

ISSN 0355-1180

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

EKT-sarja 1841

B₁₂-VITAMIINI ELÄINPERÄISISSÄ ELINTARVIKKEISSA

Heidi Lehtonen

Helsinki 2018

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen		Laitos/Institution– Department Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto	
Tekijä/Författare – Author Heidi Lehtonen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title B ₁₂ -vitamiini eläinperäisissä elintarvikkeissa			
Oppiaine /Läroämne – Subject Elintarvikekemia			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterin tutkielma	Aika/Datum – Month and year Toukokuu 2018	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 62	
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>B₁₂-vitamiini on rakenteeltaan monimutkainen, vesiliukoinen kompleksiyhdiste. Ihmisille aktiivisessa B₁₂-vitamiinin muodossa alempana ligandina on 5,6-dimetyyllibentsimidatsoli. B₁₂-vitamiinia saadaan eläinperäisistä elintarvikkeista. Tämän tutkielman kirjallisuusosio käsitteli B₁₂-vitamiinin rakennetta, vitamiiniaktiivisuutta, ruokavalion vaikutusta saantiin ja imeytymisen vaiheita ihmisen elimistössä. Sen lisäksi käsiteltiin B₁₂-vitamiinin analytiikkaa ja pitoisuuksia elintarvikkeissa.</p> <p>Useissa tutkimuksissa B₁₂-vitamiinia on määritetty mikrobiologisella menetelmällä. Menetelmän epäillään nykyisin vääristävän B₁₂-vitamiinipitoisuuksia, koska menetelmässä käytetty testiorganismi reagoi positiivisesti myös B₁₂-vitamiinin kaltaisiin muihin korrinoidiyhdisteisiin. Tämän tutkielman kokeellisen osion tavoitteena oli tutkia kuinka paljon eläinperäiset elintarvikkeet sisältävät B₁₂-vitamiinia. Tutkimukseen valittiin keskeisiä eläinperäisiä elintarvikkeita sekä kaksi elintarvikkeeksi hyväksyttyä hyönteislajia. Tavoitteena oli myös verrata toisiinsa mikrobiologista ja erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografista (UHPLC) menetelmää B₁₂-vitamiinin määrittämisessä sekä tutkia eri uuttomenetelmien vaikutusta analysoituihin B₁₂-vitamiinipitoisuuksiin.</p> <p>Uuttokokeiden tulosten perusteella kaikille näytteille ei voitu käyttää samaa esikäsitelymenetelmää. Uutto pepsiinikäsittelyllä paransi määritettyä B₁₂-vitamiinipitoisuutta kirjolohella, keltuaisella, naudan sisäpaistilla ja maidolla, kun taas pankreatiinikäsittely paransi määritettyä B₁₂-vitamiinipitoisuutta juustoilla ja silakalla. Elintarvikkeista odotetusti eniten B₁₂-vitamiinia oli naudan ja porsaan maksan lisäksi silakassa, juustoissa ja naudan sisäpaistissa. Vähiten B₁₂-vitamiinia oli broilerin rintafileeissä. Mikrobiologisella ja UHPLC-menetelmällä määritetyissä B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa oli merkittävä ero menetelmien välillä. Liha- ja kalanäytteiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat 7–64 % pienempiä UHPLC-menetelmällä kuin mikrobiologisella menetelmällä määritettynä, maitotuotteilla ja keltuaisella 20–67 % pienempiä ja myös hyönteisillä eroa oli 71–81 %. Mikrobiologinen menetelmä on herkkä ja edullinen käyttää. Jatkossa elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuus kannattaa kuitenkin määrittää UHPLC-menetelmällä, joka erottaa ihmiselle aktiivisen B₁₂-vitamiinin muodon muista ei-aktiivisista muodoista eikä anna vastetta muille B₁₂-vitamiinin kaltaisille yhdisteille.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Elintarvike, B ₁₂ -vitamiini, esikäsitely, mikrobiologinen, UHPLC			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT-sarja 1841			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution– Department Department of Food and Nutrition	
Tekijä/Författare – Author Heidi Lehtonen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Vitamin B ₁₂ in foods of animal origin			
Oppiaine /Läroämne – Subject Food Chemistry			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis	Aika/Datum – Month and year May 2018	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 62	
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Vitamin B₁₂ is a water-soluble molecule with a complex structure. In the active form to humans B₁₂ has to have 5,6-dimethylbenzimidazole as a lower ligand. B₁₂ is synthesised only by certain bacteria and natural sources in the human diet are restricted mainly to foods of animal origin. The exact structure of B₁₂ and vitamin activity, the supply from different diets and absorption in the body were discussed in the literature part of this thesis. Also B₁₂ determination methods and B₁₂ levels in foods of animal origin were discussed.</p> <p>Usually vitamin B₁₂ contents in foods have been obtained with a microbiological method (MBA). Currently it has been of concern that MBA may overestimate results because test organism in the MBA method reacts also to compounds similar to B₁₂. The aim of the experimental part of this thesis was to investigate content of vitamin B₁₂ in foods of animal origin. Further, two determination methods, MBA and ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), were compared with each other. The aim was also to examine the effect of different extraction methods on the yield of vitamin B₁₂. The samples chosen to this study were beef, pork meat, chicken meat, beef and pork liver, rainbow trout, Baltic herring, egg, skim milk, yogurt and Edam and Emmental cheese. Also two insects, cricket and mealworm, were chosen to this study.</p> <p>The extraction tests showed that it was not possible to use one extraction method to all samples. Extraction with pepsin improved the yield of vitamin B₁₂ in rainbow trout, egg yolk, beef and milk whereas pancreatin improved the yield in cheeses and Baltic herring. As expected B₁₂ content was the highest in livers of beef and pork. Also beef, Baltic herring and cheeses had high concentrations of B₁₂. Chicken meat contained the lowest concentration of B₁₂. Comparison between the MBA and the UHPLC method proved that with MBA the vitamin B₁₂ concentrations were much higher than with UHPLC. B₁₂ concentrations with UHPLC were 7–64% lower in meat and fish samples. Milk products and egg yolk had 20–67% lower B₁₂ concentrations with UHPLC and insects had 71–81% lower concentrations. MBA method is sensitive and has low reagent costs but in the future UHPLC method should be chosen for B₁₂ analysis because it can separate the active B₁₂ form from the inactive forms.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Vitamin B ₁₂ , food, extraction, MBA, UHPLC			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT series 1841			

ESIPUHE

Tämän maisterintutkielman kokeellinen osuus suoritettiin Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla syksyn 2016 ja kevään 2017 aikana. Tutkimus liittyi osastolla tehtävään B₁₂-vitamiinitutkimukseen. Tutkielman ohjaajana oli ETT Minnamari Edelmann ja vastuuproffessorina oli Vieno Piironen. Suuret kiitokset ohjaajalleni Minnamarille asiantuntevasta, kärsivällisestä ja määrätietoisesta ohjaamistyöstä. Minnamarin apu oli täysin korvaamatonta tutkielman etenemisessä. Kiitos ETT Bhawani Chamlagainille avusta uutto- ja nestekromatografisen menetelmän kanssa. Kiitos myös osaston muulle henkilökunnalle neuvoista ja hyvästä työskentelyilmapiiristä tutkielman kokeellisen osan aikana. Lisäksi haluan lämpimästi kiittää vanhempiani tuesta ja kannustuksesta koko opiskeluiden ajan. Heidän avullaan sain toteuttaa unelmani ja opiskella farmasian opintojen jälkeen vielä elintarviketieteitä. Lämmin kiitos myös poikaystävälleni kaikesta tuesta tutkielman teon aikana.

Helsinki, Huhtikuu 2018

Heidi Lehtonen

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ
ABSTRACT
ESIPUHE

1	JOHDANTO	7
2	KIRJALLISUUSOSA	8
2.1	B ₁₂ -vitamiinin kemia	8
2.1.1	Rakenne	8
2.1.2	Vitamiiniaktiivisuus	10
2.2	B ₁₂ -vitamiinin saanti ja imeytyminen	11
2.2.1	Saantisuosituksien ja ruokavalion vaikutus B ₁₂ -vitamiinin saantiin	11
2.2.2	B ₁₂ -vitamiinin imeytymisen vaiheet	13
2.3	B ₁₂ -vitamiinin määrittäminen elintarvikkeista	15
2.3.1	Uutto	15
2.3.2	Mikrobiologinen menetelmä (MBA)	16
2.3.3	Nestekromatografiset menetelmät	18
2.3.4	Muut menetelmät	20
2.4	B ₁₂ -vitamiini elintarvikkeissa	21
2.4.1	Liha	21
2.4.2	Kala	23
2.4.3	Kananmuna	24
2.4.4	Maitotuotteet	24
3	KOKEELLINEN TUTKIMUS	26
3.1	Materiaalit ja menetelmät	26
3.1.1	Näytteet ja näytteiden esikäsittely	26
3.1.2	Määrityksissä käytetyt reagenssit ja laitteet	28
3.1.3	Uuttomenetelmän valinta esikokeilla	29
3.1.4	Näytteen uutto ja entsyymikäsittely	30
3.1.5	B ₁₂ -vitamiinin mikrobiologinen määritysmenetelmä	31
3.1.6	B ₁₂ -vitamiinin määrittäminen UHPLC-menetelmällä	31
3.1.6.1	Näytteen puhdistus ja konsentrointi ennen UHPLC-määrittämistä	31
3.1.6.2	UHPLC-määrittäminen	32
3.1.7	Tulosten laskeminen	33
3.1.8	Tulosten oikeellisuus	33
3.2	Tulokset	34
3.2.1	Esikokeet mikrobiologisella menetelmällä	34

