredményeket a 18. táblázatban szemléltetem.

Minta neve	Integrált terület (counts)	Bomlatlan anyagmennyiség a standard oldathoz viszonyítva (%)
Friss standard oldat	3.33e+006	
Mélyhűtőben 5 órát tárolt standard oldat	3.33e+006	100
Szobahőmérsékleten, fényben 5 órát tárolt standard oldat	1.61e+006	48
Szobahőmérsékleten, sötétben 5 órát tárolt standard oldat	3.19e+006	96

18. táblázat: 0,3 mg/ml D3-vitamin standard oldatok stabilitás vizsgálata

Minta neve	Integrált terület (counts)	Bomlatlan anyagmennyiség a standard oldathoz viszonyítva (%)
Friss standard oldat:	27800	-
1 hónap mélyhűtőben való tárolás után:	28133,33	98,8

19. táblázat: 0,1 µg/ml D3-vitamin standard oldat stabilitás vizsgálata

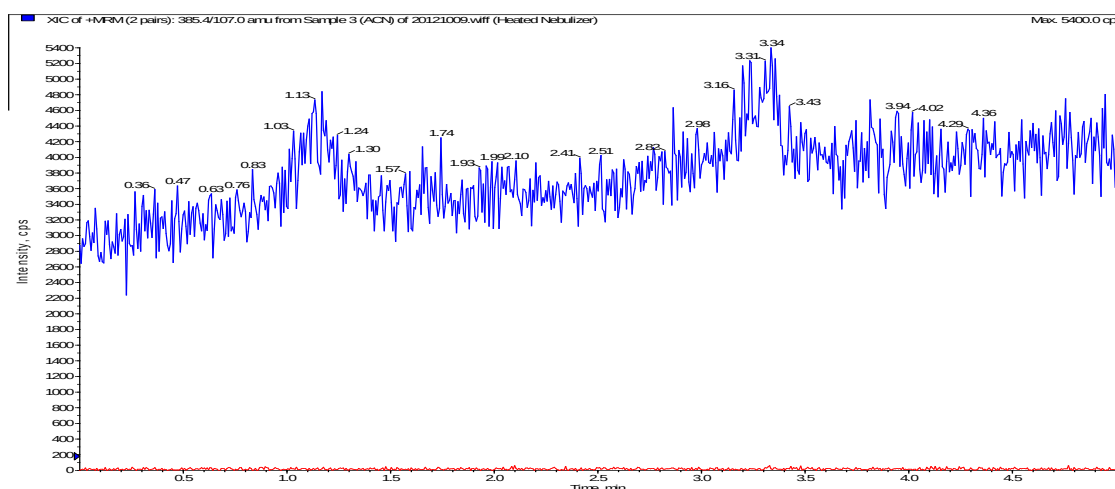
A mélyhűtőben tárolt minta és a szobahőmérsékleten, de sötétben tartott minta csúcsterülete gyakorlatilag nem változott a tárolás során. A mélyhűtőben 1 hónapot tárolt minta és a frissen készült standard oldat csúcsterülete sem változott szignifikánsan, tehát nem bomlott el 1 havi mélyhűtőben való tárolástól a D3-vitamin. A fényben és szobahőmérsékleten tárolt D3-vitamin oldat csúcsterülete azonban már 5 óra alatt 52%-al csökkent. Nagyon fontos tehát a minták fénytől védett kezelése és tárolása az analízis teljes időtartama alatt.

5.8. Mátrixhatás vizsgálat

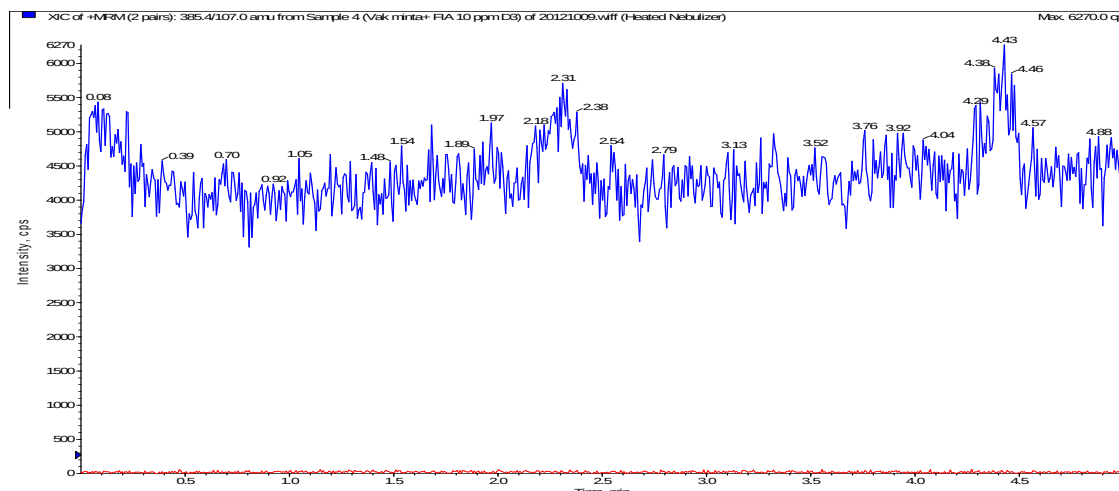
5.8.1. Mátrixhatás vizsgálata a D3-vitaminra

A szalonna minta mátrixhatását csak a D2-vitaminra tudtam megvizsgálni, mert a minta D3-vitamin tartalma zavart. A D3-vitamin mátrixhatását vak vízmintával vizsgáltam.

A D3-vitaminnál történő vizsgálat során először eluenst injektáltam a folyamatosan áramló 10 ppm-es D3-vitamin oldatba. A kapott kromatogram a 16. ábrán látható. Majd hasonlóképpen injektáltam az előkészített vak vízmintából (17. ábra).



