

# **UHPLC-menetelmät B-vitamiinien samanaikaisessa analysoinnissa**

Biokemia  
Kandidaatintutkielma

Laatija:  
Jesse Aulis Piirainen

15.5.2025  
Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu  
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Kandidaatintutkielma

**Oppiaine:** Biokemia

**Tekijä(t):** Jesse Piirainen

**Otsikko:** UHPLC-menetelmät B-vitamiinien samanaikaisessa analysoinnissa

**Ohjaaja:** Jukka-Pekka Suomela, Ph.D.

**Sivumäärä:** 18 sivua

**Päivämäärä:** 24.2.2025

B-vitamiinit ovat ihmisille välttämättömiä vesiliukoisia vitamiineja, jotka koostuvat kahdeksasta perusrakenteesta sekä niiden johdannaisista ja aktiivisista muodoista. B-vitamiinien perusrakenteita ovat tiamiini, riboflaviini, niasiini, pantoteenihappo, pyridoksiini, foolihappo ja kobalamiini, ja ne ovat kofaktoreita ja koentsyymejä monissa kehon reaktioissa. B-vitamiinien puute voi johtaa erittäin vakaviin sairauksiin, mikä puolestaan on tehnyt niistä merkittävän tutkimuskohteen. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on yleisin B-vitamiinien analyysissä käytettävä menetelmä ja uudet menetelmät perustuvat pääasiassa ultratehokkasiin nestekromatografisiin (UHPLC) analyysiin. B-vitamiinien analysointiin halutaan kehittää nopeita, yksikertaisia ja tehokkaita menetelmiä, mutta analysointia vaikeuttaa B-vitamiinien hajoamisalttius, matriisivaikutus ja erilaisten B-vitamiinirakenteiden suuri määrä. Vitamiinit täytyy erottaa monimutkaisen matriisin muista yhdisteistä, kuten proteiineista, esimerkiksi entsyymeillä, ja parhaan tuloksen saamiseksi B-vitamiinit täytyy suojata valolta, hapettumiselta ja lämmöltä. UHPLC-MS/MS on suosittu menetelmä B-vitamiinien samanaikaiseen analysointiin, ja sillä on voitu analysoida tarkasti jopa seitsemän B-vitamiinia samanaikaisesti.

**Avainsanat:** B-vitamiini, UHPLC, HILIC

## **Sisällysluettelo**

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>B-vitamiinit elintarvikkeissa</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>B-vitamiinien rakenteet</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Nestekromatografia</b>	<b>10</b>
4.1	Erotusmenetelmät	10
4.2	HILIC – Hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografia	11
4.3	Nestekromatografian detektoreita	11
4.4	Massaspektrometria	12
<b>5</b>	<b>B-vitamiinien samanaikainen analysointi</b>	<b>13</b>
<b>5.1</b>	<b>Vitamiininäytteiden esikäsittely ja uuttaminen</b>	<b>13</b>
5.1.1	Proteiinisaostus	13
5.1.2	Happohydrolyysi	13
5.1.3	Entsyymikäsittely	14
5.1.4	Kiinteäfaasiuutto	14
<b>5.2</b>	<b>Vaihtoehtoisia menetelmiä B-vitamiinien analysointiin.</b>	<b>14</b>
5.2.1	B-vitamiinien analysointi energiajuomista diodirivi- ja fluoresenssidetektorilla	14
5.2.2	B-vitamiinien analysointi kalasta HILIC-erotusmenetelmällä ja massaspektrometrillä	15
5.2.3	B-vitamiinien analysointi linssisiemenistä UHPLC-MS/MS-menetelmällä	16
5.2.4	B-vitamiinien analysointi vehnästä UHPLC-MS/MS-menetelmällä	18
<b>5.3</b>	<b>B-vitamiinien analysointiin liittyviä huomioita ja ongelmia</b>	<b>18</b>
<b>6</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>20</b>
	<b>Lähteet</b>	<b>21</b>

# 1 Johdanto

Vitamiinien analysointi on ollut suuressa suosiossa, koska ne ovat tärkeitä terveydelle. Energiajuomiin ja terveystuotteisiin lisätään useimmiten vitamiineja ja niiden puute on yleistä riittämättömän ruokavalion vuoksi varsinkin kehitysmaissa. Ihmiskeho ei kykene syntetisoimaan vitamiineja itse ja niiden puute johtaa vakaviin sairauksiin ja puutostiloihin. (Ngwenya ja muut 2025)

Vitamiinit jaetaan rasvaliukoisiin ja vesiliukoisiin vitamiineihin. Rasvaliukoisiin vitamiineihin kuuluvat A-, D-, E- ja K-vitamiinit ja vesiliukoisiin C- ja B-vitamiinit. B-vitamiinit (kuva 1–4) puolestaan jaetaan kahdeksaan tyyppiin, joita ovat B1 (tiamiini), B2 (riboflaviini), B3 (niasiini), B5 (pantoteenihappo), B6 (pyridoksiini), B7 (biotini), B9 (foolihappo) ja B12 (kobalamiini). Kaikkia B-vitamiineja paitsi B12:ta voidaan teoriassa saada riittävästi kasveista (Cao ja muut 2024). B12-vitamiinia saadaan pääasiassa eläintuotteista.

Vitamiinien analysointiin halutaan kehittää tehokkaita menetelmiä, jotta niitä voitaisiin analysoida samanaikaisesti. Analysointi on hidasta vitamiinien sekä niiden aktiivisten muotojen eli vitameerien määrän vuoksi (Fatima ja muut 2019). Vitamiinit ovat myös labiileja ja ne reagoivat muiden yhdisteiden kanssa, mikä vaikeuttaa niiden analysointia ruokamatriiseista.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia on moderni ja tehokas analyysimenetelmä, joka on yleisessä käytössä elintarvikkeiden analysoinnissa. HPLC-laitteistoilla voidaan erottaa, puhdistaa ja kvantitoida yhdisteitä nopeasti ja tarkasti. HPLC-analyysin olosuhteita voidaan muuttaa käyttämällä eri kolonneja, ja muuttamalla faaseja ja ajoliuoksia HPLC:tä voidaan soveltaa monipuolisesti molekyylien analysoinnissa. Käänteisfaasinestekromatografiassa (engl. Reversed-Phase HPLC) mobiilifaasi on stationaarifaasia poolisempi, ja se on yleisin käytössä oleva erotusmenetelmä varsinkin vesiliukoisten vitamiinien analysoinnissa. (Fatima ja muut 2019)

HPLC-ajossa yhdisteet erottuvat kolonnissa, minkä jälkeen ne siirtyvät detektorille. Detektorin toiminta voi perustua fluoresenssiin (FLD), valon absorptioon (UV-VIS, DAD) tai ionin massa-varaussuhteeseen (MS). Detektoreilla voidaan havaita molekyyliä monipuolisesti, mutta detektorien sopivuus yhdisteiden kanssa vaihtelee ja sopiva detektori valitaan analyysin ja näytteen mukaan (Kumar S.D. ja Kumar H.D.R. 2012).