3.2.2	Näytteiden B ₁₂ -vitamiinipitoisuudet	36
3.2.2.1	Liha ja kala	36
3.2.2.2	Maitotuotteet ja kananmuna	38
3.2.2.3	Hyönteiset	40
3.3	Pohdinta	41
3.3.1	Esikokeiden hyödyllisyys	41
3.3.2	Elintarvikkeiden B ₁₂ -vitamiinipitoisuudet eri elintarvikeryhmissä	43
3.3.2.1	Liha ja kala	43
3.3.2.2	Maitotuotteet ja kananmuna	48
3.3.2.3	Hyönteiset	51
3.3.2.4	Uutto- ja määritysmenetelmän valinta B ₁₂ -vitamiinin määrittämisessä	52
4	PÄÄTELMÄT	54
	LÄHDELUETTELO	56

LIITTEET

Liite 1. Näytteiden ostopaikat

Liite 2. Mikrobiologisen määrityksen valvontakortti

Liite 3. Näytteiden kosteuspitoisuudet

1 JOHDANTO

B₁₂-vitamiini on vitamiineista rakenteeltaan kaikkein monimutkaisin (Truswell 2007). Se on kompleksiyhdiste, jossa keskusatomi, koboltti, on sitoutunut neljän pyrrolirenkaan tyypiatomeihin ja sen lisäksi alempaan ja ylempään ligandiin (Ball 2006). B₁₂-vitamiini on ihmiselle välttämätön vesiliukoinen vitamiini ja sen ihmiselle aktiivisessa muodossa alempana ligandina on 5,6-dimetyylibentsimidatsoli (Ball 2006; O'Leary ja Samman 2010). Ylempänä ligandina on useimmiten adenosyyli-, metyyli-, hydroksi- tai syanoryhmä (Ball 2006). Ylemmän ligandin ollessa adenosyyli tai metyyli, kyseessä ovat adenosyyli- ja metyylikobalamiini, joita molempia tarvitaan elimistön entsyymaattisissa reaktioissa. B₁₂-vitamiinin kaltaisia korrinoidiyhdisteitä on monia, mutta niissä kobolttiin sitoutuneen alemman ligandin rakenne vaihtelee (Crofts ym. 2013). Yksi tunnetuimmista B₁₂-vitamiinin ihmiselle inaktiivisista muodoista on adeniinin alempana ligandina sisältävä pseudo-B₁₂-vitamiini (Santos ym. 2007).

B₁₂-vitamiinia pystyy tuottamaan vain tietyt mikrobit, joita on esimerkiksi märehitijöiden ruuansulatuskanavassa (Burgess ym. 2009). Märehitijöiden maito, liha ja varsinkin maksa sisältävät paljon B₁₂-vitamiinia. Myös muista eläinperäisistä elintarvikkeista on mahdollista saada B₁₂-vitamiinia, koska eläimet saavat B₁₂-vitamiinia myös ruokinnan yhteydessä rehun mukana. Kasvipärisissä elintarvikkeissa on B₁₂-vitamiinia yleensä vain hyvin vähäisiä määriä mahdollisesta mikrobikontaminaatiosta johtuen. B₁₂-vitamiinin saantisuositus miehille ja naisille on Suomessa 2 µg vuorokaudessa ja ihmiset saavat tämän yleensä eläinperäisistä elintarvikkeista (Burgess ym. 2009; Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Erilaisia kasvisruokavalioita noudattavilla ja varsinkin vegaaneilla on suurin vaara kärsiä B₁₂-vitamiinin puutoksesta (Herrmann ym. 2003; Pawlak ym. 2014). Myös erilaisista ruuansulatuskanavan häiriöistä kärsivillä B₁₂-vitamiinin puutos on todennäköisempi vitamiinin monivaiheisen imeytymisen takia (Nielsen ym. 2012). Puutosoireet, kuten neuropatia ja megaloblastinen anemia, johtuvat entsyymitoiminnan häiriöistä B₁₂-vitamiinin puuttuessa (O'Leary ja Samman 2010).

Tutkimuksia eläinperäisten elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksista löytyy vähän ja näissä tutkimuksissa on keskitytty usein vain yhteen elintarvikeryhmään. Aikaisemmissa tutkimuksissa naudanlihan B₁₂-vitamiinipitoisuus on ollut huomattavasti suurempi kuin broilerin tai porsaanlihan (Watanabe ym. 1998; Guggisberg ym. 2012; Czerwonka ym. 2014). Kalojen B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa on ollut jonkin verran vaihtelevuutta kalalajien

ja kasvatettujen ja villikalajien välillä (Nettleton ja Exler 1992). Maitotuotteissa on havaittu paljon pienempiä B₁₂-vitamiinipitoisuuksia kuin lihoissa ja kaloissa (Arkbåge ym. 2003). Juustoissa B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat olleet yleensä suuremmat kuin jogurtissa ja maidossa. Elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuutta on tutkittu pääasiassa mikrobiologisella, mutta nykyisin myös nestekromatografisilla menetelmillä (Kelleher ja Broin 1991; Guggisberg ym. 2012). Mikrobiologisen menetelmän on kuitenkin epäilty vääristävän B₁₂-vitamiinipitoisuuksia, koska menetelmässä käytetty testiorganismi käyttää kasvuunsa myös B₁₂-vitamiinin kaltaisia korrinoidiyhdisteitä tai korrinoidirakenteeltaan epätäydellisiä yhdisteitä (Watanabe ja Bito 2018).

B₁₂-vitamiini on elintarvikkeissa sitoutunut usein proteiineihin, joten B₁₂-vitamiinin määrittämiseen tarvitaan myös näytteiden esikäsittelyä (Ball 2006). Tähän on käytetty yleensä erilaisia uuttomenetelmiä (Denton ja Kellogg 1953; Campos-Gimenéz ym. 2008). Uuttoon on myös tarvittaessa yhdistetty entsyymikäsittely B₁₂-vitamiinin vapauttamisen varmistamiseksi (Arkbåge ym. 2003; Guggisberg ym. 2012). Tutkimukset on tehty tietyllä elintarvikeryhmällä, kuten esimerkiksi lihatuotteilla, joten varmuutta saman uutto- ja entsyymikäsittelyn sopivuudesta erilaisille elintarvikeryhmille ei löydy kirjallisuudesta.

Tämän tutkimuksen kirjallisuusosa käsitteli B₁₂-vitamiinin rakennetta, vitamiiniaktiivisuutta, saantia ja imeytymistä ja B₁₂-vitamiinin määrittämenetelmiä. Lisäksi kirjallisuusosassa selvitettiin aikaisempien tutkimusten perusteella eläinperäisten elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksia. Kokeellisen osan tavoitteena oli tutkia eläinperäisten elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksia käyttäen sekä mikrobiologista että nestekromatografista menetelmää. Sen lisäksi tutkittiin esikäsittelymenetelmän vaikutusta määritettyihin B₁₂-vitamiinipitoisuuksiin.