16. ábra: 10 ppm D3-vitamin állandó áramlással+eluens injektálás

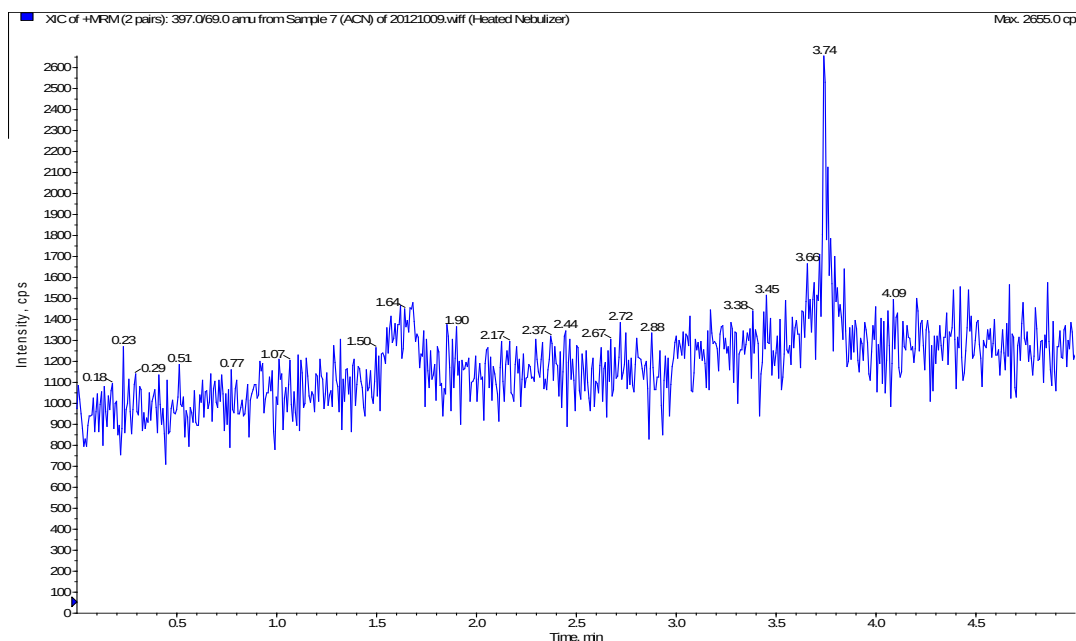


17. ábra: 10 ppm D3-vitamin állandó áramlással + beinjektált vak minta

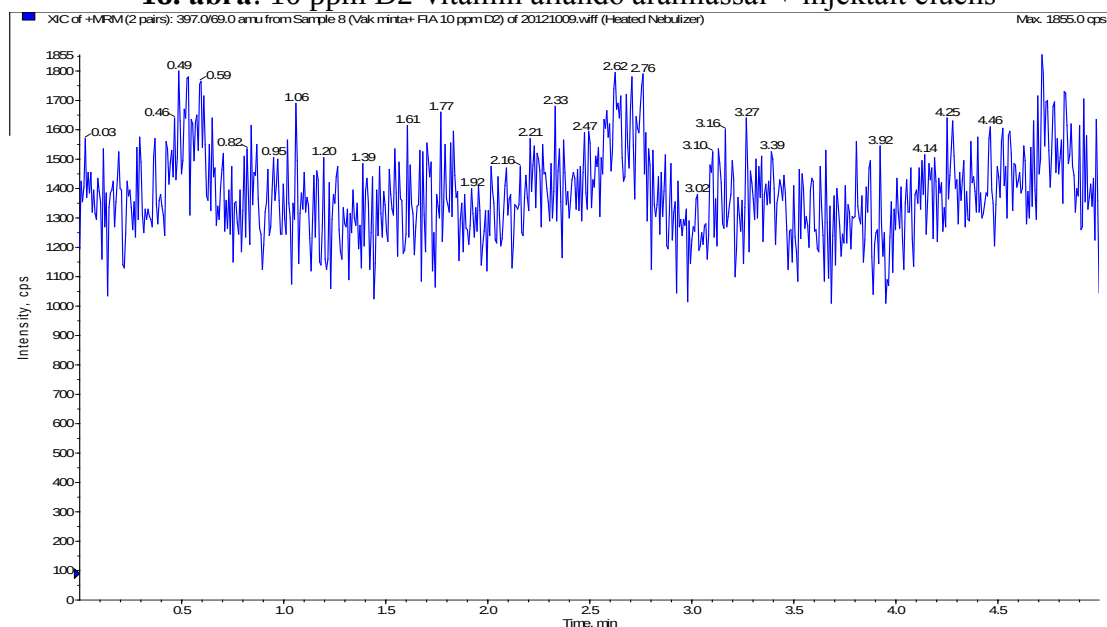
A D3-vitamin retenciós idejénél (kb. 1,6 perc) nem látható intenzitás csökkenés a beinjektált mátrix hatására, azaz nincs ionizációs szupresszió.

5.8.2. : Mátrixhatás vizsgálat D2-vitaminra

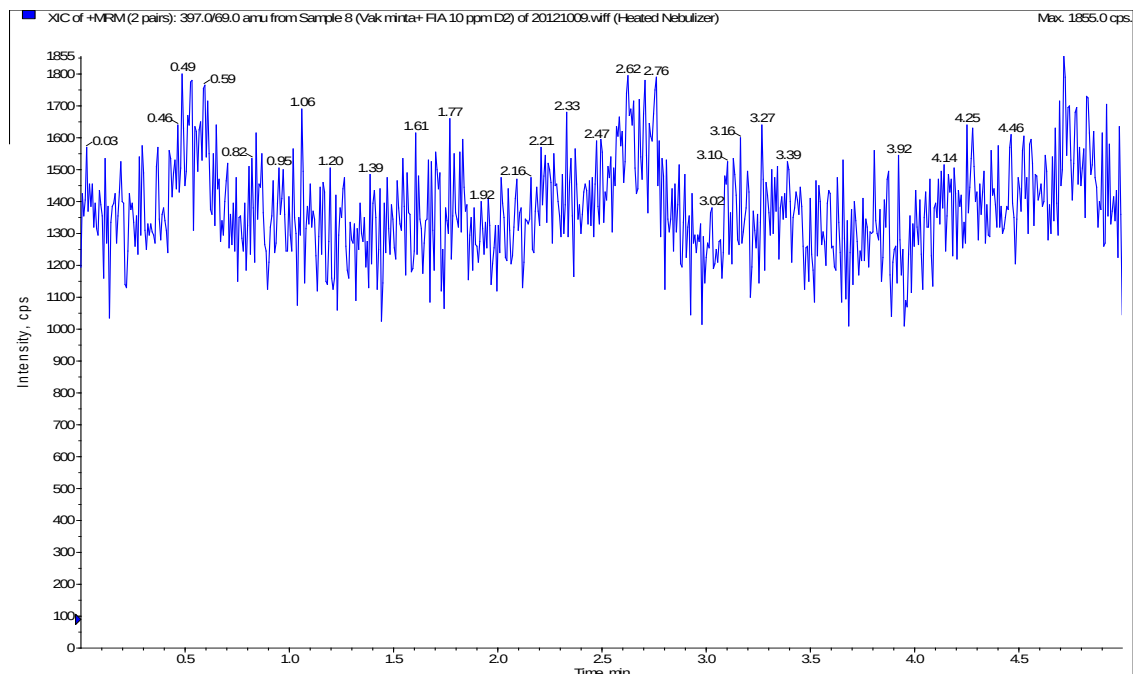
A D2-vitamin mátrixhatás vizsgálata során először eluenst injektáltam a folyamatosan áramló 10 ppm-es D2-vitamin oldatba. A kapott kromatogram a 18. ábrán látható. Majd hasonlóképpen injektáltam az előkészített vak vízmintát (19. ábra) és az előkészített vak szalonna mintát (20. ábra).



18. ábra: 10 ppm D2-vitamin állandó áramlással + injektált eluens



19. ábra: 10 ppm D2-vitamin állandó áramlással + beinjektált vak víz minta



20. ábra: 10 ppm D2-vitamin állandó áramlással + beinjektált szalonna minta

Nem történt intenzitás csökkenés egyik mátrix beinjektálásának hatására sem, tehát a D2-vitaminra sem tapasztaltunk ionizációs zavarást még szalonna mátrix esetében sem. Ez azt bizonyítja, hogy a minta-előkészítés megfelelő tisztítást biztosít.

5.9. Szalonna minták mérése

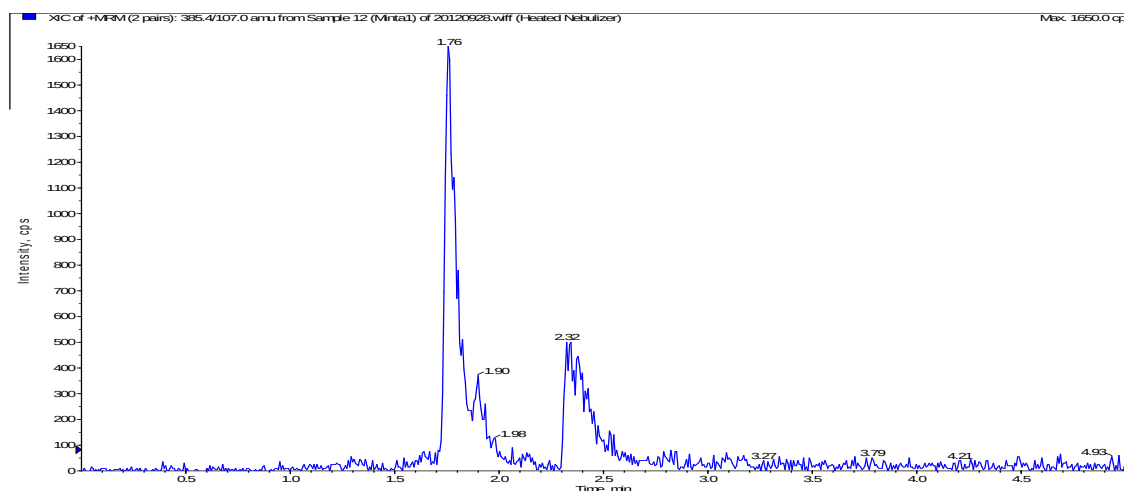
A Mangalica & Társai Húspatika hentes boltjából származó szalonnából három párhuzamos mintát készítettem elő és mértem le az általam kidolgozott és validált módszerrel. Minden mintát háromszor injektáltam. A mérések eredményei a 20. táblázatban és a 9.5. függelékben találhatóak.