Diodirividetektorilla (DAD, Diode-array-detector), voidaan havaita valon absorptiota halutulla aallonpituusvälillä eikä vain yhdellä aallonpituudella, mikä antaa kuvaa molekyylin rakenteesta. Vastaavasti massaspektrometriassa (MS) voidaan käyttää kahta massa-analysointia (MS/MS) eli esimerkiksi kahta kvadrupolia, mikä tarkoittaa detektiota.

Tässä tutkielmassa käsittelemme erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografian (Ultra-HPLC) uusia menetelmiä B-vitamiinien tehokkaaseen ja nopeaan analysointiin. UHPLC-laitteistolla saavutetaan erittäin suuri resoluutio eli erotuskyky, mikä mahdollistaa useampien yhdisteiden piikkien erottamisen kromatogrammista. Tehokkaampi erotuskyky mahdollistaisi useamman B-vitamiinin ja niiden vitameerien samanaikaisen analysoinnin. UHPLC-menetelmiä eri detektoreilla ja erilaisilla näytteiden esikäsittelyillä on testattu B-vitamiinien analysointiin elintarvikkeista ja biologisista matriiseista.

## 2 B-vitamiinit elintarvikkeissa

B-vitamiinit toimivat kofaktoreina tai koentsyymeinä monissa kehon toiminnoissa.

Esimerkiksi tiamiinin (B1) aktiivinen muoto on tiamiinipyrofosfaatti (TPP) ja niasiini (B3) toimii komponenttina NAD- ja NADP-kofaktoreissa. Molemmat molekyylit ovat tärkeitä osia esimerkiksi kehon energian tuotossa. TPP osallistuu sitruunahappokiertoon ja NAD ja NADP osallistuvat hapetus-pelkistysreaktioihin. B-vitamiinit ovat elintärkeitä ja niiden puute voi johtaa erittäin vakaviin sairauksiin, kuten beriberiin (tiamiini) tai pellagraan (niasiini). Pyridoksiinista (B6) ja niasiinista voi saada yliannostuksen, mutta muuten B-vitamiinit erittyvät vesiliukoisina tehokkaasti virtsan mukana. (Hanna ja muut 2022)

Vitamiinien tärkeyden vuoksi niitä lisätään esimerkiksi energiajuomiin ja muihin elintarvikkeisiin tai niiden tuottoa viljelykasveissa halutaan tehostaa (Cao ja muut 2024; Gliszczyńska-Świgło ja Rybicka 2015). Vehnä ja riisi ovat merkittävimpiä viljelykasveja, mutta molempien vitamiinipitoisuus on vähäinen. Biofortifikaatiolla pyritään parantamaan viljelykasvien hivenaineiden pitoisuutta jalostamalla tai geenimuuntelulla. B-vitamiinien analysoimiseen halutaan kehittää nopeita ja tehokkaita menetelmiä, koska B-kompleksin vitamiineja on useita ja niiden tarkka määrittäminen ruokanäytteistä on vaikeaa (San José Rodriguez ja muut 2012). B-vitamiinit voivat helposti tuhoutua ruuan prosessointivaiheissa ja kofaktoreina ne voivat olla liittyneinä muihin molekyyleihin. B-vitamiinien samanaikainen analysointi olisi tehokasta ja taloudellista, mutta vitamiinit esiintyvät eri pitoisuuksina. Detektoreiden esittämissä graafisissa tuloksissa eli kromatogrammeissa yhden vitamiinin piikki voi olla liian saturoitunut ja toisen taas liian pieni.

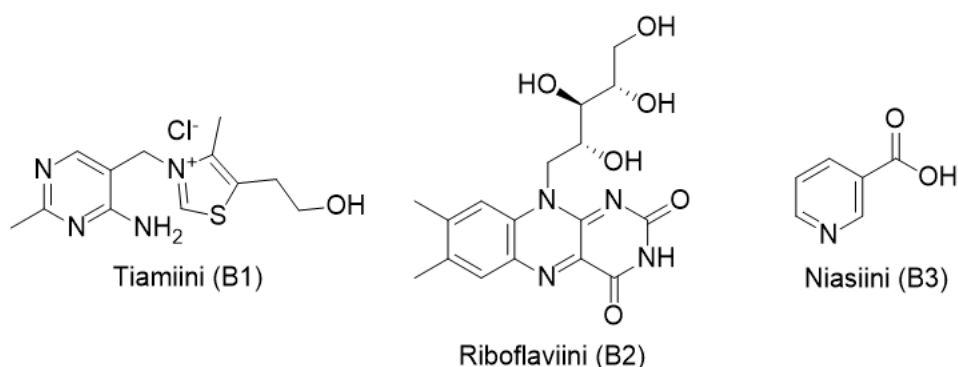
### 3 B-vitamiinien rakenteet

B-vitamiinit koostuvat kahdeksasta vitamiinista, jotka sisältävät näiden perusrakenteen, aktiiviset muodot eli vitameerit ja vaihtoehtoiset rakenteet tai johdannaiset. B-vitamiineista puhuttaessa tarkoitetaan yleensä perusrakenteita (kuva 1–4), mutta vaihtoehtoisia rakenteita on yli 20.

Tiamiinin perusrakenteeseen (kuva 1) on biologisessa matriisissa sitoutuneena fosfaattiryhmiä, jolloin tiamiini esiintyy tiamiinimonofosfaatin tai -difosfaatin muodossa. Fosfaattiryhmät sitoutuvat tiamiinin hydroksyyliin. Tiamiinidifosfaattia kutsutaan yleensä tiamiinipyrofosfaatiksi (TPP) ja se on tiamiinin aktiivinen muoto (Hanna ja muut 2022).

Riboflaviinin (kuva 1) aktiiviset muodot ovat flaviinimononukleotidi (FMN) eli riboflaviini-5'-fosfaatti ja flaviinadeniinidinukleotidi (FAD) (Hanna ja muut 2022). FMN ja FAD osallistuvat energiametaboliaan, sillä ne ovat protonin kuljettajia hapetus-pelkistysreaktioissa.

Niasiinin tai nikotiinihapon (kuva 1) aktiiviset muodot ovat nikotiiniamididinukleotidi (NAD) ja nikotiiniamididinukleotidifosfaatti (NADP) (Hanna ja muut 2022). NAD ja NADP osallistuvat FAD:n ja FMN:n kaltaisesti hapetus-pelkistysreaktioihin. Niasiinin toinen muoto nikotiiniamidi, jossa hydroksyyliiniryhmä on korvautunut NH<sub>2</sub>-ryhmällä (Fatima ja muut 2019).



Kuva 1. Tiamiinin (B1), riboflaviinin (B2) ja Niasiinin (B3) perusrakenne.

Pantoteenihappoa (kuva 2) tarvitaan pääasiassa koentsyymi A:n biosynteesiin (Hanna ja muut 2022). Koentsyymi A on sinänsä pantoteenihapon aktiivinen muoto, vaikka sitä ei luetella B-vitamiiniksi. Koentsyymi A osallistuu energiametaboliaan.