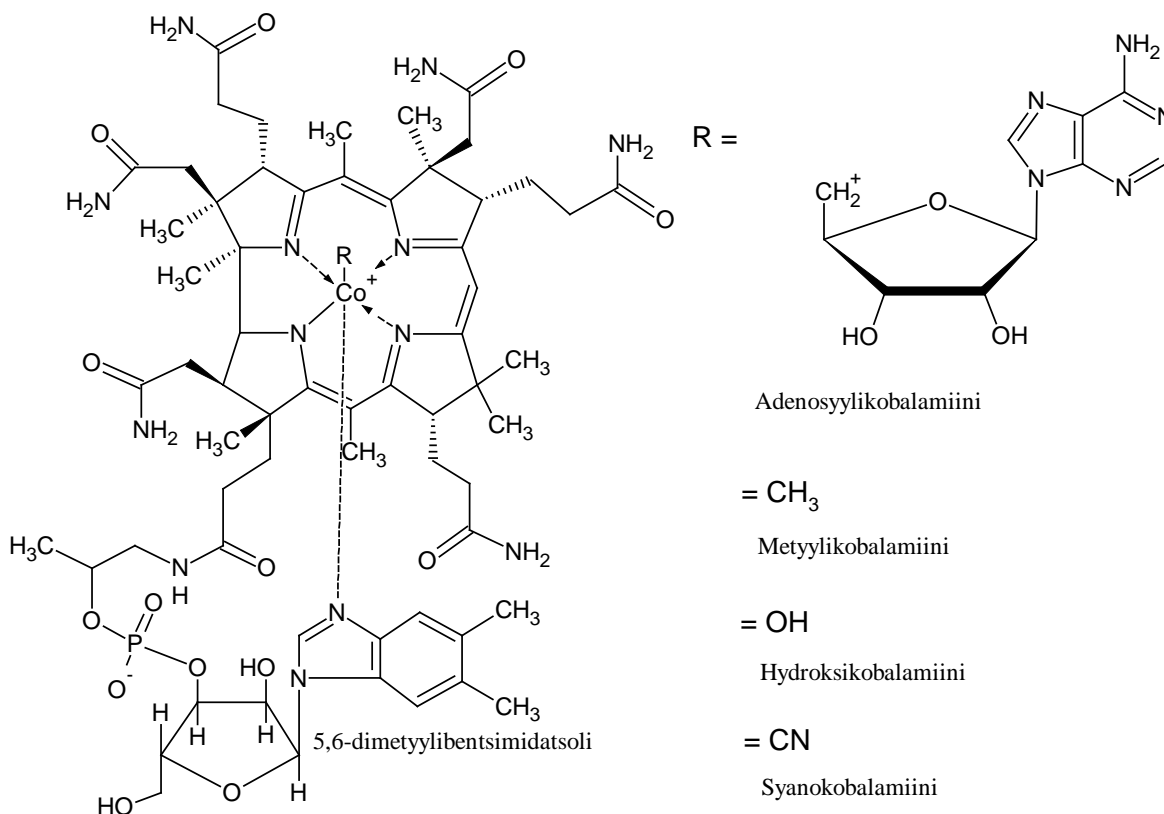
2 KIRJALLISUUSOSA

2.1 B₁₂-vitamiinin kemia

2.1.1 Rakenne

B₁₂-vitamiini on kompleksiyhdiste, jonka keskusatomina on koboltti (Ball 2006). B₁₂-vitamiinimolekyylin perusyksikkö korriinirengas koostuu neljästä pyrrolirengaasta, joiden

typpiatomiin koboltti on sitoutunut (kuva 1). Koboltti on sitoutunut näiden typpiatomien lisäksi alempaan ligandiin, 5,6-dimetyylilibentsimidatsoliin, ja ylempään ligandiin, joka on yleensä metyyli-, adenosyyli-, hydroksi- tai syanoryhmä.



Kuva 1. B₁₂-vitamiinin rakenne, jossa alempana ligandina on 5,6-dimetyylilibentsimidatsoli ja ylempänä ligandina adenosyyli-, metyyli-, hydroksi- tai syanoryhmä.

Jos ylempänä ligandina on metyyli-ryhmä, kyse on metyylikobalamiinista (Ball 2006). Jos taas ylempi ligandi on adenosyyli-ryhmä, kyseessä on adenosyylikobalamiini. Näitä kahta muotoa tarvitaan elimistön entsyymaattisiin reaktioihin. Adenosyyli- tai metyylikobalamiinia on kuitenkin vaikea eristää puhtaana, koska ne muuttuvat helposti hydroksikobalamiiniksi, esimerkiksi valon vaikutuksesta (Marley ym. 2009; Juzeniene ja Nizauskaite 2013). Syanokobalamiinissa alempana ligandina on syanoryhmä (Ball 2006). Se on adenosyyli- ja metyylikobalamiinista johdettu synteettinen muoto. Syanokobalamiinia käytetään elintarvikkeiden vitamiinointiin ja vitamiinivalmisteissa. Lisäksi luonnossa voi esiintyä hyvin pieniä määriä syanokobalamiinia (Sych ym. 2016; Paul ja Brady 2017). Sitä voi syntyä esimerkiksi tupakanpolton yhteydessä.

2.1.2 Vitamiiniaktiivisuus

B₁₂-vitamiinin muodoista elimistö tarvitsee adenosyyli- ja metyylikobalamiinia entsyymaattisissa reaktioissa (Truswell 2007). Metyylikobalamiinia tarvitaan metioniinisyntaasin kofaktoriksi, jotta entsyymi voi toimia. Esimerkiksi solulimassa metioniinisyntaasi metyloi homokysteiniä, jolloin muodostuu metioniinia (Sych ym. 2016). Tämä reaktio on riippuvainen myös folaatin saannista, koska metyyli-ryhmä siirretään 5-metyylitetrahydrofolaatilta homokysteiniin rakenteeseen. Jäljelle jäänyttä tetrahydrofolaattia tarvitaan esimerkiksi DNA:n rakenteessa olevien puriinien ja pyrimidiinien synteesiin, joten B₁₂-vitamiini on tärkeä myös DNA:n muodostuksessa. Tämän lisäksi metioniinisyntaasia tarvitaan monissa muissa elimistön metylointireaktioissa ja B₁₂-vitamiinin puuttuessa entsyymien toimimattomuus voi johtaa erilaisiin puutosoireisiin.

Adenosyylikobalamiini on kofaktori metyyli-malonyyli-koentsyymi-A-mutaasille (Truswell 2007). Tämä entsyymi katalysoi reaktiota, jossa *L*-metyli-malonyyli-koentsyymi-A muutetaan sukkinyyli-koentsyymi-A:ksi mitokondriossa (Sych ym. 2016). Reaktio on välivaihe aminohappojen, rasvahappojen ja kolesterolin kataboliassa eli hajotuksessa ja B₁₂-vitamiinin puute voi johtaa esimerkiksi metyyli-malonyyli-hapon kertymiseen elimistössä. Vaikka elimistö tarvitseekin vain kahta B₁₂-vitamiinin muotoa, adenosyyli- ja metyylikobalamiinia, erilaisiin entsyymaattisiin reaktioihin, niin myös hydroksi- ja syanokobalamiinilla voidaan varmistaa riittävä B₁₂-vitamiinin saanti (Obeid ym. 2015). Hydroksi- ja syanokobalamiini imeytyvät yhtä hyvin kuin adenosyyli- ja metyylikobalamiini. Soluissa kaikista B₁₂-vitamiinin aktiivisista muodoista (metyyli-, adenosyyli-, hydroksi- ja syanokobalamiinista) poistetaan ylempi ligandi, jolloin jäljelle jää niin sanottu kobalamiinimolekyyliydin (Paul ja Brady 2017). Elimistö muuttaa kobalamiinimolekyylin entsyymaattisesti aktiiviseksi B₁₂-vitamiiniksi solulimassa muuntamalla rakenteen metyylikobalamiiniksi tai mitokondriossa muuntamalla rakenteen adenosyylikobalamiiniksi.

Metyyli-, adenosyyli-, hydroksi- ja syanokobalamiinien lisäksi on myös muita yhdisteitä, joilla on samanlainen korriinirengasrakenne, mutta kobolttiin sitoutuneen alemman ligandin rakenne vaihtelee (Crofts ym. 2013). Ihmisille aktiivisen B₁₂-vitamiinin pitää sisältää kuitenkin 5,6-dimetyylibentsimidatsoli alempana ligandina, koska B₁₂-vitamiinin imeytymiseen osallistuva kuljetusproteiini, sisäinen tekijä, tunnistaa vain 5,6-

dimetyylibentsimidatsolin sisältämän rakenteen B₁₂-vitamiiniksi (Stupperich ja Nexø 1991; Stabler 2012). Bakteerit pystyvät käyttämään metaboliassaan myös muita, ihmiselle inaktiivisia, B₁₂-vitamiinin muotoja (Crofts ym. 2013). Alempana ligandina näissä ihmiselle inaktiivisissa muodoissa voi olla esimerkiksi fenolisia yhdisteitä, puriineja tai muita bentsimidatsoleja. Yksi B₁₂-vitamiinin hyvin tunnettu ihmiselle inaktiivinen muoto on pseudo-B₁₂-vitamiini, jossa alempana ligandina on adeniini (Santos ym. 2007).

2.2 B₁₂-vitamiinin saanti ja imeytyminen

2.2.1 Saantisuositukset ja ruokavalion vaikutus B₁₂-vitamiinin saantiin

B₁₂-vitamiinia tuottavat vain tietyt bakteerit ja arkit (Burgess ym. 2009). Ihmisen suolistossa B₁₂-vitamiinin tuotanto on hyvin vähäistä ja B₁₂-vitamiinia tuottavia mikrobeja on vain paksusuolella, josta B₁₂-vitamiini ei enää voi imeytyä (Paul ja Brady 2017). Ihmisen onkin saatava B₁₂-vitamiini ravinnosta (Burgess ym. 2009). Märehtijöiden ruuansulatuskanavassa on B₁₂-vitamiinia tuottavia mikrobeja, joten näiden eläinten maito, liha ja varsinkin maksa sisältävät paljon B₁₂-vitamiinia. Myös muista eläinperäisistä elintarvikkeista saadaan B₁₂-vitamiinia, koska eläimiä ruokitaan vitamiineja sisältävällä rehulla. Kasvit ja sienet eivät tarvitse metaboliassaan B₁₂-vitamiinia, eivätkä siten tuota sitä. Kasvipärisissä elintarvikkeissa voi silti esiintyä B₁₂-vitamiinia vähäisiä määriä mikrobikontaminaation seurauksena ja kasvipärisiin elintarvikkeisiin voidaan myös lisätä B₁₂-vitamiinia (Burgess ym. 2009; Paul ja Brady 2017).