Minta	Számított koncentráció (ppb)	Átlag (ppb)	A mintaelőkészítés végén kapott 0,3 ml mintában a D3-vitamin mennyisége (ng)	Bemért szalonna mennyisége (g)	1g szalonna mintában a D3-vitamin mennyisége (ng)
Minta1	2900,00				
Minta1	3130,00				
Minta1	3110,00	3046,67	914,00	1,0968	833,33
Minta2	3300,00				
Minta2	2780,00				
Minta2	3250,00	3110,00	933,00	1,1076	842,36
Minta3	3250,00				
Minta3	3400,00				
Minta3	2970,00	3206,67	962,00	1,1696	822,50
Átlag (ng)					832,73

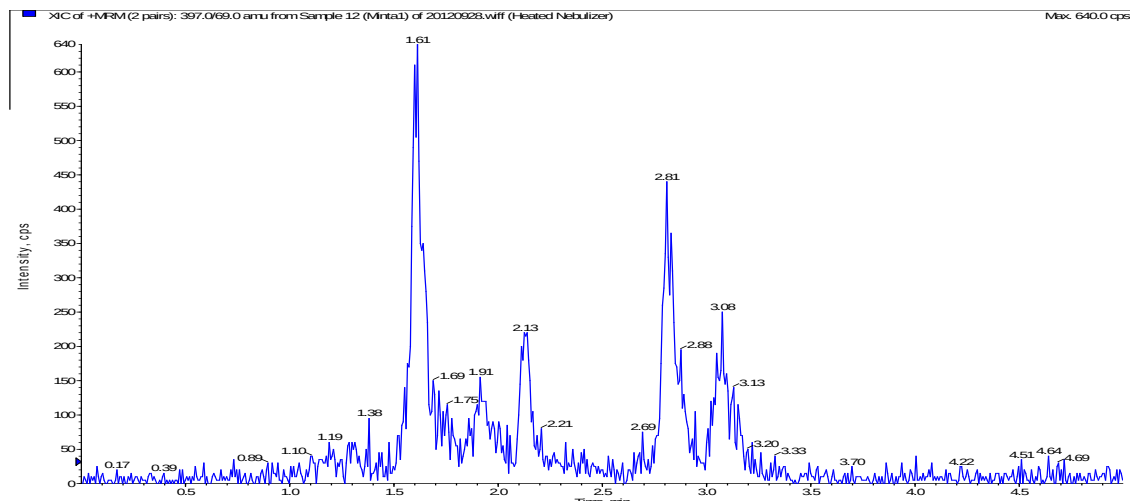
20. táblázat: Szalonna minták mérési eredményei

Az általam vizsgált szalonna 1 grammja átlagosan 833 ng D3-vitamint tartalmaz. Ez jóval több, mint a főzött kardhalra megadott koncentráció (3. táblázat), amely átszámítva 474 ng/g-nak felel meg.

A 21. és a 22. ábrán egy szalonnaminta jellemző kromatogramja látható.



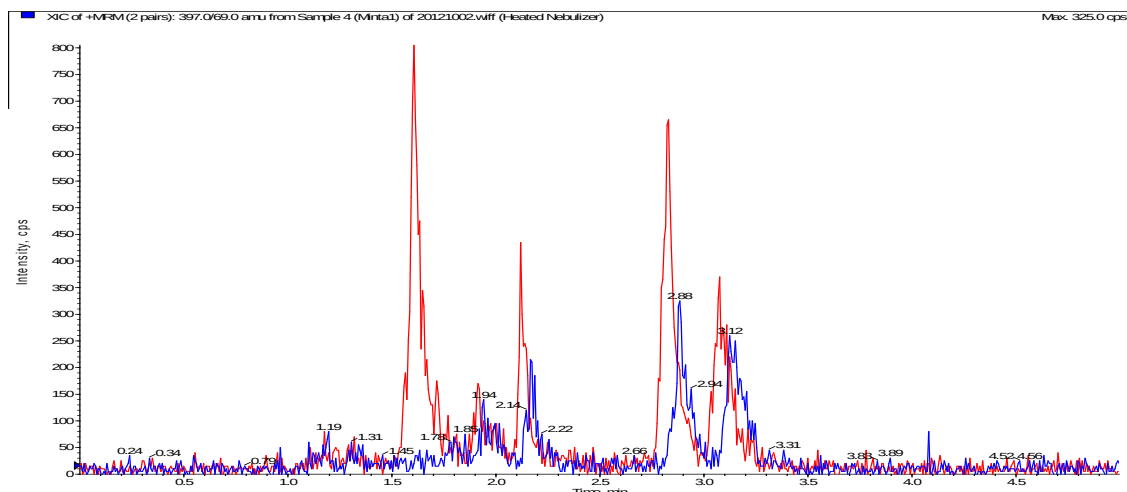
21. ábra: D3-vitamin jellemző kromatogramja szalonnából



22. ábra: D2-vitamin jellemző kromatogramja szalonnából

Látható, hogy a belső standarddal adalékolt szalonnaminták mérése során a D2-vitamin kromatogramján több, kisebb csúcs jelent meg a D2-vitaminon ($t_r=1,76$ perc) kívül. Ezek eredetének azonosítására a szalonna minták mellett olyan vak mintákat is készítettem, amelyekhez nem használtam belső standardet.

A mérés után összevettem az adalékolt és a belső standard nélkül készült szalonna minták kromatogramjait. A 23. ábrán a piros nyomvonal a belső standarddal adalékolt szalonna minta D2 kromatogramja, a kék pedig a belső standard nélkülié. A piros kromatogramon megjelenő első csúcs a D2-vitamin csúcsa. Látható, hogy a belső standard elhagyásával készült oldatokban ennél a retenciós időnél nem jelenik meg zavaró csúcs. Ez is igazolja a módszer szelektivitását. A később eluálódó csúcsok viszont mindkét mintában megtalálhatóak, tehát ezek a szalonnából származó eddig azonosítatlan anyagok, amelyek ugyanolyan molekulatömegűek és ugyanúgy fragmentálódnak, mint a D2-vitamin.

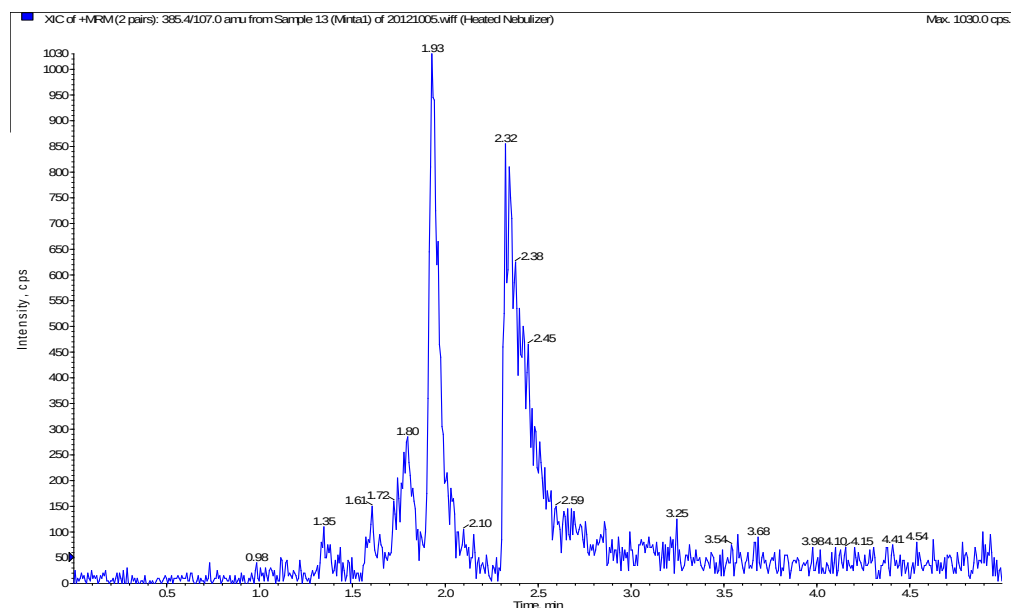


23. ábra: Piros szín: adalékolt szalonna mintában a D2-vitamin kromatogramja

Kék szín: belső standard nélkül előkészített szalonna minta D2-vitamin kromatogramja

Szabadon tartott disznókból származó szalonnamintákat is előkészítettem és megmértem.