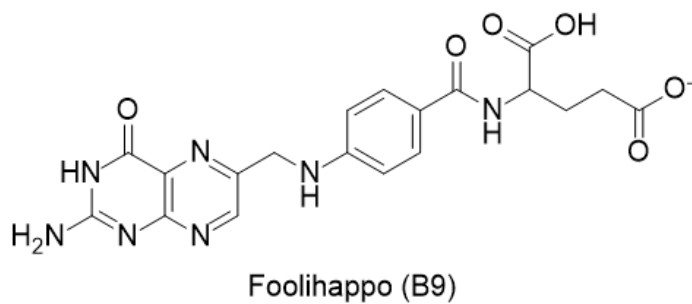
Pyridoksiini (Kuva 2) sisältää useita muotoja, joista pyridoksaali-5'-fosfaatti (PLP) on sen aktiivinen muoto (Hanna ja muut 2022). Aktiivinen muoto toimii usean entsyymin koentsyyminä, ja se osallistuu esimerkiksi immuunisysteemin toimintaan sekä rasvojen, proteiinien ja hiilihydraattien hajotukseen. Pyridoksiinin muita muotoja ovat pyridoksaali, pyridoksamiini, 4-pyridoksinihappo, pyridoksiinifosfaatti (PNP) ja pyridoksamiinifosfaatti (PMP) (Fatima ja muut 2019). Biotiini (kuva 2) on B7-vitamiinin perusrakenne ja aktiivinen muoto (Hanna ja muut 2022). Biotiini osallistuu rasvahappojen metaboliaan.



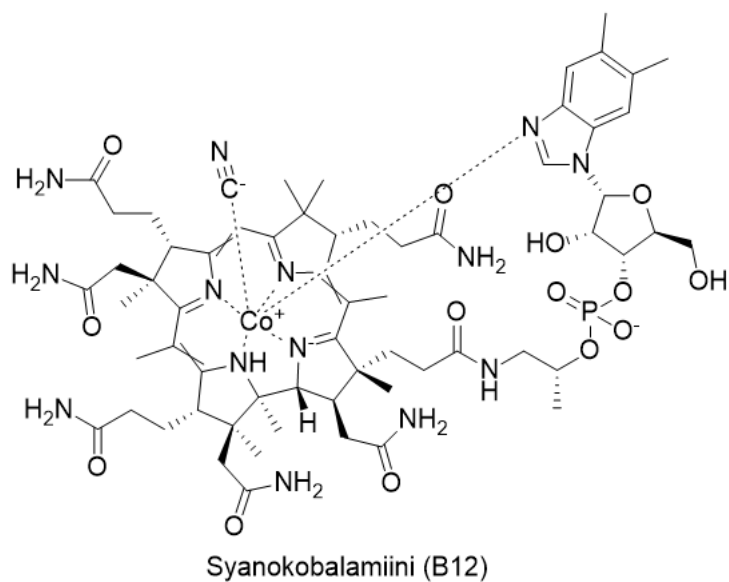
Kuva 2. Pantoteenihapon (B5), pyridoksiinin (B6) ja Biotiinin (B7) perusrakenne.

Foolihapon eli folaatin (kuva 3) aktiivinen muoto on metyyliitetrahydrofolaatti (5-MTHF) (Hanna ja muut 2022). Foolihappo osallistuu nukleiinihappojen ja punasolujen synteisiin. Foolihapon muita muotoja ovat tetrahydrofolaatti (THF), dihydrofoolihappo (DHF), 10-formyyliitetrahydrofolaatti (10-FTHF) ja 5,10-metenyyliitetrahydrofolaatti (Fatima ja muut 2019). 5-formyyliitetrahydrofolaatti on yleinen muoto riisissä ja vehnässä (Cao ja muut 2024).

Kobalamiinin (kuva 4) aktiiviset muodot ovat metyylikobalamiini (MeCbl) ja 5'-deoksiadenosyylikobalamiini (AdoCbl) (Pérez-Fernández ja muut 2016). Kobalamiini osallistuu punasolujen ja myeliinin synteisiin. Kobalamiinin muita muotoja ovat syanokobalamiini (CNCbl, kuva 4) ja hydroksikobalamiini (OHCbl). Yleensä syanokobalamiinimuotoa käytetään lisäaineena ja B12-yhdisteenä kemiallisissa ja lääketieteellisissä menetelmissä. Esimerkiksi HPLC-analyyseissä käytetään syanidiyhdisteitä muuttamaan kaikki kobalamiini syanokobalamiiniksi.



Kuva 3. Foolihapon (folaatin) (B9) perusrakenne.



Kuva 4. Kobalamiinin (B12) perusrakenne. Kyseessä on syanokobalamiini, kun koordinoituneeseen kobolttiin on sitoutuneena syanidi-ioni  $\text{CN}^-$ .

## 4 Nestekromatografia

HPLC-laitteisto koostuu injektorista, pumpusta, kolonnista ja detektorista. Ajoliuosta eli mobiilifaasia pumpataan kolonnin läpi detektorille. Kolonni koostuu tiukkaan pakatuista partikkeleista eli stationaarifaasista, johon analysoitavat molekyylit pidättyvät erilaisilla vahvuuksilla. Heikommin pidättyvät molekyylit kulkevat kolonnin läpi tiukasti pidättyviä molekyylejä nopeammin, jolloin ne voidaan erottaa toisistaan.

Stationaarifaasin pidätyspinta-ala kasvaa partikkeleiden koon pientyessä. Pienemmällä partikkelikoolla saavutetaan parempi erotuskyky, mikä puolestaan nopeuttaa ja tehostaa analyysiä. HPLC-laitteistojen täytyy kestää suurta painetta, sillä kolonni on pakattu tiukkaan. Ajoliuosta pumpatessa muodostuu paljon vastapainetta ja varsinkin HPLC-laitteiston täytyy kestää erittäin suurta painetta (400 bar) pienen partikkelikoon vuoksi. Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (UHPLC) partikkelien halkaisija on jopa alle 2  $\mu\text{m}$ . UHPLC-laitteiston pitää kestää jopa 1000 barin paineen, mikä tekee niistä erittäin kalliita. Käyttötarkoituksen mukaan kolonnin ja partikkelien materiaali ja muoto voidaan valita sopivaksi. B-vitamiinien analysoinnissa C18-kolonni on tyypillinen valinta (Fatima ja muut 2019). Käytetty stationaarifaasi koostui huokoisista silikapartikkeleista, joihin on sidottu 18:n hiilen alkyyliiryhmiä. Vaihtoehtoisesti UHPLC-partikkelit koostuivat BEH (Ethylene Bridged Hybrid) -teknologiasta.

### 4.1 Erotusmenetelmät

Nestekromatografiassa kolonnin pakkausmateriaali toimii stationaarifaasina ja ajoliuos mobiilifaasina. Useimmiten HPLC-analyyseissä mobiilifaasi on poolisempi kuin stationaarifaasi, jolloin puhutaan käänteisfaasinestekromatografiasta.