Ruokavaliolla on merkittävä vaikutus B₁₂-vitamiinin saantiin, koska suurin osa B₁₂-vitamiinista saadaan eläinperäisistä elintarvikkeista (Pawlak ym. 2014). Täysin vegaanista ruokavaliota noudattavilla on vaarana kärsiä B₁₂-vitamiinin puutoksesta. Kun verrataan vegaanien, laktovegaanien tai lakto-ovovegaanien ja sekaravintoa syövien B₁₂-vitamiinin saantia, niin kaikkein vähiten B₁₂-vitamiinia saavat vegaanit, jos he eivät käytä B₁₂-vitamiinilisää ruuan lisäksi (Herrmann ym. 2003; Pawlak ym. 2014). Laktovegetaarista tai lakto-ovovegetaarista ruokavaliota noudattavilla B₁₂-vitamiinin saanti on jo jonkin verran parempi kuin vegetaarista ruokavaliota noudattavilla, mutta kuitenkin huonompi kuin sekaravintoa syövillä. Herrmann ym. (2003) totesivatkin, että vegaaneille B₁₂-vitamiinilisän käyttäminen olisi erittäin tärkeää ja myös säännöllinen veren B₁₂-vitamiinipitoisuuden seuranta olisi tarpeellinen. Iso-Britanniassa tehdyssä tutkimuksessa on arvioitu, että vegaaneilla B₁₂-vitamiinin päivittäinen saanti on vain noin 0,4 µg ja lakto-

ovovegaaneilla 2,6 µg, kun taas kalaa syöville lakto-ovovegaaneilla päivittäinen saanti on jo 5,0 µg ja sekaravintoa syöville 7,2 µg (Davey ym. 2003). Suomessa B₁₂-vitamiinin saantisuositus naisille ja miehille on 2 µg/vrk, joten vegaanista ruokavaliota lukuun ottamatta ravinnosta on mahdollista saada riittävä määrä B₁₂-vitamiinia (Davey ym. 2003; Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014).

Myös kerralla saadulla B₁₂-vitamiinin määrällä on vaikutusta siihen, kuinka paljon B₁₂-vitamiinista imeytyy elimistöön (Adams ym. 1971). Useiden tutkimusten perusteella on havaittu, että B₁₂-vitamiinin määrän ollessa vitamiinilisänä nautittuna 0,5 µg tai vähemmän noin 70 % annoksesta imeytyy (Herbert 1987). Kun annos suurenee 5 µg:aan, niin määrästä imeytyy enää keskimäärin 28 %. Jos annos suurenee edelleen, imeytyminen huononee. 10 µg:n annoksella imeytyminen on enää noin 16 %. Suurella kerta-annoksella, 100 µg tai enemmän, annoksesta imeytyy vain hyvin pieni määrä, noin 1 %.

Annoksen lisäksi imeytymiseen vaikuttaa myös B₁₂-vitamiinin lähde (Heyssel ym. 1966). Heyssel ym. (1966) havaitsivat, että lampaanlihan B₁₂-vitamiinista imeytyi keskimäärin 65 %. Nuorilla koehenkilöillä lampaan maksasta imeytyi B₁₂-vitamiinia 5–20 %, kun taas iäkkäämmillä koehenkilöillä vain 2–6 %. Doscherholmen ym. (1981) tutkivat B₁₂-vitamiinin imeytymistä kirjolohesta ja broilerin lihasta. He havaitsivat, että B₁₂-vitamiinista imeytyi 100 g:n kerta-annoksesta kirjolohta vain 33–47 %, mutta broilerin lihasta jopa 58–74 %. Maidon B₁₂-vitamiinista imeytyi keskimäärin 65 % yli 60-vuotiailla koehenkilöillä Russelin ym. (2001) tutkimuksessa. Kananmunasta B₁₂-vitamiinin imeytyminen oli 24–36 % koehenkilöstä riippuen (Doscherholmen ym. 1975).

Imeytymiskokeissa on tutkittu myös suun kautta annetun syanokobalamiinin vesiliuoksen imeytymistä (Doscherholmen ym. 1975). Kontrolliryhmä sai saman määrän syanokobalamiiniliuosta kuin koehenkilöiden saama ruokanäyte sisälsi B₁₂-vitamiinia. Tutkimuksessa havaittiin, että kananmunasta B₁₂-vitamiini imeytyi huonommin kuin sama määrä puhdasta B₁₂-vitamiinia. Tässä tutkimuksessa ei selvinnyt syytä huonompaan imeytymiseen, mutta Levine ja Doscherholmen (1983) havaitsivat kananmunan sisältävän proteiineja, kobalafiliinejä (cobalaphilins), jotka estivät B₁₂-vitamiinin imeytymistä kananmunan keltuaisesta ja valkuaisesta. Keltuaisen ja valkuaisen kuumennuskäsittely vähensi proteiinien B₁₂-vitamiinin imeytymistä estävää vaikutusta. Ennen näiden B₁₂-vitamiinin imeytymistä estävien proteiinien löytymistä kananmunan valkuaisen tiedettiin sisältävän avidiinia, joka estää biotiinin imeytymistä.

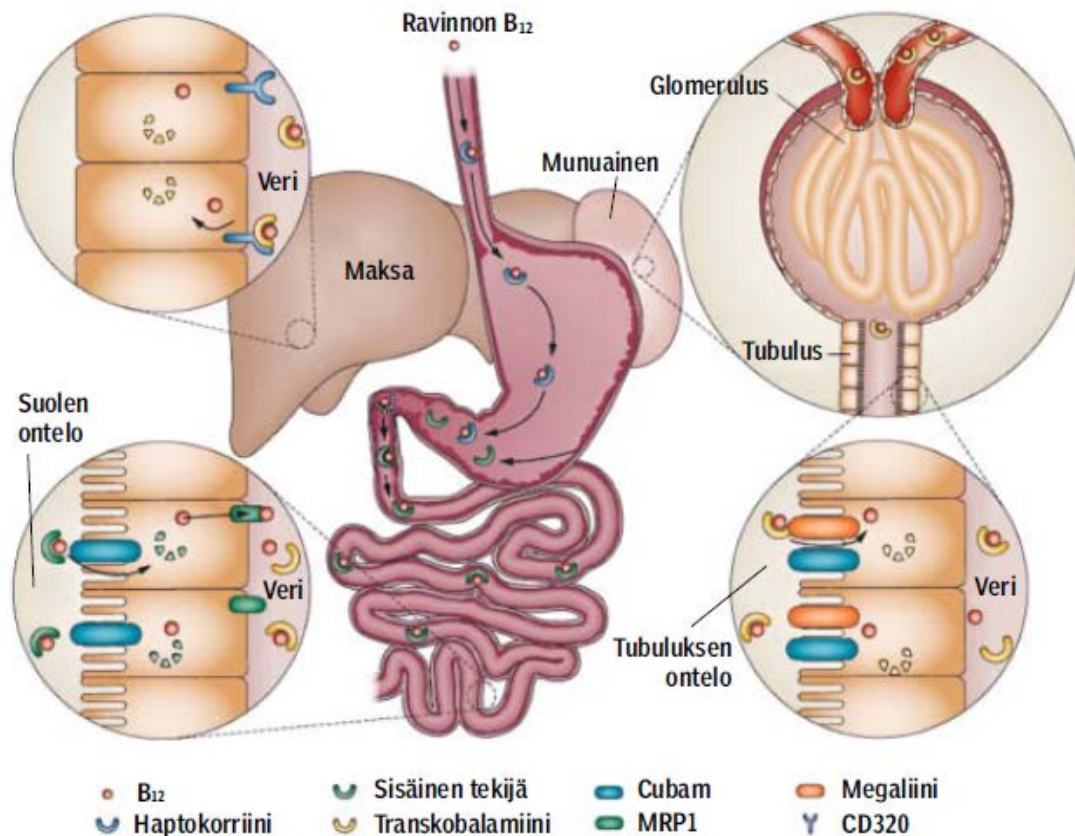
2.2.2 B₁₂-vitamiinin imeytymisen vaiheet

B₁₂-vitamiinin kuljetus ruuasta soluihin asti sisältää monta eri vaihetta (kuva 2) (Nielsen ym. 2012). Ensimmäiseksi B₁₂-vitamiini pitää irrottaa ruuan proteiineista, joihin se voi olla sitoutunut (Ball 2006). Tämän jälkeen B₁₂-vitamiini täytyy kuljettaa mahasta ohutsuoleen ja myös ohutsuolessa tarvitaan oma kuljetussysteemi, jotta B₁₂-vitamiini saadaan vietyä ohutsuolen soluihin (Nielsen ym. 2012). Nämä solut huolehtivat B₁₂-vitamiinin ohjauksesta elimistössä eteenpäin, esimerkiksi verenkiertoon.