Az ehhez tartozó kromatogramot a 24. ábrán szemléltetem:



24. ábra: Napfényes területen nevelt disznó szalonnájából készült minta D3-vitamin kromatogramja.

Látható, hogy a mintában a D3-vitamin retenció idejénél csak egy nagyon kis csúcs jelenik meg, viszont később több nagyobb csúcs is eluálódik. Úgy gondoljuk, hogy mivel a mintát már több, mint két éve a hűtőszekrényben tároljuk, különböző bomlási folyamatok indultak meg benne és a D3-vitamin átalakult. Erre a szakirodalomban is találtunk utalást [6].

6. Összefoglalás

Munkám során gyors és érzékeny nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás – tandem tömegspektrometriás módszert sikerült fejlesztenem és optimalnom a D-vitamin mennyiségének meghatározására szalonna mintákból.

A meghatározáshoz használt HPLC-MS/MS rendszert MRM módban, pozitív APCI ionizációval üzemeltettem, egy-egy átmenetet vizsgálva a D3-vitaminnál és a belső standardként használt D2-vitaminnál is.

A módszerhez kidolgozott elszappanosítási lépés hatékony lehetőséget ad a zsírszövet feloldására. A folyadék-folyadék extrakciós lépés során keletkezett emulzió csökkenti a visszanyerés hatékonyságát, de mivel a visszanyerés jól reprodukálható, ezért így is megfelel a követelményeknek.

A validálás során meghatároztam a kifejlesztett módszer analitikai teljesítményjelzőit. Széles linearitási tartomány jellemzi, a rendszeralkalmasság és a módszer precizitása megfelelő. Kimutatási határa alacsony, mely alkalmassá teszi a kis koncentrációban jelen levő D-vitamin meghatározására. A módszer eleget tesz az általunk meghatározott validálási követelményeknek.

A kidolgozott módszerrel sikerült szalonnaminták D3-vitamin tartalmát meghatároznom, amely meglepően magasnak bizonyult.

A módszer továbbfejlesztését az extrakció során keletkező emulzió megszüntetésének irányába tervezem, amivel a visszanyerést szeretném megnövelni. Tervezem a D-vitamin más élelmiszerekből (pl. lazacolajból) történő meghatározását is, valamint további megerősítő méréseket különböző forrásból származó szalonnamintákra.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni folyamatos, türelmes segítségét és hasznos tanácsait a témavezetőmnek, Dr. Horváth Violának, amellyel az elmúlt másfél évben koordinálta munkámat.

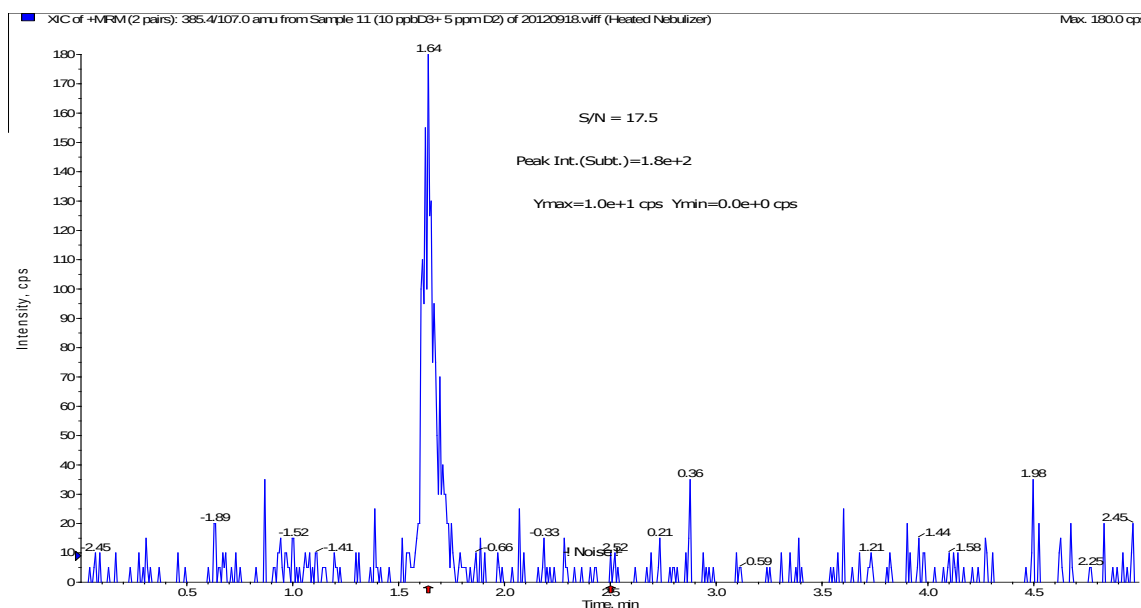
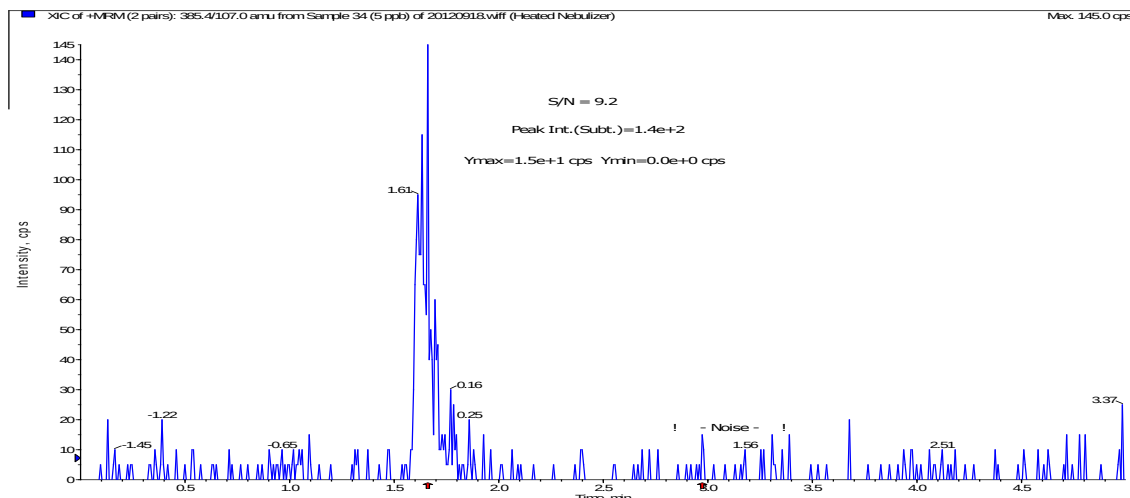
8. Irodalomjegyzék

- [1] G. Wolf: The Discovery of Vitamin D: The Contribution of Adolf Windaus, *The Journal of nutrition*, 2004, 134, 1299-1302
- [2] Office of Dietary Supplements National Institutes of Health
<http://ods.od.nih.gov/factsheets/Vitamind-HealthProfessional/>
- [3] http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_D
- [4] K. Rajakumar, Vitamin D, Cod-Liver Oil, Sunlight, and Rickets: *A Historical Perspective*, *Pediatrics*, 112 (2) 1, 2003, 132-135
- [5] M.F. Holick, Vitamin D Deficiency, *N. Engl. J. Med.* 2007, 357:266-81
- [6] J. C. Knutson, C. R. Valliere, C.W. Bishop: United States Patent, Oral 1 α -hydroxyprevitamin D in composition and method for treating psoriasis, Patent Number: 6,147,064, 1996,
- [7] T. Sándor: Az élet aminjai a vitaminok, *Medicina Könyvkiadó Rt.* Budapest, 2006, 112-121
- [8] Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D., Washington DC: National Academy Press, 2010.
- [9] U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2011. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- [10] U. Höllet, A. P. Quintana, R. Gössl, K. Olszewski, G. Riss, A. Schattner, C. S. Nunes: Rapid determination of 25-hydroxy vitamin D3 in swine tissue using an isotope dilution HPLC-MS assay, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010), 963-968
- [11] M. Blum, G. Dolnikowski, E. Seyoum, S. S. Harris, S. L. Booth, J. Peterson, E. Saltzman, B. Dawson-Hughes: Vitamin D3 in fat tissue, *Humana Press Inc.* 2008, 90-94
- [12] V. Kienen, W. F. Costa, J. V. Visentainer, N. E. Souza, C. C. Oliveira: Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement, *Talanta* 75, 2008, 141-146
- [13] P. S. Väänänen, V. Ollilainen, P. Mattila, K. Lehtikainen, E. Salmela-Molsä, V. Piironen: Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction, *Food Chemistry*, 2000, 535-543 51