Käänteisfaasinestekromatografia on yleisin käytössä oleva erotusmenetelmä HPLC-analyyseissä sen hyvän soveltuvuuden vuoksi (Kumar S.D. ja Kumar H.D.R. 2012). Käänteisfaasin vastakohta on normaalifaasinestekromatografia, jossa stationaarifaasi on mobiilifaasia poolisempi. Normaalifaasia käytetään yleensä silloin, kun käänteisfaasi ei sovellu analyysiin. B-vitamiinien analyysissä suositetaan käänteisfaasia normaalifaasin sijaan (Fatima ja muut 2019).

HPLC-analyyseissä käytetään usein gradienttia eli muuttuvaa mobiilifaasia. Mobiilifaasin muuttamiseen käytetään kahta ajoliuosta, joiden suhdetta muutetaan analyysin edetessä. Riippuen erotusmenetelmästä mobiilifaasi koostuu ajon alussa joko poolittomasta

orgaanisesta liuottimesta tai poolisesta liuottimesta, yleensä vedestä.

Käänteisfaasikromatografiassa analyysin aloittava ajoliuos A koostuu pääosin vedestä ja ajoliuos B koostuu usein asetonitriilistä (ACN) (Fatima ja muut 2019). Jos mobiilifaasi ei muutu, analyysiä sitä kutsutaan isokraattiseksi.

## 4.2 HILIC – Hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografia

HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) eli hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografia on vaihtoehtoinen erotusmenetelmä normaali- ja käänteisfaasinessekromatografialle. HILIC yhdistää normaali- ja käänteisfaasin, sillä stationaarifaasi sekä mobiilifaasi ovat poolisia (Kartsova ja muut 2019). Käänteisfaasin kaltaisesti HILIC-mobiilifaasi koostuu vedestä ja asetonitriilistä. Mobiilifaasi koostuu alussa pääasiassa asetonitriilistä ja pienestä pitoisuudesta vettä (n. 3 %), joka adsorboituu stationaarifaasin ohueksi kalvoksi. Analysoitavat yhdisteet pidättyvät tähän stationaariin pidättyvään vesikerrokseen. Veden pitoisuutta kasvatetaan, kunnes noin puolet mobiilifaasista koostuu vedestä. Tällöin vesikerrosta ei enää muodostu ja HILIC ei pidätä yhdisteitä. Käänteisfaasia käytetään yleensä B-vitamiinien analysointiin, mutta HILIC soveltuisi paremmin poolisten yhdisteiden, kuten B-vitamiinien analysointiin (Fatima ja muut 2019; Kartsova ja muut 2019). B-vitamiinit pidättyvät paremmin HILIC-menetelmällä kuin käänteisfaasilla.

## 4.3 Nestekromatografian detektoreita

Mobiilifaasi eli eluentti johdatetaan kolonnista detektorille, joka mittaa yhdisteet niiden eluoitusjärjestyksen mukaan. Detektorit muodostavat piikeistä koostuvan graafisen esitelmän eli kromatogrammin, jossa piikki ja sen intensiteetti kuvaa tietyn yhdisteen määrää. Tyypillisiä detektoreita ovat UV/Vis-detektori, diodirividetkatori (DAD: Diode Array Detector), fluoresenssidetkatori (FLD) ja massaspektrometri (MS). Detektori pyritään valitsemaan analyysin ajaksi niin, että se soveltuu kaikkien yhdisteiden havaitsemiseen. On kuitenkin mahdollista käyttää kahta detektoria peräkkäin.

Yksi B-vitamiinien analysointia vaikeuttava tekijä on sopivan detektorin valinta. Riboflaviini (B2) ja pyridoksiini (B6) ovat luontaisesti fluoresoivia, joten FLD soveltuu hyvin niiden analysointiin (Fatima ja muut 2019). FLD soveltuu myös tiamiinin analysointiin, mutta näytteet vaativat esikäsitelyä (Liddicoat ja muut 2015). Liddicoat ja muut 2015 muuttivat punaviinin tiamiinin ja sen vitameerit (TMP, TDP, TTP) niiden tiokromimuotoihin, mutta

punaviinin polyfenolit häiritsivät analysointia. Gliszczyńska-Świgło ja Rybicka 2015 analysoivat onnistuneesti 12 vesiliukoista vitamiinia samanaikaisesti käyttäen fluoresenssidetektoria flaviinimononukleotidin (B2), riboflaviinin (B2), pyridoksaalin (B6), pyridoksamiinin (B6) ja pyridoksiinin (B6) havaitsemiseen. Loput vitamiinit analysoitiin diodirividetektorilla, ja vain biotiinia (B7) ei analysoitu. Kaikkien B-vitamiinien samanaikaiseen analysointiin voitaisiin mahdollisesti siis soveltaa FLD:tä ja DAD:tä.

#### 4.4 Massaspektrometria

Massaspektrometriassa yhdisteet voidaan erotella niiden massa-varaussuhteen ( $m/z$ ) perusteella. Spektrometrissä yhdisteet ionisoidaan, minkä jälkeen ne kiihdytetään analyysointilaitteille, kuten kvadrupolille, ja lopulta spektrometrin sisäiselle detektorille. Analyysointilaitteilla voidaan erotella ioneja halutulla massa-varaussuhteen alueella. Erotuskykyä voidaan parantaa käyttämällä useampaa analyysointilaitetta peräkkäin. Tällöin puhutaan tandem-massaspektrometriasta (MS/MS). Peräkkäisten analyysointilaitteiden kanssa voidaan käyttää valikoidun reaktion seuranta (engl. SRM, Selected Reaction Monitoring, synonyymi MRM Multiple Reaction Monitoring), jossa ensimmäisellä analyysointilaitteella erotetaan ionit ja toisella analyysointilaitteella niistä muodostuvia fragmentteja. HPLC-laitteistoon yhdistettynä reaktioiden tapahtumista voidaan seurata yhdisteen retentioajan perusteella. HPLC-analyysissä käytetään standardeja yhdisteen ominaisen retentioajan määrittämiseen, jolla itse näyte voidaan tunnistaa kromatogrammista. Ajoitetulla valikoidun reaktion seurannalla (engl. s-SRM, scheduled-SRM) voidaan tarkemmin havaita yhdisteitä niiden eluoitumishetkellä.

Massaspektrometrin käyttö on yleistynyt vitamiinien nestekromatografisissa analyyseissä (Fatima ja muut 2019). Massaspektrometria soveltuu hyvin usean vitamiinin analysointiin ja se on tarkka menetelmä monimutkaisten matriisien analysointiin. Massaspektrometria on yksinkertainen menetelmä, koska se sopii kaikkien B-vitamiinien analysointiin, ja UHPLC-MS-laitteistolla voidaan havaita erittäin matalia vitamiinien määriä. Cao ja muut (2024) kvantifioivat seitsemän B-vitamiinia vehnän jyvistä käyttäen s-SRM-asetusta. Zhang ja muut (2021) kvantifioivat 20 B-vitamiinin vitameeria linsseistä käyttäen SRM-asetusta.