Proteiineihin sitoutunut B₁₂-vitamiini irrotetaan ruuansulatuskanavan yläosassa mahahappojen ja pepsiini-entsyymien avulla (Kozyraki ja Cases 2013). B₁₂-vitamiinin kuljetuksesta ruuansulatuskanavassa huolehtivat kolme eri proteiinia, sisäinen tekijä, transkobalamiini ja haptokorriini, josta käytetään myös nimiä R-proteiini ja transkobalamiini I (Wuerges ym. 2006; Mathews ym. 2007). Haptokorriinia on syljessä ja mahanesteessä ja se sitoo ruuasta vapautuneen B₁₂-vitamiinin (Quadros 2009). Allenin ym. (1978) mukaan haptokorriini suojelee B₁₂-vitamiinia hydrolyysiltä happamassa mahassa. Haiman entsyymit kuitenkin hajottavat haptokorriinin ohutsuolen alkuosassa, pohjukaissuolessa, jonka jälkeen sisäinen tekijä sitoo vapaan B₁₂-vitamiinin (Allen ym. 1978). Sisäiseen tekijään nämä haiman entsyymit eivät vaikuta. Ohutsuolen loppuosassa, ileumissa, sisäisen tekijän ja B₁₂-vitamiinin muodostama kompleksi kulkeutuu ohutsuolen soluihin endosytoosin avulla ja siihen tarvitaan kubiliini-amnionless-reseptoria (cubam) (Birn ym. 1997; Fyfe ym. 2004).

Solun sisällä lysosomissa sisäisen tekijän ja B₁₂-vitamiinin muodostama kompleksi puretaan sisäistä tekijää hajottavilla entsyymeillä, jonka jälkeen vapaa B₁₂-vitamiini siirtyy solulimaan, josta se saadaan B₁₂-vitamiinia tarvitsevien entsyymaattisten reaktioiden käyttöön (Rutsch ym. 2009; Nielsen ym. 2012). Jos B₁₂-vitamiinia ei käytetä heti näissä ohutsuolen soluissa, se voidaan myös siirtää verenkiertoon muiden solujen saataville (Beedholm-Ebsen ym. 2010). Beedholm-Ebsen ym. (2010) havaitsivat, että esimerkiksi MRP1-proteiini pystyy siirtämään vapaata B₁₂-vitamiinia verenkiertoon, vaikka aikaisemmin oli luultu, että B₁₂-vitamiinin pitää aina olla sitoutuneena kuljetusproteiiniin. Verenkierrrossa B₁₂-vitamiini tarvitsee kuitenkin kuljetusproteiinin, transkobalamiinin (Wuerges ym. 2006). Soluista on löydetty reseptoreja, jotka nimenomaan tunnistavat transkobalamiinin ja siihen sitoutuneen B₁₂-vitamiinikompleksin. Näiden reseptorien avulla B₁₂-vitamiinia saadaan verenkierrosta soluille (Birn ym. 2002; Quadros ym. 2009).

Esimerkiksi maksassa on transkobalamiinin ja B₁₂-vitamiinin muodostaman kompleksin tunnistavia CD320-proteiineja ja munuaisissa megaliini-proteiineja.



Kuva 2. B₁₂-vitamiinin imeytyminen. Ruuasta saatu B₁₂-vitamiini sitoutuu ruuansulatuskanavan yläosassa haptokorriini-kuljetusproteiiniin, joka tuhoutuu ohutsuolen alkuosassa ja B₁₂-vitamiini voi sitoutua sisäiseen tekijään, jonka avulla B₁₂-vitamiini pääsee ohutsuolen loppuosan soluihin cubam-reseptorien kautta. Nämä ohutsuolen solut voivat ohjata B₁₂-vitamiinin verenkiertoon MRP1-reseptorien kautta ja verenkierrossa B₁₂-vitamiinia kuljettaa transkobalamiini. Munuaisissa megaliini- ja maksassa CD320-reseptorit voivat ohjata transkobalamiini-B₁₂-vitamiinirakenteen soluihin (Loikas ym. 2016).

Yksi tärkeimpiä vaiheita B₁₂-vitamiinin imeytymisessä on sisäisen tekijän erittyminen mahan parietaalisoluista (Nielsen ym. 2012). Sisäisen tekijän avulla B₁₂-vitamiini saadaan kuljetettua ohutsuolen loppuosan soluille, josta se voidaan ohjata eteenpäin elimistön muille soluille (Birn ym. 1997). Nämä ohutsuolen loppuosan solujen cubam-reseptorit tunnistavat vain sisäisen tekijän ja B₁₂-vitamiinin yhdessä muodostaman rakenteen. Sisäisen tekijän puuttuminen elimistöstä esimerkiksi autoimmuunisairaudesta aiheuttaman parietaalisolujen vaurioiden takia johtaakin yleensä B₁₂-vitamiinin puutokseen (Schwartz 1960). Myös ongelmat transkobalamiinin synteesissä aiheuttavat B₁₂-vitamiinin puutoksen,

joka yleensä huomataan jo pienillä lapsilla (Qian ym. 2002). Näiden lisäksi on myös monia muita syitä B₁₂-vitamiinin puutukseen sen monivaiheisen imeytymisen takia (Nielsen ym. 2012). Näitä ovat esimerkiksi erilaiset geenivirheet, lääkkeiden aiheuttamat B₁₂-vitamiinin imeytymishäiriöt ja mahatulehdus, joka heikentää sisäisen tekijän ja mahahappojen eritystä (Qian ym. 2002; O'Leary ja Samman 2010; Neumann ym. 2013).

Elimistöllä on myös keinoja estää tai hidastaa B₁₂-vitamiinin puutostilaa (Kozyraki ja Cases 2013). Elimistö erittää verenkiertoon päätyttyä B₁₂-vitamiinia sappinesteeseen, josta se saadaan enterohepaattisen kierron avulla maksasta takaisin ohutsuoleen. Myös munuaisissa esiintyy B₁₂-vitamiinin takaisinottoa virtsasta elimistöön (Birn ym. 2002). Jos B₁₂-vitamiinia on saatavilla hyvin suuri määrä, esimerkiksi vitamiinitabletista, B₁₂-vitamiini imeytyy myös diffuusiolla (Paul ja Brady 2017). Tällöin B₁₂-vitamiinin imeytymistä tapahtuu, vaikka sisäisen tekijän erittymisessä olisi ongelmia.

2.3 B₁₂-vitamiinin määrittäminen elintarvikkeista

2.3.1 Uutto

B₁₂-vitamiini on eläinperäisissä elintarvikkeissa solujen sisällä yleensä adenosyyli- ja metyylikobalamiinina tai hydroksikobalamiinina, ja proteiineihin sitoutuneena (Ball 2006). Myös hydroksikobalamiinia esiintyy ruuassa, koska koentsyymimuodot muuttuvat helposti valon vaikutuksesta. Aluksi B₁₂-vitamiini pitää vapauttaa elintarvikemateriaalista uuttamalla (Kumar ym. 2010). Synteettinen syanokobalamiinimuoto on pysyvämpi kuin luonnolliset kobalamiinimuodot ja uutossa yleensä pyritäänkin muuttamaan kaikki ruuan sisältämät kobalamiinimuodot syanokobalamiiniksi. B₁₂-vitamiinin uuttomenetelmiä on käytössä useita erilaisia ja Kumar ym. (2010) suosittavatkin, että jokainen laboratorio selvittäisi sopivimman uuttomenetelmän käyttämälleen näyttemateriaalille.

Uuttokäsittelyn aluksi näyttemateriaali sekoitetaan uuttoliuokseen, jona on yleensä käytetty natriumasetatipuskuria, pH 4–4,5 (Denton ja Kellogg 1953; Campos-Gimenéz ym. 2008). Tähän lisätään natriumsyanidiliuosta, jotta kobalamiinit saadaan muutettua syanokobalamiiniksi. Tämän jälkeen näyte uutetaan kiehuvaan vesihauteeseen (30 minuuttia). Myös autoklavointia voidaan käyttää (Campos-Gimenéz ym. 2008). Uuton jälkeen näyte suodatetaan. Kirjallisuuden perusteella on yritetty löytää korvaajaa natriumsyanidille sen terveydelle haitallisten vaikutusten takia (Denton ja Kellogg 1953;

Kumar ym. 2010). Denton ja Kellogg (1953) vertasivat natriumsyanidin ja natriumbisulfiitin toimivuutta uutossa ja havaitsivat, että natriumbisulfiittia käyttämällä saatiin samanlaisia B₁₂-vitamiinipitoisuuksia kuin natriumsyanidilla. Natriumbisulfiittia käyttämällä näyttemateriaalin sisältämät kobalamiinit muutetaan sulfokobalamiiniksi syanokobalamiinin sijasta.