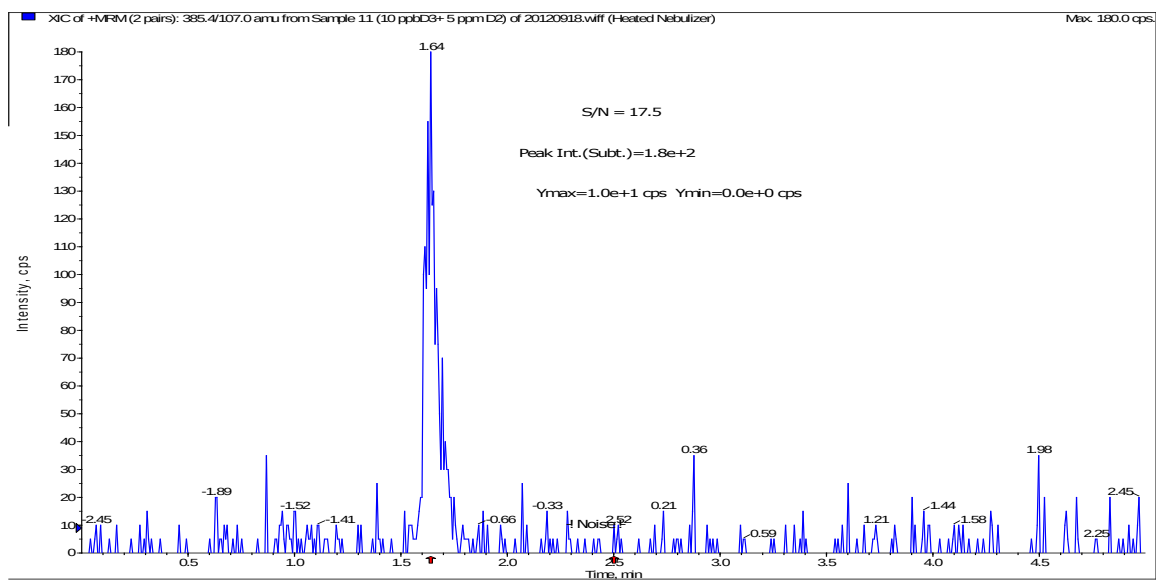
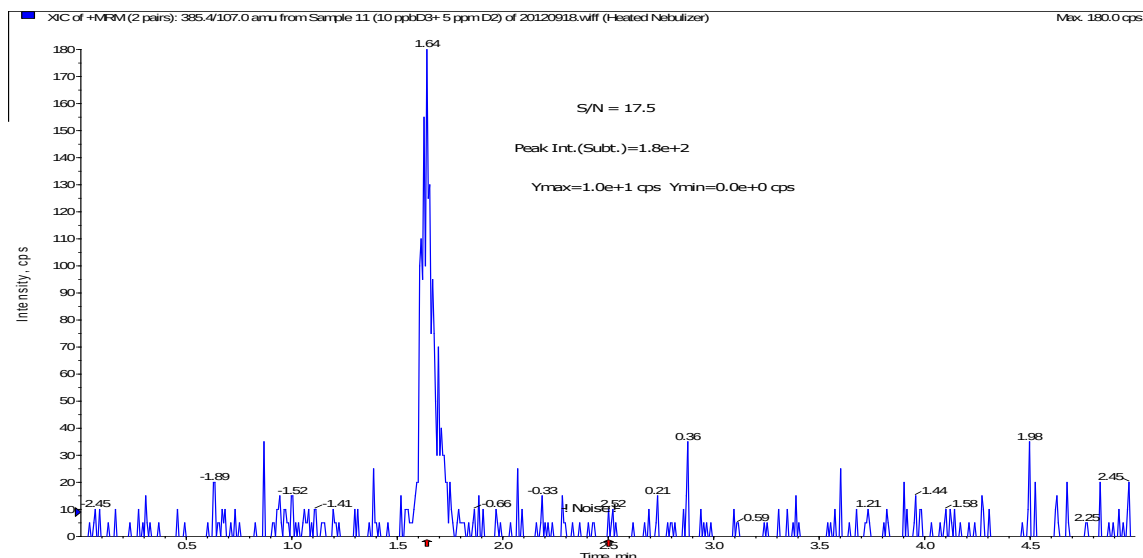
- [14] P. Mattila, V. I. Piironen, E. J. Uusi-Rauva & P. E. Koivistoinen: New analytical aspects of vitamin D in foods, *Food Chemistry*, 1996, 95-99
- [15] V. C. Trenerry, T. Plozza, D. Caridi, S. Murphy: The determination of vitamin D3 in bovine milk by liquid chromatography mass spectrometry *Food Chemistry* 2011; 1314-1319
- [16] P. Matilla, V. Piironen, C. Backman, A. Asunmaa, E. Uusi-Rauva, P. Koivistoinen: Determination of Vitamin D3 in egg yolk by HPLC with diode array detection, *Journal of food composition and analysis* 5, 1992, 281-290,
- [17] Magyar Szabvány MSZ EN 12821:2009: Élelmiszerek. A D-vitamin meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel. A kolekalciferol (D3) és az ergokalciferol (D2) mérése, 2009; 1-24.
- [18] O. Heudi, M.-J. Trisconi, C.-J. Blake: Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1022 (2004), 115-123
- [19] M. Jarvis, E. McClure, D. Leigh, D. Blake, P. Koerner: Measurement of 25-OH Vitamin D3 and 3-Epi-25-OH-Vitamin D3 by LC/MS/MS *AB SCIEX*, 2012
- [20] C. Prakash, C. L. Shaffer, A. Nedderman: Analytical strategies for identifying drug metabolites, *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26, 340– 369 by Wiley Periodicals, Inc.
- [21] http://www.usedlabequipment.com/images/product_images/main/019295.JPG

9. Függelék

9.1. Detektálási határon felvett kromatogramok (D3:5ppb)



9.2.: Kimutatási határon felvett kromatogramok (D3: 10 ppb)