## 5 B-vitamiinien samanaikainen analysointi

B-vitamiinien analysointia varten on viime vuosina kehitetty useita menetelmiä UHPLC-laitteistoilla. Varsinkin UHPLC-laitteistot ovat kalliita, joten tavalliset HPLC-menetelmät ovat vielä yleisesti käytössä. B-vitamiineja on aiemmin analysoitu vain yksi tai kaksi kerrallaan (Cao ja muut 2024), mutta UHPLC mahdollistaisi useamman B-vitamiinin samanaikaisen analysoinnin nopeasti. Menetelmien kehityksessä otetaan huomioon sopivan kolonnin ja esikäsittelyn valinta, joten sopivia materiaaleja verrataan matriisikohtaisesti.

### 5.1 Vitamiininäytteiden esikäsittely ja uuttaminen

B-vitamiinien huolellinen käsittely on suositeltavaa, koska ne ovat herkkiä esimerkiksi valolle ja lämmölle (Fatima ja muut 2019). Näytteiden valmistus vaatii myös esikäsittelyä, koska B-vitamiinit ovat usein sitoutuneena muihin molekyyleihin. Esimerkiksi energiajuomiin lisättyjä B-vitamiineja ei tarvitse esikäsitellä, mutta luontaisissa ruokamatriiseissa ne täytyy erottaa proteiineista ja fosfaattiryhmistä. Erotusmenetelmät voivat perustua proteiinien saostamiseen, happohydrolyysiin, entsyymikäsittelyyn tai kiinteäfaasiuuttoon (engl. SPE, Solid Phase Extraction).

#### 5.1.1 Proteiinisaostus

Proteiinisaostuksessa proteiinit erotetaan liuksesta saostavalla reagenssilla. Proteiinit menettävät hydrofiilisuutensa, jolloin vitamiinit irtoavat ja proteiinit aggregoituvat. Yleisimmin käytetyt reagenssit ovat trikloorietikkahappo (TCA), metanoli ja asetonitriili (Fatima ja muut 2019). TCA-menetelmällä saavutetaan hyvä vitamiinien talteenotto (engl. recovery), mutta TCA-menetelmä on työläs ja kallis verrattuna muihin reagensseihin. Asetonitriili ei taas sovellu flaviiniadeniinidinukleotidin (FAD, B2) ja nikotiiniamidin (B3) uuttoon. Saostusmenetelmissä proteiinisaostumat saattavat myös hajottaa vitamiineja, ja vitamiinien erotus muista yhdisteistä vaatii toisenlaista käsittelyä.

#### 5.1.2 Happohydrolyysi

Happohydrolyysissä hajotetaan proteiinit ja sokerit vetykloridihapolla. Menetelmä on nopea ja yksinkertainen, mutta fosfaattiryhmiä ei voida erottaa vitamiineista. Happohydrolyysi on myös ”raju” menetelmä ja se saattaa hajottaa B-vitamiineja. Happohydrolyysi on kuitenkin yleisesti käytössä ja se yhdistetään usein entsyymikäsittelyyn.

### 5.1.3 Entsyymikäsittely

Entsyymikäsittely on puolestaan ”hellä” menetelmä vitamiinien irrottamiseen, mutta se on tyypillisesti hidas menetelmä. Entsyymikäsittely voi kestää jopa 18 tuntia, mutta entsyymit voidaan valita niiden sopivuuden mukaan vapauttamaan kaikki B-vitamiinit matriisista.  $\alpha$ -amylaasia ja  $\beta$ -glukosidaasia käytetään hiilihydraattien hajottamiseen, proteaaseja käytetään proteiinien hajottamiseen ja fosfataaseilla irrotetaan fosfaattiryhmät. Foolihapossa (B9) voi olla sitoutuneena glutamiinihapoista koostuva polyglutamyyliketju, joka pilkotaan  $\gamma$ -glutamyyli-hydrolaasilla (GGH) mono- tai diglutamaatiksi. GGH-entsyymiä käytetään yleensä rotan tai ihmisen seerumista. Entsyymikäsittely soveltuu hyvin vitamiinien vapauttamiseen, mutta proteolyysistä muodostuvat peptidit voivat häiritä detektiota massaspektrometrillä. (Fatima ja muut 2019)

### 5.1.4 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutto perustuu analyyttien pidättymiseen stationaarifaasiin. Kiinteäfaasiuutossa käytetään myös kolonnia tai kasettia, joka on pakattu usein silikapartikkeleilla. Kiinteäfaasiuutto ei tietenkään ole yhtä tehokas kuin HPLC, mutta sitä käytetään analyyttien puhdistamiseen ja konsentraation kasvattamiseen eli väkevöittämiseen. Varsinkin kobalamiinien (B12) pitoisuus on pieni monimutkaisissa matriiseissa, kuten kaloissa (Chatterjee ja muut 2017), joten kiinteäfaasiuutto on usein käytössä näytteiden valmistuksessa (Fatima ja muut 2019). B-vitamiinien puhdistamisessa adsorptiomateriaalina käytetään yleensä OASIS<sup>R</sup> HLB:tä tai vastaavaa. Puhdistuksen parantamiseen voidaan käyttää ”Buckypaper”-nimistä adsorptiomateriaalia, jota käytetään samanaikaisesti HLB-materiaalin kanssa (Pérez-Fernández ja muut 2016). ”Buckypaper” koostuu moniseinäisistä hiilinanoputkista (engl. Multi-Walled Carbon Nanotube), jotka ovat erittäin huokoisia ja spesifisesti adsorptioivia.

## 5.2 Vaihtoehtoisia menetelmiä B-vitamiinien analysointiin.

### 5.2.1 B-vitamiinien analysointi energiajuomista diodirivi- ja fluoresenssidetektorilla

Gliszczynska-Świgło ja Rybicka (2015) analysoivat kofeiinia ja 12 vesiliukoista vitamiinia samanaikaisesti energiajuomista. Vesiliukoiset vitamiinit koostuivat tiamiinista (B1), flaviinimononukleotidista, riboflaviinista (B2), niasiinista, nikotiiniamidista (B3),

pantoteenihaposta (B5), pyridoksaalista, pyridoksiamiinista, pyridoksiinista (B6), foolihaposta (B9) ja syanokobalamiinista (B12) ja C-vitamiinista.

Heidän käyttämänsä laitteisto koostui Waters 600 -nestekromatografista (Waters, Milford), jossa oli Nova-Pak C18 -kolonni (150 mm x 3,9 mm, 5 µm) ja detektoreina diodirivi- ja fluoresenssidetektorit. Stationaarifaasin partikkelikoko oli 5 µm eli kyseessä ei ollut UHPLC-menetelmä, mutta energiajuomien matriisi on suhteellisen yksinkertainen eivätkä näytteet myöskään vaatineet monimutkaista esikäsittelyä. Energiajuomien vitamiinit ovat lisättyjä, joten ne eivät ole sitoutuneena muihin yhdisteisiin. Esikäsittely koostui vain liuenneiden kaasujen poistosta sonikoimalla. Näytteet suojattiin valolta foliolla. Kokonaisuudessaan laitteiston tarkkuus määritettiin kofeiinin, pyridoksiini, hydrokloridin ja nikotiiniamidin varmennetuilla vertailumateriaaleilla (engl. CRM, Certified Reference Material).