Varsin usein uuttoon sisältyy myös entsyymikäsittely (Campos-Gimenéz ym. 2008). Jos näyttemateriaalissa tiedetään olevan tärkkelystä, liuokseen lisätään α -amylaasia hajottamaan tärkkelys ennen kuumauuttoa. B₁₂-vitamiinin tiedetään monissa elintarvikkeissa olevan sitoutunut proteiineihin, joten proteaasien käyttö B₁₂-vitamiinin irrotuksessa on usein tarpeen (Pakin ym. 2005; Ball 2006). Pakin ym. (2005) käyttivät pepsiiniä pH:ssa 4 määrittäessään B₁₂-vitamiinipitoisuutta porsaan maksasta, kananmunista, naudan fileestä, lohesta ja maitojauheesta. He optimoivat nestekromatografisen menetelmän näille näytteille ja käyttivät menetelmässään vain pepsiinientsyymiä ilman kuumennuskäsittelyä, koska heidän mielestään kuumennuskäsittely poikkesi B₁₂-vitamiinin normaalista vapautumisesta ruuansulatuskanavassa. Arkbåge ym. (2003) käyttivät pankreatiinia pH:ssa 7 määrittäessään B₁₂-vitamiinipitoisuutta maidosta ja juustosta. Heidän tutkimuksessaan entsyymikäsittely tehtiin vasta uuton kuumennuskäsittelyn jälkeen, kun taas Guggisberg ym. (2012) lisäsivät α -amylaasin ja pepsiinin ennen kuumennuskäsittelyä määrittäessään B₁₂-vitamiinipitoisuutta lihasta. Kirjallisuuden perusteella entsyymien käyttö uuton yhteydessä ei siis ole yhdenmukaista. Lisäksi muun muassa naudan ja broilerin lihasta, keltuaisesta ja maidosta on määritetty B₁₂-vitamiinia pelkän uuttokäsittelyn jälkeen (Watanabe ym. 1998; Arkbåge ym. 2003; Guggisberg ym. 2012).

2.3.2 Mikrobiologinen menetelmä (MBA)

B₁₂-vitamiinipitoisuuden määrittämistä elintarvikkeista pidetään haasteellisena, koska pitoisuudet elintarvikkeissa ovat yleensä hyvin pieniä ja suurusluokkaa ng/g (Kumar ym. 2010). Tietyt bakteerit tarvitsevat B₁₂-vitamiinia lisääntyäkseen. Tätä hyödynnetään B₁₂-vitamiinin mikrobiologisessa määritysmenetelmässä, joka perustuu bakteerin kasvuun B₁₂-vitamiinia sisältävässä liuoksessa. Bakteerin kasvu mitataan määrittämällä näytteen sameus. Määrittäessä käytetään useimmiten *Lactobacillus delbrueckii* -bakteeria (entiseltä nimeltään *L. leichmannii*) (Ball 2006; Kumar ym. 2010). Menetelmää on pidetty hyvänä sen herkkyyden takia, toteamisrajan ollessa jopa alle 20 ng/l (Kelleher ja Broin

1991). Mikrobiologinen määrittäminen on aikaisemmin tehty käyttämällä koeputkia, mutta 90-luvulla julkaistiin tutkimus kuoppalevyjen käytöstä määrittämisessä (Kelleher ja Broin 1991; Ball 2006). Kelleher ja Broin (1991) totesivat, että kuoppalevyjä käyttämällä menetelmän herkkyys säilyy, mutta kustannukset pysyvät alhaisina ja pystytään käsittelemään suuria näyttemääriä nopeasti.

Mikrobiologisessa määrittämisessä käytetäänkin nykyisin 96-kuoppalevyjä (Kelleher ja Broin 1991). Määrittämisessä käytetään syanokobalamiinistandardia, jolla tehdään kahdeksan pitoisuuspisteen standardisuora. Jokaista näytettä pipetoidaan levyille kahtena eri laimennoksena, jotta näytteen pitoisuus varmasti osuisi standardisuoralle. Standardien ja näytteiden lisäksi määrittämiseen tarvitaan myös niin sanottu nollanäyte, jotta saadaan selville taustan vaikutus tulokseen. Kaikkien levyille pipetoitavien näytteiden pH:n on oltava noin kuusi, koska useimpien *Lactobacillus*-bakteerien kasvuun optimi pH-alue on 5,5–6,5 (Ball 2006). Näytteiden jälkeen kuoppalevyille pipetoidaan bakteerille sopiva kasvualusta, jotta bakteerilla on mahdollisimman hyvät kasvuolosuhteet (Kelleher ja Broin 1991). Lopuksi levyille lisätään määrittämisessä käytettävä bakteeri, ja levyä inkuboidaan bakteerille sopivassa lämpötilassa sen kasvuun riittävä aika. Tuloksen lukemisessa käytetään siihen tarkoitettua kuoppalevyn lukijalaitetta, jolla bakteerin kasvun aiheuttama sameus kuopissa määritetään aallonpituudella 595 nm.

Mikrobiologista menetelmää on pidetty helppona ja nopeana, mutta viime vuosina on huolestuttu sen spesifisyydestä aktiiviselle B₁₂-vitamiinille (Guggisberg ym. 2012). *Lactobacillus delbrueckii* käyttää kasvuunsa myös B₁₂-vitamiinin kaltaisia yhdisteitä, joissa alemman ligandin, 5,6-dimetyyllibentsimidatsolin, paikalla on jokin muu yhdiste, kuten puriiniemäs tai sen johdos (Ball 2006). Tätä ei ole kuitenkaan aikaisemmin pidetty haitallisena, koska näitä yhdisteitä syntyy useimmiten mikrobiologisen käymisen seurauksena, ja koska elintarvikkeissa niiden pitoisuudet ovat yleensä vähäisiä. Lisäksi *Lactobacillus delbrueckii* voi käyttää kasvuunsa korrinoidirakenteeltaan epätäydellisiä yhdisteitä, deoksiribosideja ja deoksinukleotideja (Watanabe ja Bito 2018). Mikrobiologisella menetelmällä määritetty B₁₂-vitamiinipitoisuus voi olla virheellinen elintarvikkeissa, jotka sisältävät näitä yhdisteitä. Guggisberg ym. (2012) totesivatkin vertaillen mikrobiologista ja nestekromatografista määrittämenetelmää toisiinsa, että mikrobiologisella menetelmällä saatu lihanäytteiden B₁₂-vitamiinipitoisuus oli suurempi kuin nestekromatografisella menetelmällä. Myös muissa menetelmävertailuissa on havaittu, että mikrobiologisella menetelmällä elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet

ovat olleet suurempia kuin muilla menetelmillä (Watanabe ym. 1998; Heudi ym. 2006). Menetelmävertailututkimusten perusteella suositellaankin, että mikrobiologisen menetelmän sijasta käytettäisiin jotakin toista määrittämenetelmää (Watanabe ym. 1998; Heudi ym. 2006; Guggisberg ym. 2012).

2.3.3 Nestekromatografiset menetelmät

Nestekromatografisten menetelmien kehittäminen on yleistynyt viime vuosina mikrobiologisessa menetelmässä epäiltyjen ongelmien takia (Pakin ym. 2005; Marley ym. 2009; Van Wyk ja Britz 2010; Guggisberg ym. 2012). Taulukkoon 1 on koottu viime vuosina julkaistuja nestekromatografisia menetelmiä, joita on käytetty B₁₂-vitamiinin määrittämiseen elintarvikkeista. Nestekromatografisilla menetelmillä on määritetty B₁₂-vitamiinipitoisuutta varsinkin lihasta ja maitotuotteista (Van Wyk ja Britz 2010; Guggisberg ym. 2012). Nämä menetelmät ovat olleet korkean erotuskyvyn nestekromatografisia menetelmiä (HPLC), joissa on käytetty käänteisfaasikromatografiaa ja C18-kolonnia. Ajoliuoksena on käytetty joko metanolia ja vettä tai asetonitriiliä ja vettä. Useimmiten on käytetty gradienttiajoa, mutta lihasta on määritetty B₁₂-vitamiini myös isokraattisella ajolla. Ajoajat ovat vaihdelleet 10–35 minuutin välillä. Detektorina on yleensä ollut UV-detektori aallonpituudella 361 nm (Marley ym. 2009; Van Wyk ja Britz 2010; Guggisberg ym. 2012). Pakin ym. (2005) eristivät B₁₂-vitamiinin näytteestä ja muodostivat siitä fluoresoivan johdoksen, α -ribatsolin, jolloin fluoresenssidetektorin käyttö oli mahdollista. Johdoksen muodostaminen pidensi kuitenkin esikäsitteilyä huomattavasti.