9.3. Kalibrációs sorozat

Minta neve	D3 Integrált terület (counts)	D3 csúcsmagasság (cps)	D3 koncentráció (ng/ml)	D3 retenció idő (perc)	IS integrált terület (counts)	IS csúcsmagasság (cps)	IS Retenció idő (min)	Számolt koncentráció (ng/mL)	Szórás (%)
10 ppbD3+ 5 ppm D2	8.24e+002	1.62e+002	10.0	1.76	2.96e+004	6.62e+003	1.72	10,10	101,00
30 ppb D3+ 5 ppm D2	1.20e+003	2.14e+002	30.0	1.74	2.72e+004	6.21e+003	1.70	27,90	93,00
50 ppb D3+ 5 ppm D2	1.67e+003	3.74e+002	50.0	1.72	2.75e+004	6.25e+003	1.69	46,00	92,10
75 ppb D3+ 5 ppm D2	2.12e+003	4.58e+002	75.0	1.67	2.66e+004	6.07e+003	1.65	66,70	88,90
100 ppb D3+ 5 ppm D2	2.99e+003	7.61e+002	100.	1.71	2.75e+004	6.45e+003	1.69	98,40	98,40
300 ppb D3+ 5 ppm D2	7.93e+003	2.03e+003	300.	1.74	2.59e+004	5.73e+003	1.70	314,00	105,00
500 ppb D3+ 5 ppm D2	1.30e+004	2.96e+003	500.	1.74	2.74e+004	6.73e+003	1.70	497,00	99,30
750 ppb D3+ 5 ppm D2	1.78e+004	4.56e+003	750.	1.72	2.64e+004	6.70e+003	1.69	718,00	95,70
1 ppm D3+ 5 ppm D2	2.51e+004	6.08e+003	1000.	1.72	2.58e+004	6.15e+003	1.69	1040,00	104,00
10 ppbD3+ 5 ppm D2	6.94e+002	1.79e+002	10.0	1.64	2.45e+004	5.55e+003	1.63	10,60	106,00
30 ppb D3+ 5 ppm D2	1.18e+003	2.32e+002	30.0	1.69	2.50e+004	5.92e+003	1.65	31,40	105,00
50 ppb D3+ 5 ppm D2	1.69e+003	3.67e+002	50.0	1.65	2.46e+004	5.91e+003	1.63	54,40	109,00
75 ppb D3+ 5 ppm D2	2.20e+003	5.71e+002	75.0	1.66	2.37e+004	5.28e+003	1.63	81,40	108,00
100 ppb D3+ 5 ppm D2	2.77e+003	6.17e+002	100.	1.67	2.55e+004	6.03e+003	1.63	98,20	98,20
300 ppb D3+ 5 ppm D2	7.61e+003	1.79e+003	300.	1.72	2.58e+004	5.78e+003	1.68	302,00	101,00
500 ppb D3+ 5 ppm D2	1.24e+004	2.98e+003	500.	1.69	2.70e+004	6.18e+003	1.65	481,00	96,20
750 ppb D3+ 5 ppm D2	1.90e+004	4.88e+003	750.	1.73	2.69e+004	5.77e+003	1.69	753,00	100,00
1 ppm D3+ 5 ppm D2	2.35e+004	5.39e+003	1000.	1.75	2.55e+004	5.70e+003	1.73	986,00	98,60
10 ppbD3+ 5 ppm D2	6.80e+002	2.31e+002	10.0	1.65	2.46e+004	5.68e+003	1.62	9,77	97,70
30 ppb D3+ 5 ppm D2	1.22e+003	2.87e+002	30.0	1.61	2.54e+004	5.81e+003	1.60	32,10	107,00
50 ppb D3+ 5 ppm D2	1.66e+003	3.51e+002	50.0	1.70	2.52e+004	6.41e+003	1.65	51,60	103,00
75 ppb D3+ 5 ppm D2	2.12e+003	6.47e+002	75.0	1.67	2.55e+004	5.99e+003	1.65	70,70	94,30
100 ppb D3+ 5 ppm D2	2.71e+003	7.55e+002	100.	1.68	2.47e+004	5.79e+003	1.65	99,70	99,70
300 ppb D3+ 5 ppm D2	7.98e+003	1.79e+003	300.	1.70	2.50e+004	5.89e+003	1.68	329,00	110,00
500 ppb D3+ 5 ppm D2	1.21e+004	2.65e+003	500.	1.68	2.59e+004	6.03e+003	1.65	491,00	98,10
750 ppb D3+ 5 ppm D2	1.79e+004	4.14e+003	750.	1.73	2.55e+004	6.20e+003	1.69	744,00	99,30
1 ppm D3+ 5 ppm D2	2.54e+004	5.61e+003	1000.	1.73	2.59e+004	5.82e+003	1.69	1050,00	105,00
5000 ppb D3+ 5 ppm D2	1.54e+005	3.27e+004	5000.	1.64	3.48e+004	7.35e+003	1.61	4810,00	96,20
5000 ppb D3+ 5 ppm D2	1.51e+005	3.45e+004	5000.	1.66	3.40e+004	8.52e+003	1.62	4850,00	97,00
5000 ppb D3+ 5 ppm D2	1.48e+005	3.31e+004	5000.	1.66	3.39e+004	7.74e+003	1.63	4760,00	95,20
3 ppm D3+ 5 ppm D2	7.42e+004	1.82e+004	3000.	1.64	2.56e+004	5.96e+003	1.60	3160,00	105,00
3 ppm D3+ 5 ppm D2	8.19e+004	2.03e+004	3000.	1.67	2.77e+004	6.63e+003	1.64	3220,00	107,00

9.4. Visszanyerés vizsgálat

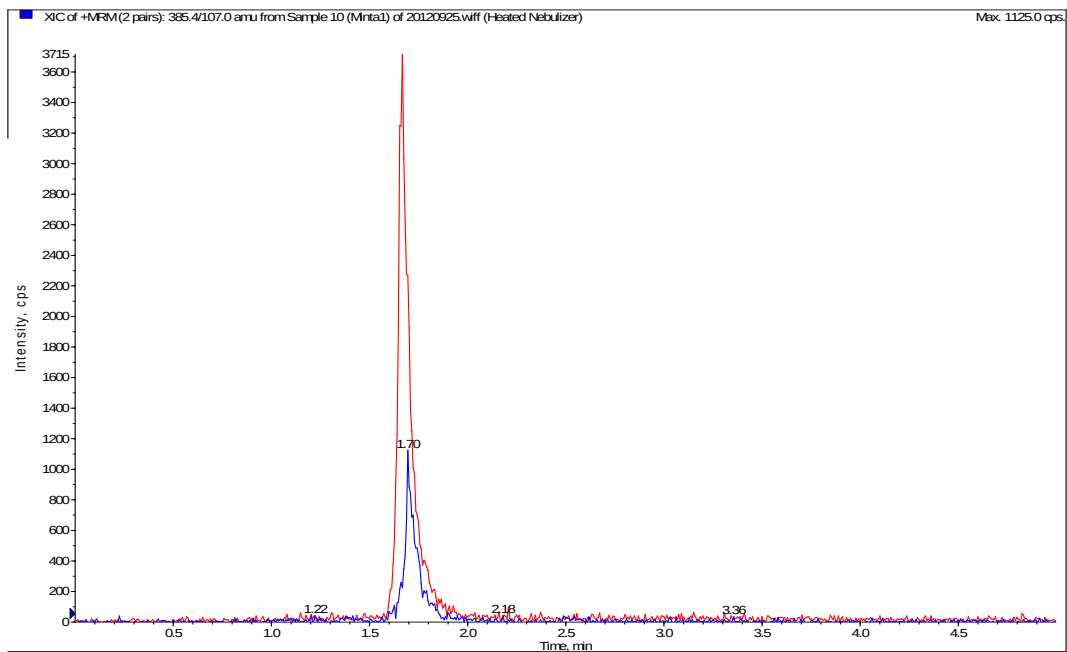
3 ppm D3+ 5 ppm D2 spykolt mintáknál								
Minta neve	D3 Integrált terület (counts)	D3 csúcsmagasság (cps)	D3 retenció idő (perc)	IS integrált terület (counts)	IS csúcsmagasság (cps)	IS Retenció idő (min)	Számolt koncentráció (ng/mL)	Szórás (%)
75 ppb d3 + 5 ppm d2	1.49e+003	3.50e+002	1.65	1.88e+004	4.48e+003	1.62	68,20	91,00
100 ppb d3 + 5 ppm d2	2.62e+003	6.13e+002	1.70	2.45e+004	6.16e+003	1.67	97,40	97,40
300 ppb d3 + 5 ppm d2	6.65e+003	1.56e+003	1.70	2.48e+004	5.50e+003	1.66	270,00	89,90
500 ppb d3 + 5 ppm d2	1.12e+004	2.68e+003	1.72	2.46e+004	5.61e+003	1.68	468,00	93,60
1 ppm d3+5ppm d2	2.43e+004	5.84e+003	1.73	2.63e+004	6.54e+003	1.69	970,00	97,00
3 ppm D3+ 5 ppm D2	7.44e+004	1.82e+004	1.64	2.58e+004	5.97e+003	1.60	3060,00	102,00
75 ppb d3 + 5 ppm d2	2.38e+003	4.82e+002	1.64	2.80e+004	6.69e+003	1.62	73,80	98,40
100 ppb d3 + 5 ppm d2	2.99e+003	6.68e+002	1.69	2.80e+004	6.91e+003	1.65	96,90	96,90
300 ppb d3 + 5 ppm d2	8.54e+003	2.24e+003	1.70	2.78e+004	6.41e+003	1.67	311,00	104,00
500 ppb d3 + 5 ppm d2	1.36e+004	3.17e+003	1.72	2.83e+004	6.62e+003	1.68	494,00	98,80
1 ppm d3+5ppm d2	2.60e+004	5.85e+003	1.75	2.72e+004	6.47e+003	1.72	1000,00	100,00
3 ppm D3+ 5 ppm D2	8.24e+004	2.03e+004	1.67	2.76e+004	6.63e+003	1.64	3160,00	105,00
5 ppm D3+ 5 ppm D2	1.30e+005	3.05e+004	1.68	2.73e+004	6.26e+003	1.65	5040,00	101,00
75 ppb d3 + 5 ppm d2	2.45e+003	5.71e+002	1.68	2.79e+004	7.19e+003	1.65	77,20	103,00
100 ppb d3 + 5 ppm d2	3.12e+003	6.43e+002	1.70	2.78e+004	6.82e+003	1.66	103,00	103,00
300 ppb d3 + 5 ppm d2	8.18e+003	1.92e+003	1.70	2.79e+004	6.81e+003	1.66	296,00	98,70
500 ppb d3 + 5 ppm d2	1.26e+004	3.19e+003	1.68	2.78e+004	6.94e+003	1.64	467,00	93,40
1 ppm d3+5ppm d2	2.67e+004	6.29e+003	1.75	2.77e+004	6.54e+003	1.71	1010,00	101,00
minta1	3.15e+004	5.80e+003	1.70	1.20e+004	2.21e+003	1.66	2770,00	N/A
minta2	3.34e+004	5.51e+003	1.72	1.24e+004	2.08e+003	1.68	2860,00	N/A
minta3	3.71e+004	8.16e+003	1.74	1.35e+004	2.98e+003	1.70	2910,00	N/A
minta1	3.57e+004	6.23e+003	1.68	1.38e+004	2.32e+003	1.64	2740,00	N/A
minta2	3.67e+004	6.10e+003	1.74	1.34e+004	2.17e+003	1.70	2910,00	N/A
minta3	4.00e+004	9.06e+003	1.75	1.53e+004	3.04e+003	1.72	2770,00	N/A
minta1	3.58e+004	5.92e+003	1.72	1.40e+004	2.37e+003	1.68	2710,00	N/A
minta2	3.87e+004	6.43e+003	1.69	1.42e+004	2.36e+003	1.65	2880,00	N/A
minta3	4.09e+004	7.60e+003	1.75	1.55e+004	3.46e+003	1.71	2800,00	N/A