Vertailumateriaalien tarkkuuksien keskiarvo oli matalimmillaan 97,2 % pyridoksiinille diodirividetektorilla. Fluoresenssidetektorilla tarkkuus oli 99,4 %. Itse mittauksille määritettiin päivän sisäinen tarkkuus (engl. intraday) ja päivästä päivään (engl. interday) saatu tarkkuus. Mittausten suurin vaihtelukerroin (CV% tai RSD) oli 1,87 %, joka saatiin pyridoksiinille diodirividetektorilla. Työssä käytettyjen ulkoisten standardien korrelaatiokertoimet olivat matalimmillaan 0,997.

Vitamiinit analysoitiin seitsemästä nestemäisestä energiajuomasta, viidestä tablettienergiajuomasta ja kolmesta ravintolisästä. Muiden vitamiinien kvantifiointi onnistui, mutta syanokobalamiinin pitoisuus oli detektorajan alapuolella. Muiden vitamiinien tulokset vastasivat tuoteselosteiden arvoja.

### 5.2.2 B-vitamiinien analysointi kalasta HILIC-erotusmenetelmällä ja massaspektrometrillä

Chatterjee ja muut (2017) analysoivat samanaikaisesti nikotiiniamidia, niasiinia, tiamiinia, pyridoksiinia, riboflaviinia, pantoteenihappoa, biotiinia (B7), foolihappoa ja syanokobalamiinia. Heidän käyttämänsä laitteisto koostui Waters ACQUITY -nestekromatografista, jossa oli Phenomenex HILIC ristiinsidottu dioli-kolonni (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) ja detektorina tandemmassaspektrometri. Työssä käytettiin HILIC-erotusmenetelmää ja massaspektrometrissä käytettiin s-SRM-asetusta. Analysoitavat kalat homogenisoitiin ja käsiteltiin papaiinilla, proteaasilla ja happofosfataasilla. Näytteitä inkuboitiin entsyymeillä neljä tuntia. Varmennettuna vertailumateriaalina käytettiin sian

maksaa, joka käsiteltiin vastaavasti entsyymeillä. Vitamiinistandardien kantaliuokset suojattiin valolta tummilla näyteastioilla.

Menetelmän tarkkuus määritettiin vitamiineilla lisätyillä standardeilla ja varmennetulla vertailumateriaalilla. Katkaravun lihaan lisättiin 50 ng/g ja 100 ng/g B-vitamiinia, joille valmistettiin kuusi rinnakkaista. Standardien tunnetuista pitoisuuksista saatu talteenotto oli matalimmillaan 87,5 % (50 ng/g) ja korkeimmillaan 97,5 % (100 ng/g). Päivän sisäisten mittausten ja usean päivän mittausten suurin vaihtelukerroin (CV%) oli 8,1 50 ng/g -näytteillä. Varmennetusta sian maksasta määritettiin vitamiinien pitoisuus neljän tunnin entsyymikäsitelystä näytteestä ja 18 tunnin käsitelystä näytteestä. Chatterjee ja muut (2017) kehittivät menetelmän neljän tunnin käsittelyllä ja vertailivat sitä tunnettuun 18 tunnin käytäntöön. neljän tunnin käsittelyllä saatiin vastaavat tai vähän suuremmat arvot kuin 18 tunnin käsittelyllä. Sian maksan määritetyt arvot vastasivat varmennettuja arvoja, mutta tiamiinin määritetty arvo oli varmennettua suurempi ja pyridoksiinin pienempi. Pantoteenihapolle, niasiinille ja nikotiiniamidille ei ollut varmennettuja arvoja saatavilla.

Chatterjee ja muut (2017) määrittivät B-vitamiinit makrillista, sardiinista, piikkihaista, katkaravusta ja oka-ahvenesta. He onnistuivat määrittämään yhdeksän B-vitamiinia kaikista lajeista lukuun ottamatta katkaravun tiamiinia ja syanokobalamiinia, joiden arvot olivat detektorajan alapuolella. Tutkijoiden mukaan neljän tunnin entsyymikäsitely soveltuu B-vitamiinien samanaikaiseen analysointiin, mutta kokonaispyridoksiinia ja -foolihappoa ei voida määrittää ja biotiini sekä syanokobalamiini vaativat väkevöittämistä.

### 5.2.3 B-vitamiinien analysointi linssisiemenistä UHPLC-MS/MS-menetelmällä

Zhang ja muut (2021) analysoivat samanaikaisesti 20 B-vitameeria linssisiemenistä. Vitamiinit koostuivat B1:stä, B2:sta, kahdesta B3-vitameerista (nikotiiniamidi, niasiini), B5:stä, neljästä B6-vitameerista (pyridoksamiini, pyridoksiini, pyridoksaali, 4-pyridoksinihappo), B7:stä, kahdeksasta B9-vitameerista (5,10-metenyyli THF, THF, 10-FFA, 5-FTHF, foolihappo, 5-MTHF, 7,8-DHF, 10-FDHF), B12:sta ja 4 $\alpha$ -hydroksi-5-metyylitetrahydrofolaaatin pyrazino-s-triaziini johdannaisesta (B9, MeFox). Käytetty laitteisto koostui Thermo Fisher Vanguish Flex -nestekromatografista, jossa oli Agilent ZORBAX SB-Aq-kolonne (100 mm x 2,1 mm, 1,8  $\mu$ m) ja detektorina tandemmassaspektrometri. Partikkelikoko oli alle 2  $\mu$ m eli kyseessä oli UHPLC-menetelmä, ja massaspektrometrissä oli käytössä SRM-asetus. Zhang ja muut (2021) vertailivat työssään erilaisia kolonneja, ajoliuoksia ja entsyymien yhdistelmiä. Edellä mainittu kolonne soveltui parhaiten 20 B-

vitamiinin analyysiin, ja esikäsitellyssä hyödynnettiin rotan seerumia (GGH), happofosfataasia ja  $\beta$ -glukosidaasia neljän tunnin inkubaatiolla. Tutkijat totesivat, että  $\alpha$ -amylaasin tai proteaasin lisäys ei tehostanut käsittelyä merkittävästi. B-vitamiineja suojattiin hajoamiselta antioksidanteilla ja vähäisellä valolla.

Menetelmän tarkkuus määritettiin kolmella kalibraatiojoukolla: A, B ja C. Kalibraatiojoukot valmistettiin linssisiemenistä, jotka oli hankittu CDC MAXIM -linssikultivaattorilta. Kalibraatiojoukko A valmistettiin vain MES-puskuriin (2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid), kalibraatiojoukko B käsiteltiin puuhiilellä ja kalibraatiojoukko C käsiteltiin työssä käytetyllä esikäsitelymenetelmällä. Puuhiiltä käytettiin työssä poistamaan endogeeniset B-vitamiinit entsyymiliuoksista. Kukin kalibraatiojoukko sisälsi vitamiinikohtaisesti valmistetut matalan, keskisuuren ja suuren pitoisuuden ryhmät. Mittausten tarkkuus (havaittu konsentraatio/nimelliskonsentraatio-%) oli pääasiassa noin 90 % kaikilla vitamiineilla, mutta niasiinia ja 10-FDHF eli B9-vitameeria ei havaittu missään joukossa “matalassa” pitoisuudessa. 4-pyridoksinihappoa, syanokobalamiinia, tiamiinia, pyridoksaalia ja biotiinia ei havaittu joukon C matalassa pitoisuudessa.