B₁₂-vitamiinin määrittämiseen kehitettyjen HPLC-UV-menetelmien heikkoutena on ollut usein vähäinen herkkyys tai spesifisyys (Kumar ym. 2010). Elintarvikkeissahan B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat hyvin pieniä ja ne sisältävät paljon myös muita yhdisteitä, jotka voivat häiritä määrittämistä. Jotta herkkyys ja spesifisyys paranisi, elintarvikenäytteitä pitäisi puhdistaa ja konsentroida ennen nestekromatografista määrittämistä (Marley ym. 2009). Van Wyk ja Britz (2010) käyttivät näytteen puhdistukseen kiinteäfaasiuuttokolonnieja (SPE), jolloin määrittämissä saatiin 5 ng/ml. Nykyisin käytössä on myös immunoaffiniteettikolonne, joka kehitettiin nimenomaan B₁₂-vitamiinimäärittämisen herkkyys- ja spesifisyysongelmiin (Pakin ym. 2005; Marley ym. 2009). Pakin ym:n (2005) HPLC-menetelmässä immunoaffiniteettipuhdistusta käyttäen määrittämissä saatiin 3 ng/g ja Marley ym. (2009) HPLC-UV-menetelmässä immunoaffiniteettipuhdistuksella

määritysrajaksi saatiin 5 ng/injektio. Guggisberg ym. (2012) menetelmässä määritysraja B₁₂-vitamiinille oli 7 ng/g.

Taulukko 1. Elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinin määrittämiseen käytettyjä nestekromatografisia (LC) menetelmiä.

Menetelmä	Näytteet	Näytteen puhdistus	Määritysraja	Viite
HPLC-fluoresenssi	Muun muassa porsaan maksa, kananmuna, naudan liha, lohi, maitojauhe	Immunoaffiniteetti	3 ng/g	Pakin ym. 2005
HPLC-UV	Muun muassa vehnämuroja, proteiinijuomia ja -patukoita ja hiilihapotettuja virvoitusjuomia	Immunoaffiniteetti	5 ng/injektio	Marley ym. 2009
HPLC-UV	Maitotuotteita	SPE-puhdistus	5 ng/ml	Van Wyk ja Britz 2010
HPLC-UV	Lihaa	Immunoaffiniteetti	7 ng/g	Guggisberg ym. 2012
UHPLC-MS/MS	Maitotuotteita	SPE-puhdistus	2 ng/g	Zironi ym. 2013
UHPLC-UV	Vilja- ja solunäytteitä	Immunoaffiniteetti	0,225 ng/injektio	Chamlagain ym. 2015

Nestekromatografisten laitteistojen kehittyessä korkean erotuskyvyn nestekromatografisten menetelmien tilalla on alettu käyttää erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografisia menetelmiä (UHPLC) (taulukko 1) (Zironi ym. 2013; Chamlagain ym. 2015). Zironin ym. (2013) menetelmässä UHPLC yhdistettiin tandem-massaspektrometriin (MS/MS), kun B₁₂-vitamiinipitoisuus määritettiin maitotuotteista. Näytteen puhdistukseen käytettiin käänteisfaasin (Oasis HLB) sisältävää kiinteäfaasiuuttokolonnia (SPE) ja määritysraja menetelmällä oli 2 ng/g. Ajoaika menetelmässä oli vain 5 minuuttia, joka oli huomattavasti lyhyempi kuin HPLC-menetelmissä (Pakin ym. 2005; Marley ym. 2009; Van Wyk ja Britz 2010; Guggisberg ym. 2012; Zironi ym. 2013). Chamlagainin ym. (2015) menetelmässä käytettiin pääasiassa UHPLC-UV-detektointia, mutta menetelmä soveltui myös yhdistettäväksi massaspektrometriin. Chamlagainin ym. (2015) tutkimuksessa detektorina käytettiin fotodiodirividetektoria ja näyte puhdistettiin immunoaffiniteettikolonnilla. Ajoaika oli 10 minuuttia, joka oli myös huomattavasti lyhyempi aika kuin HPLC-menetelmillä (Pakin ym. 2005; Marley ym. 2009; Van Wyk ja Britz 2010; Guggisberg ym. 2012; Chamlagain ym. 2015). Määritysraja tässä menetelmässä oli 0,225 ng/injektio

(Chamlagain ym. 2015). Chamlagainin ym. (2015) menetelmässä B₁₂-vitamiinipitoisuus määritettiin esimerkiksi fermentoiduista viljanäytteistä ja mikrobisoluista. UHPLC-menetelmät ovat osoittautuneet lupaaviksi B₁₂-vitamiinin määritysmenetelmiksi elintarvikkeista, koska niissä on saatu parannettua perinteisissä HPLC-menetelmissä esiintyneitä ongelmia (Zironi ym. 2013; Chamlagain ym. 2015). Kirjallisuuden perusteella edelleen puuttuu kuitenkin tutkimusta UHPLC-menetelmän soveltuvuudesta laajemmalle elintarvikenäytteiden valikoimalle.

2.3.4 Muut menetelmät

Mikrobiologisen ja nestekromatografisten menetelmien lisäksi käytössä on muitakin menetelmiä B₁₂-vitamiinipitoisuuden määrittämiseen elintarvikkeista (Kumar ym. 2010). Määrittämiseen on käytetty esimerkiksi spektroskooppisia menetelmiä, kemiluminesenssia ja biologisia menetelmiä. Näillä menetelmillä on todettu olevan sekä hyviä puolia että heikkoja kohtia verrattuna mikrobiologiseen tai nestekromatografisiin menetelmiin.

Spektroskooppisista menetelmistä atomiabsorptiospektrofotometriaa (AAS) on käytetty, muun muassa rehunäytteille (Kumar ym. 2010). Menetelmässä syanokobalamiini tunnistetaan sen sisältämän koboltti-ionin perusteella. Spektroskooppisten menetelmien herkkyys ei ole kuitenkaan vaikuttanut riittävältä ja nämä menetelmät ovat tuntuneet vaativan myös hyvin voimakkaan uuttokäsittelyn. Kemiluminesenssimäärittämisessä taas herkkyys on ollut hyvä, mutta spesifisyyden kanssa on ollut ongelmia. Kemiluminesenssissa kemiallisten reaktioiden avulla saadaan aikaan valon emissio. B₁₂-vitamiini toimii reaktiossa katalyyttinä rakenteessa olevan koboltin vuoksi ja mitä enemmän näytteessä on kobolttia, sitä voimakkaampi on emissio (Qin ym. 1997). Kemiluminesenssilla voidaan havaita jopa pikogramman suuruisia pitoisuuksia, mutta näyttemateriaalissa olevat muut metalli-ionit voivat häiritä määrittystä (Qin ym. 1997; Kumar ym. 2010).

B₁₂-vitamiinipitoisuuden määrittämiseen on kehitetty myös biologisia menetelmiä, joissa käytetään vasta-aineita tai vitamiinia sitovia proteiineja (Kumar ym. 2010). Esimerkiksi entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA) on helppo toteuttaa myös vähäisillä kustannuksilla ja pitkään säilyvillä reagensseilla, mutta elintarvikenäytteille sitä on kuitenkin käytetty varsin harvoin. Kumarin ym. (2010) mukaan uusia lupaavia B₁₂-

vitamiinin määrittämenetelmiä ovat erilaiset biosensorit ja kemiluminesenssin tekniikkaan perustuva optinen detektio, mutta nämä menetelmät ovat vasta kehitteillä.

2.4 B₁₂-vitamiini elintarvikkeissa

2.4.1 Liha

Märehtijöiden ruuansulatuskanavassa tietyt mikrobit tuottavat B₁₂-vitamiinia, joten märehtijöiden, kuten naudon ja lampaan, lihaa pidetään parempana B₁₂-vitamiinin lähteenä kuin ei-märehtijöiden, porsaan ja siipikarjan lihaa (Gille ja Schmid 2015). B₁₂-vitamiini on erityisesti konsentroitunut maksaan, ja eläinten maksa sisältääkin paljon B₁₂-vitamiinia, mutta myös märehtijöiden lihaa pidetään hyvänä lähteenä. Broilerin ja porsaan lihan B₁₂-vitamiinipitoisuuteen vaikuttaa se, millaisella rehulla eläintä on ruokittu (Burgess ym. 2009). Lihassa B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa on myös eroja eri ruhonosien välillä (Gille ja Schmid 2015). Lihakset, joissa on vilkas energia-aineenvaihdunta, sisältävät enemmän B₁₂-vitamiinia kuin muut lihakset. Näissä lihaksissa on paljon mitokondrioita, joissa tarvitaan adenosyylikobalamiinia aineenvaihduntareaktioihin.