300 ppb D3+ 5 ppm D2 spykolt mintáknál							
Minta neve	D3 Integrált terület (counts)	D3 csúcsmagasság (cps)	D3 retenció idő (perc)	IS integrált terület (counts)	IS csúcsmagasság (cps)	Számolt koncentráció (ng/mL)	Szórás (%)
50 ppb D3+ 5ppm D2	1.65e+003	3.80e+002	1.65	2.45e+004	5.09e+003	51,00	102,00
75 ppb D3+5 ppm D2	2.23e+003	4.52e+002	1.66	2.52e+004	5.56e+003	75,10	100,00
100 ppb D3+5ppm D2	3.01e+003	7.52e+002	1.68	2.83e+004	6.55e+003	95,90	95,09
300 ppb D3+ 5 ppm D2	7.08e+003	1.48e+003	1.68	2.60e+004	6.06e+003	286,00	95,02
500 ppb D3+ 5 ppm D2	1.26e+004	2.66e+003	1.69	2.80e+004	5.96e+003	489,00	97,80
750 ppb D3+ 5 ppm D2	1.92e+004	4.19e+003	1.71	2.81e+004	6.08e+003	758,00	101,00
1000 ppb D3+ 5 ppm D2	2.64e+004	5.87e+003	1.71	2.79e+004	6.40e+003	1060,00	106,00
Minta1	4.63e+003	1.13e+003	1.70	1.65e+004	3.71e+003	295,00	N/A
Minta1	4.92e+003	1.13e+003	1.68	1.69e+004	3.51e+003	306,00	N/A
Minta1	4.69e+003	9.83e+002	1.70	1.64e+004	3.89e+003	302,00	N/A
Minta2	4.32e+003	8.62e+002	1.73	1.51e+004	3.29e+003	300,00	N/A
Minta2	4.53e+003	9.86e+002	1.71	1.59e+004	3.57e+003	301,00	N/A
Minta2	4.32e+003	9.95e+002	1.69	1.52e+004	3.23e+003	300,00	N/A
Minta3	4.45e+003	9.37e+002	1.62	1.56e+004	3.35e+003	301,00	N/A
Minta3	4.39e+003	9.53e+002	1.63	1.53e+004	3.25e+003	303,00	N/A
Minta3	4.29e+003	8.87e+002	1.61	1.51e+004	3.38e+003	298,00	N/A
50 ppb D3+ 5ppm D2	1.89e+003	3.78e+002	1.63	2.82e+004	6.48e+003	50,06	101,00
75 ppb D3+5 ppm D2	2.54e+003	4.99e+002	1.67	2.80e+004	6.31e+003	77,08	104,00
100 ppb D3+5ppm D2	3.13e+003	8.55e+002	1.65	2.92e+004	6.48e+003	96,06	96,06
300 ppb D3+ 5 ppm D2	8.49e+003	1.78e+003	1.67	2.83e+004	6.00e+003	317,00	106,00
500 ppb D3+ 5 ppm D2	1.33e+004	3.12e+003	1.66	2.88e+004	6.38e+003	504,00	101,00
750 ppb D3+ 5 ppm D2	1.91e+004	4.16e+003	1.68	2.90e+004	6.41e+003	727,00	96,90
1000 ppb D3+ 5 ppm D2	2.71e+004	5.84e+003	1.68	3.06e+004	6.98e+003	986,00	98,60
50 ppb D3+ 5ppm D2	1.87e+003	4.30e+002	1.64	2.77e+004	6.01e+003	51,20	102,00
75 ppb D3+5 ppm D2	2.59e+003	5.33e+002	1.63	2.95e+004	6.44e+003	74,50	99,30
100 ppb D3+5ppm D2	3.14e+003	6.56e+002	1.66	2.96e+004	6.08e+003	95,60	95,60
300 ppb D3+ 5 ppm D2	8.48e+003	1.91e+003	1.65	2.90e+004	6.79e+003	308,00	103,00
500 ppb D3+ 5 ppm D2	1.38e+004	3.19e+003	1.68	2.95e+004	7.27e+003	510,00	102,00
750 ppb D3+ 5 ppm D2	1.97e+004	4.11e+003	1.69	2.87e+004	6.62e+003	758,00	101,00
1000 ppb D3+ 5 ppm D2	2.68e+004	5.70e+003	1.70	3.01e+004	6.81e+003	991,00	99,10