Päivän sisäisen ja usean päivän vaihtelukerroin oli pääasiassa alle 20 %, mutta pantoteenihapolle (A, matala), pyridoksinihapolle (A, matala), pyridoksaalille (B, matala), 7,8-DHF:le (C, matala), biotiinille (C, keskisuuri), 10-FDHF:le (C, keskisuuri), syanokobalamiinille (C, matala/suuri), pyridoksamiinille (C, matala) ja foolihapolle (C, matala) vaihtelukerroin oli suurempi kuin 20 %. Sisäisen standardin kanssa matriisivaikutus oli pääasiassa noin 90-110 % eli matriisilla ei ollut merkittävää heikentävää tai voimistavaa vaikutusta. Pyridoksamiinilla, 4-pyridoksinihapolla ja 7,8-DHF:lä oli heikentävä vaikutus ja 10-FDHF:lä oli vahvistava vaikutus. Viisin-kertaisesti laimennetulla matriisilla vaikutus oli kaikilla vitamiineilla noin 87-104 %. Vitamiinien saanto oli noin 41-112 % välillä, mutta 10-FDHF:ää, 4-pyridoksinihappoa, niasiinia, syanokobalamiinia, tiamiinia, pyridoksaalia ja biotiinia ei havaittu.

Zhang ja muut (2021) seurasivat B-vitamiinien määrää linssien siemenissä viiden päivän ajan. B-vitamiinien kokonaismäärän todettiin kasvavan päivien edetessä, mutta biotiinia, syanokobalamiinia, 4-pyridoksinihappoa, 10-FDHF:ää ja 7,8-DHF:ää ei havaittu.

#### 5.2.4 B-vitamiinien analysointi vehnästä UHPLC-MS/MS-menetelmällä

Cao ja muut (2024) analysoivat vehnän jyvistä tiamiinia, riboflaviinia, niasiinia, nikotiiniamidia, pantoteenihappoa, pyridoksiinia, biotiinia, 5-MeTHF:ää (B9) ja 5-CHO-THF:ää (B9). Heidän käyttämänsä laitteisto koostui Waters ACQUITY UPLC - nestekromatografista, jossa oli Waters ACQUITY UPLC HSS T3 kolonni (150 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) ja detektorina tandemmassaspektrometri (s-SRM). Tutkijat vertailivat entsyymejä ja päättivät käyttää proteaasia, happofosfaasia, β-glukosidaasia ja rotan seerumia (GGH) vitamiinien esikäsittelyssä. Kaikki työvaiheet suoritettiin hämärässä valossa.

Menetelmän validoinnissa otettiin huomioon tarkkuus (% bias), täsmällisyys, matriisivaikutus, ionien suhde, talteenotto ja päivän sisäisen vaihtelu. Tarkkuus laskettiin jakamalla lasketun pitoisuuden ja nimellispitoisuuden erotus nimellispitoisuudella eli hyvä tarkkuus on lähellä nollaa. Vitamiineille valmistettiin matalan, keskisuuren ja suuren pitoisuuden näytteet, joista määritettiin täsmällisyys ja vaihtelukertoimet. Tarkkuutta, ionisuhdetta ja talteenottoa varten valmistettiin 1x ja 4x terästetyt näytteet paikallisen kaupan vehnän jyvistä. Sekä tarkkuudet että vaihtelukertoimet olivat alle ±15 %. Lasketut pitoisuudet vastasivat matalissa, keskisuurissa ja korkeissa pitoisuuksissa nimellisarvoa eli täsmällisyys oli hyvä. Ionisuhde määritetään laskemalla fragmentti-ionin ja pääionin pitoisuuksien suhde (%) SRM-massaspektrometriassa. Prosentuaalinen suhde on ominainen tietyille yhdisteille, ja menetelmässä kaikki vitamiinit olivat toleranssirajojen sisäpuolella. Saanto oli 81-118 % kaikilla vitamiineilla. Matriisivaikutus määritettiin matalasta ja korkeasta pitoisuudesta. Kaikkien vitamiinien matriisivaikutus oli 84-115 % välillä.

### 5.3 B-vitamiinien analysointiin liittyviä huomioita ja ongelmia

B-vitamiinien samanaikainen analysointi on parantunut uusien UHPLC-menetelmien avulla, mutta kokonaisvitamiinipitoisuutta on vielä hankala määrittää yhdellä analyysillä. Cao ja muut (2024) analysoivat vehnästä yhdeksän B-vitamiinia hyvällä talteenotolla (81-118 %), kun taas vanhemmilla HPLC-menetelmillä on analysoitu esimerkiksi vain kahta vitamiinia (B1 ja B2) samalla tehokkuudella (86-110 %) (San José Rodriguez ja muut 2012). Edellä käsitellyissä menetelmissä huomataan, että tarkkuus heikkenee, mitä enemmän B-vitamiineja analysoidaan samanaikaisesti. Samalla analysoitavalla matriisilla on suuri vaikutus analyysin onnistumiseen.

Zhangilla ja muilla (2021) oli muuten hyvä tarkkuus 20 vitameerin analysoinnissa, mutta talteenotto vaihteli paljon (41-112 %) ja seitsemää vitameeria ei havaittu pienissä pitoisuuksissa. Gliszczyńska-Świąło ja Rybicka (2015) analysoivat 11 vitameeria energiajuomista suurella tarkkuudella, mutta syanokobalamiinia ei havaittu. Energiajuomat ovat helppoja matriiseja suhteutettuna biologisiin matriiseihin. Energiajuomien B-vitamiinit ovat myös lisättyjä, joten ne ovat pääasiassa vapaassa muodossa. Vitamiinien analysointi onnistuu paremmin helpommista matriiseista, mutta toistuvana ongelmana on kuitenkin syanokobalamiinin havaitseminen. Edellä käsitellyissä artikkeleissa syanokobalamiinia ei havaittu tai edes analysoitu sen pienen pitoisuuden vuoksi.

Monimutkaisemmissa matriiseissa joidenkin vitamiinien määrä on monesti matala ja syanokobalamiini, biotiini ja folaatit jäävät usein detektorin alapuolelle. B-vitamiinien esiintyvyys riippuu matriisista ja yleensä kasveissa syanokobalamiinin pitoisuus on erittäin pieni. Vitamiinit ovat herkkiä valolle, hapettumisella ja lämmölle, ja analysoinnissa on lähes aina otettu huomioon niiden suojaus hajottavilta tekijöiltä. Käsitellyissä menetelmissä vitamiineja suojattiin aina valolta.