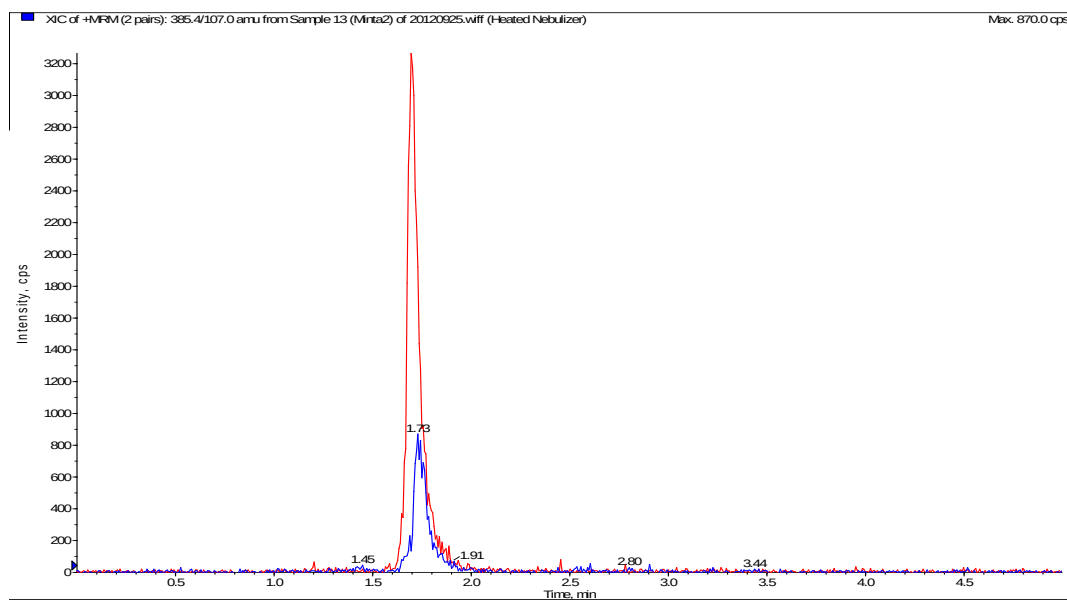
9.5. Szalonna minták mérési eredményei

Minta neve	D3 Integrált terület (counts)	D3 csúcsmagasság (cps)	D3 retenció idő (perc)	IS integrált terület (counts)	IS csúcsmagasság (cps)	IS Retenció idő (min)	Számolt koncentráció (ng/mL)	Szórás (%)
300 ppb	8.69e+003	2.08e+003	1.70	3.09e+004	7.66e+003	1.67	313,00	104,00
30 ppb	1.56e+003	3.35e+002	1.70	3.00e+004	6.94e+003	1.66	32,00	107,00
50 ppb	2.09e+003	4.62e+002	1.67	3.00e+004	6.95e+003	1.66	53,90	108,00
75 ppb	2.54e+003	5.95e+002	1.70	3.07e+004	7.27e+003	1.66	70,00	93,30
100 ppb	3.45e+003	7.23e+002	1.71	3.08e+004	7.51e+003	1.67	106,00	106,00
300 ppb	8.50e+003	1.76e+003	1.71	3.07e+004	7.77e+003	1.67	309,00	103,00
500 ppb	1.34e+004	3.08e+003	1.72	3.00e+004	7.07e+003	1.69	514,00	103,00
50 ppb	2.25e+003	4.96e+002	1.65	3.23e+004	8.02e+003	1.61	53,80	108,00
75 ppb	3.00e+003	5.89e+002	1.71	3.25e+004	7.76e+003	1.66	81,50	109,00
100 ppb	3.51e+003	7.72e+002	1.70	3.50e+004	9.01e+003	1.67	91,60	91,60
500 ppb	1.50e+004	3.56e+003	1.72	3.35e+004	7.58e+003	1.68	516,00	103,00
750 ppb	1.94e+004	4.46e+003	1.64	3.39e+004	7.94e+003	1.60	670,00	89,30
1000 ppb	2.90e+004	7.00e+003	1.64	3.37e+004	8.15e+003	1.62	1030,00	103,00
50 ppb	2.06e+003	4.50e+002	1.68	3.32e+004	7.93e+003	1.65	44,40	88,80
75 ppb	2.85e+003	5.68e+002	1.68	3.44e+004	8.18e+003	1.66	70,00	93,30
5000 ppb	1.50e+005	3.44e+004	1.66	3.40e+004	8.51e+003	1.62	5390,00	108,00
100 ppb	3.85e+003	8.47e+002	1.71	3.51e+004	8.33e+003	1.67	103,00	103,00
300 ppb	9.40e+003	2.12e+003	1.71	3.52e+004	8.56e+003	1.67	296,00	98,60
500 ppb	1.51e+004	3.33e+003	1.73	3.52e+004	9.26e+003	1.70	495,00	99,10
750 ppb	2.12e+004	4.68e+003	1.64	3.50e+004	8.88e+003	1.61	710,00	94,70
1000 ppb	2.94e+004	6.94e+003	1.66	3.68e+004	8.75e+003	1.62	950,00	95,00
5000 ppb	1.47e+005	3.31e+004	1.66	3.37e+004	7.74e+003	1.63	5330,00	107,00
1000 ppb	3.04e+004	7.26e+003	1.63	3.67e+004	8.99e+003	1.60	985,00	98,50
5000 ppb	1.49e+005	3.37e+004	1.66	3.52e+004	8.17e+003	1.63	5180,00	104,00
minta1	9.08e+003	1.72e+003	1.75	3.80e+003	7.40e+002	1.59	2900,00	N/A
Minta1	8.43e+003	1.65e+003	1.76	3.27e+003	6.32e+002	1.61	3130,00	N/A
Minta2	9.37e+003	1.76e+003	1.78	3.44e+003	8.18e+002	1.62	3300,00	N/A
Minta3	7.03e+003	1.51e+003	1.79	2.63e+003	4.78e+002	1.63	3250,00	N/A
Minta1	8.30e+003	1.76e+003	1.72	3.24e+003	6.03e+002	1.57	3110,00	N/A
Minta2	9.11e+003	1.85e+003	1.75	3.41e+003	7.93e+002	1.61	3250,00	N/A
Minta3	7.15e+003	1.57e+003	1.77	2.56e+003	6.08e+002	1.62	3400,00	N/A
minta1	8.92e+003	1.57e+003	1.73	3.89e+003	7.31e+002	1.57	2780,00	N/A
minta2	8.61e+003	1.52e+003	1.77	3.76e+003	8.55e+002	1.62	2780,00	N/A
minta3	7.39e+003	1.54e+003	1.77	3.02e+003	6.40e+002	1.63	2970,00	N/A

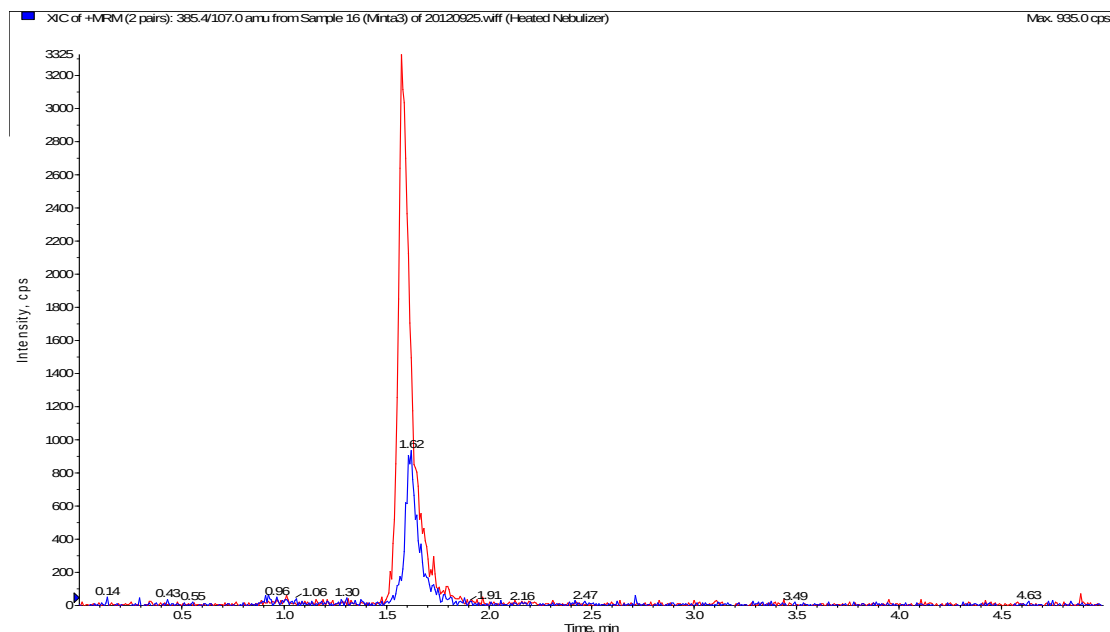
9.6. Visszanyerési vizsgálatok kromatogramjai vízből 300 ppb-nél



1. vízminta: 300 ppb



2. vízminta 300 ppb



3. vízminta 300 ppb