Entsyymien käyttöä suositaan vitamiinien vapauttamiseen matriisista. Käytetyt entsyymit riippuvat matriisista, mutta vähintään kolmen entsyymin sekoitus on todettu usein tehokkaimmaksi. Proteaasi, rotan seerumi (GGH),  $\beta$ -glukosidaasi ja varsinkin happofosfataasi ovat usein käytössä. Cao ja muut (2024) sekä Zhang ja muut (2021) totesivat  $\alpha$ -amylaasin olevan turha linssien ja vehnän analysoinnissa. Menetelmien kehittämisessä pyritään tehokkuuteen, helppouteen ja nopeuteen.  $\alpha$ -amylaasi ei tehostanut tutkimuksissa erottamista riittävästi, jotta sitä kannattaisi käyttää. Täytyy huomioida kuitenkin, että sen käyttö muussa matriisissa voi olla eduksi. Entsyymi-inkubaatio on saattanut aiemmin kestää jopa 18 tuntia, mutta käsitellyissä menetelmissä parhain tulos saavutettiin neljän tunnin inkubaation jälkeen. Kiinteäfaasiuuton kaltaisia menetelmiä mahdollisesti tarvittaisiin syanokobalamiinin ja muiden vaikeasti havaittavien vitamiinien erottamiseen. Analysoinnissa tähdätään kuitenkin yksinkertaisuuteen ja viimeaikaisessa artikkelissa viisi B-vitamiinia (B1, B2, B3, B6, B9) analysoitiin ilman vaativaa entsyymikäsittelyä tai kiinteäfaasiuuttoa käyttämällä diodirividetektoria ja tandemmassaspektrometria (Ngwenya ja muut 2025).

## 6 Yhteenveto

Käänteisfaasinestekromatografia yhdistettynä massaspektrometridetektoriin on suosittu erotusmenetelmä B-vitamiinien samanaikaisessa analysoinnissa. Vaikka HILIC soveltuisi mahdollisesti paremmin B-vitamiinien analysointiin, niin silti perinteinen käänteisfaasinestekromatografia on toistaiseksi suositumpi. Se on pitkään ollut pääasiallinen erotusmenetelmä, joten menetelmä on erittäin tuttu. UHPLC mahdollistaa myös tehokkaan erotuskyvyn, minkä takia ei ole nähty erityistä tarvetta siirtyä käänteisfaasinestekromatografiasta HILIC-menetelmiin.

Uusia menetelmiä kehitetään sekä tehokkuuden että helppouden vuoksi. Peräkkäisten massaspektrometrien käyttö detektorina on suosittua juuri siksi, että ne kykenevät tarkasti havaitsemaan kaikki B-vitamiinit. s-SRM-asetuksella B-vitamiinit voidaan myös tarkasti havaita eluoitumishetkellä, mikä helpottaa useamman vitamiinin havaitsemista analyysin aikana. Useamman detektorin peräkkäinen käyttö ei välttämättä monimutkaista analyysiä, mutta kaikissa laboratorioissa ei välttämättä ole useaa detektoria yhtä analyysiä varten. Massaspektrometrin liittäminen toiseen detektoriin voisi tehostaa B-vitamiinien analyysiä.

Itse B-vitamiinien samanaikaisessa analyysissä pitää kiinnittää huomiota näytteiden esikäsittelyyn ja suojaukseen. Entsyymikäsittely on suhteellisen tehokas ja nykyään nopea menetelmä vitamiinien vapauttamiseen matriisista. Inkubointi voi kestää nykyään vain neljä tuntia toisin kuin aiemmissa menetelmissä käytetty 18 tunnin inkubaatio. Yksinkertaisemmat suodattamiset ja uutot olisivat merkittävästi nopeampia, mutta analysoitavien vitamiinien määrän kasvaessa nämä menetelmät eivät välttämättä riitä. B-vitamiinien muotoja on monia, biologiset matriisit ovat monimutkaisia ja varsinkin kobalamiini esiintyy erittäin pienissä pitoisuuksissa. Kaikkien B-vitamiinien erottelu vaati monimutkaista käsittelyä ja mahdollisesti puhdistusvaihetta, kuten kiinteäfaasiuuttoa.

Uusilla UHPLC-menetelmillä on kuitenkin onnistuttu kvantifioimaan tarkasti jopa seitsemää B-vitamiinia. Riippuen analysoitavasta matriisista ja käyttötarkoituksesta B-vitameereja voidaan analysoida jopa 10 tai 20. Yksinkertainen matriisi ei tarvitse monimutkaista esikäsittelyä ja B-vitamiinirikkaista matriiseista on mahdollista analysoida suuri osa B-vitameereista. Kehitetyt menetelmät ovat tehokkaita, mutta kaikkien B-vitamiinien täysi analyysi vaatisi lisää kehitystä, useamman detektorin käyttöä tai muuttujien ja materiaalien hienosäätöä.

## Lähteet

- Cao, D., Heughebaert, L., Boffel, L., Stove, C. & van der Straeten, D. (2024) Simultaneous quantification of seven B vitamins from wheat grains using UHPLC-MS/MS. *FOOD CHEMISTRY* **453**.
- Chatterjee, N. S., Kumar, K. A., Ajeeshkumar, K. K., Kumari, K. R. R., Vishnu, K. V., Anandan, R., ... Ravishankar, C. N. (2017) Screening Natural Content of Water-Soluble B Vitamins in Fish: Enzymatic Extraction, HILIC Separation, and Tandem Mass Spectrometric Determination. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **100**:579–585.
- Fatima, Z., Jin, X., Zou, Y., Kaw, H. Y., Quinto, M. & Li, D. (2019) Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A* **1606**:360245.
- Gliszczyńska-Świągło, A. & Rybicka, I. (2015) Simultaneous Determination of Caffeine and Water-Soluble Vitamins in Energy Drinks by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Food Anal Methods* **8**:139–146.
- Hanna, M., Jaqua, E., Nguyen, V. & Clay, J. (2022) B Vitamins: Functions and Uses in Medicine. *Perm J* **26**:89–97.
- Kartsova, L. A., Bessonova, E. A. & Somova, V. D. (2019) Hydrophilic Interaction Chromatography. *J Anal Chem* **74**:415–424.
- Kumar SD and Kumar HDR: Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development- A Review: A Review. *Int J Pharm Sci Res.* 3(12); 4626-4633.
- Liddicoat, C., Hucker, B., Liang, H. & Vriesekoop, F. (2015) Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC. *Food Chemistry* **177**:325–329.
- Ngwenya, N., Nuapia, Y., Risenga, I., Morifi, E. & Chimuka, L. (2025) Development of a UHPLC-DAD-qTOFMS method for the simultaneous quantification of five water-soluble B-vitamins in *Moringa oleifera*. *South African Journal of Botany* **177**:92–99.
- Pérez-Fernández, V., Gentili, A., Martinelli, A., Caretti, F. & Curini, R. (2016) Evaluation of oxidized buckypaper as material for the solid phase extraction of cobalamins from milk: Its efficacy as individual and support sorbent of a hydrophilic–lipophilic balance copolymer. *Journal of Chromatography A* **1428**:255–266.
- San José Rodriguez, R., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. & Sánchez-Mata, M. C. (2012) Simultaneous determination of vitamin B1 and B2 in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science* **55**:293–299.