Guggisberg ym. (2012) määrittivät kuivatun naudonlihan B₁₂-vitamiinipitoisuuksia mikrobiologisella ja nestekromatografisella menetelmällä. Naudonlihan B₁₂-vitamiinipitoisuus oli mikrobiologisella menetelmällä suurempi kuin HPLC-menetelmällä (taulukko 2). Viiden näytteen B₁₂-vitamiinipitoisuuden keskiarvo mikrobiologisella menetelmällä oli 17,77 ng/g kuivapainoa kohden (kp) ja nestekromatografisella menetelmällä 16,02 ng/g kp. Watanabe ym. (1998) määrittivät mikrobiologisella menetelmällä raa'an naudonlihan B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi 14,2 ± 0,4 ng/g tuorepainoa kohden (tp) ja naudon maksan 773,8 ± 114,2 ng/g tp. Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen ylläpitämän elintarvikekoostumustietokanta Finelin (2017) mukaan vähärasvaisen naudonlihan B₁₂-vitamiinipitoisuus on 14 ng/g tp ja naudon maksan 1100 ng/g tp. Ruotsin Livsmedelsverket:n ylläpitämän koostumustietokannan (Livsmedelsdatabasen) (2018) mukaan naudonlihan B₁₂-vitamiinipitoisuus on 11,90 ng/g tp ja naudon maksan 1100 ng/g tp.

Taulukko 2. Kuivatun naudanlihan ja raa'an kinkun ja pekonin B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella (MBA) (n = 5) ja nestekromatografisella (HPLC) menetelmällä (n = 5) (Guggisberg ym. 2012).

Menetelmä	Pitoisuus (ng/g) ka		
	Naudanliha	Kinkku	Pekoni
MBA	17,77	6,14	6,30
HPLC	16,02	4,25	4,97

Szterk ym. (2012) ja Czerwonka ym. (2014) määrittivät naudan eri lihaksien B₁₂-vitamiinipitoisuutta LC-MS-menetelmällä. Tässä määrittäksessä raa'an naudan fileeselän ja sisäfileen B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat 38–39,5 ng/g tp (Szterk ym. 2012). Sen sijaan leveässä selkälihakessa B₁₂-vitamiinia oli vain 7,6 ± 3,8 ng/g tp (Czerwonka ym. 2014). Lisäksi Szterk ym. (2012) totesivat, että fileeselässä B₁₂-vitamiini oli adenosyyli-, syano- ja hydroksikobalamiinina. Leveässä selkälihakessa taas B₁₂-vitamiini oli adenosyyli-, metyyli- ja hydroksikobalamiinina (Czerwonka ym. 2014).

Van Heerden ym. (2007) määrittivät lampaanlihan B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi nestekromatografisella menetelmällä 35,4 ng/g tp, joka on samaa suuruusluokkaa kuin naudan sisäfileen B₁₂-vitamiinipitoisuus. Lampaanliha sisältää Fineli-tietokannan mukaan B₁₂-vitamiinia 12 ng/g tp ja Ruotsin koostumustietokannan mukaan hieman enemmän eli 14,30 ng/g tp (Fineli 2017; Livsmedelsdatabasen 2018).

Kirjallisuuden perusteella broilerin- ja porsaanlihassa on B₁₂-vitamiinia selkeästi vähemmän kuin märehelijöiden lihassa (Watanabe ym. 1998; Guggisberg ym. 2012). Guggisberg ym. (2012) määrittivät B₁₂-vitamiinipitoisuuden porsaan kinkusta ja pekonista mikrobiologisella ja HPLC-menetelmällä. Mikrobiologisella menetelmällä analysoidut pitoisuudet olivat suurempia kuin HPLC-menetelmällä analysoidut (taulukko 2). Kinkun (n = 5) B₁₂-vitamiinipitoisuus oli mikrobiologisella menetelmällä 6,14 ng/g tp ja HPLC-menetelmällä 4,25 ng/g tp. Pekonin (n = 5) B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella menetelmällä oli 6,30 ng/g tp ja HPLC:llä 4,97 ng/g tp. Watanabe ym. (1998) määrittivät mikrobiologisella menetelmällä porsaanlihanäytteen B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi 24,2 ± 2,6 ng/g tp ja broilerinlihan 15,4 ± 0,4 ng/g tp. Fineli-tietokannan mukaan porsaan ulkofileen B₁₂-vitamiinipitoisuus on 7 ng/g tp ja myös Ruotsin tietokannan mukaan lähes sama eli 7,60 ng/g tp (Fineli 2017; Livsmedelsdatabasen 2018). Finelin (2017) mukaan porsaan maksa sisältää B₁₂-vitamiinia 400 ng/g tp ja broilerin rintafilee 10 ng/g tp. Ruotsin

tietokannan, Livsmedelsdatabasenin (2018), mukaan taas broilerin rintafilee sisältää B₁₂-vitamiinia vain 2,6 ng/g tp. Fineli-tietokannassa (2017) ilmoitettujen naudan- ja porsaanlihojen B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat peräisin pääosin Tanskan elintarvikekoostumustietokannasta (Levnedsmiddeltabeller 2018). Kaiken kaikkiaan kirjallisuudesta löytyy vain vähän tai ei juuri lainkaan tutkimuksia, joissa B₁₂-vitamiinia olisi määritetty esimerkiksi porsaan maksasta, porsaan lihasta tai broilerin lihasta.

Hyönteisiä pidetään tulevaisuuden proteiinin lähteenä lihan kulutuksen hillitsemiseksi. Syksyllä 2017 Suomen elintarviketurvallisuusvirasto Evira hyväksyi hyönteisten rekisteröinnin elintarvikkeeksi (Maa- ja metsätalousministeriö 2017). Liha on tärkeä B₁₂-vitamiinin lähde, mutta myös hyönteisistä on mahdollista kirjallisuuden perusteella saada B₁₂-vitamiinia (Finke 2002). Esimerkiksi kotisirkan B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi on määritetty 53,7 ng/g tp ja jauhomadon 5,6 ng/g tp.

2.4.2 Kala

Kaloissa on enemmän B₁₂-vitamiinia kuin ei-märehtijöiden lihoissa (Nettleton ja Exler 1992; Guggisberg ym. 2012). Kirjallisuuden perusteella kalojen B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa on kuitenkin eroja eri kalalajien välillä (Nettleton ja Exler 1992). Myös villikaloiden ja kasvatettujen kalojen B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa on havaittu eroja. Sen on ajateltu johtuvan ainakin erilaisesta ravinnosta. Nettleton ja Exler (1992) tutkivat USA:ssa ravintoaineiden määriä paikallisissa villikaloiden ja kasvatetuissa kaloissa. Raa'an villin hopealohen B₁₂-vitamiinipitoisuus oli 48 ng/g tuorepainoa kohden (tp) ja kasvatetun 28 ng/g tp. Kirjolohen B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat hyvin samanlaisia kuin hopealohenkin. Raa'an villin kirjolohen B₁₂-vitamiinipitoisuus oli 48 ng/g tp ja kasvatetun 38 ng/g tp. Tässä tutkimuksessa käytettiin mikrobiologista määrittämenetelmää. Pakin ym. (2005) määrittivät HPLC-menetelmällä fluoresenssidetektoria käyttäen tuoreen kokonaisen lohen B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi 26,5 ng/g tp.

Suomessa suosittuja kaloja ovat esimerkiksi merilohi ja kirjolohi, silakka, kuha ja siika (Kuluttajaliitto 2018). Fineli-tietokannan ja Ruotsin koostumustietokannan mukaan näistä eniten B₁₂-vitamiinia sisältää silakka (taulukko 3) (Fineli 2017; Livsmedelsdatabasen 2018). Lohessa ja kirjolohessa B₁₂-vitamiinia on koostumustietokantojen mukaan noin 40–50 ng/g tp ja kuhassa ja siiassa jonkin verran vähemmän, 10–20 ng/g tp.

Taulukko 3. Kalojen B₁₂-vitamiinipitoisuuksia Fineli-tietokannasta (2017) ja Ruotsin koostumustietokannasta (Livsmedelsdatabasen 2018) tuorepainoa kohden.

Kala	B ₁₂ -vitamiinipitoisuus (ng/g)	
	Fineli	Livsmedelsdatabasen
Lohifilee	40	35 ^a
Kirjolohifilee	50	50 ^b
Silakkafilee	149	93 ^c
Kuha	20	-
Siika	10	32,2

a = kokonainen, nahaton, kasvatettu Norjan lohi

b = kokonainen, nahaton kirjolohi

c = kokonainen, nahaton silakka

- = tieto ei saatavilla

2.4.3 Kanamuna

Kirjallisuudesta löytyy erittäin vähän tutkimuksia, joissa olisi määritetty B₁₂-vitamiinia kananmunasta. Leeson ja Caston (2003) määrittivät kananmunan B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi 14,5 ng/g tuorepainoa kohden (tp), kun valkuainen ja keltuainen oli homogenoitu samaan näytteeseen. Tässä tutkimuksessa määritysmenetelmää ei ollut mainittu. Pakin ym. (2005) määrittivät nestekromatografisesti kananmunan B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi 19,7 ng/g tp. Pelkän keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella menetelmällä määritettynä oli 21,3 ± 0,6 ng/g tp (Watanabe ym. 1998). Fineli-tietokannan (2017) mukaan keltuainen sisältää B₁₂-vitamiinia 69 ng/g tp ja valkuainen 1 ng/g tp. Ruotsin koostumustietokannan mukaan keltuaisessa on B₁₂-vitamiinia 38,8 ng/g tp ja valkuaisessa 1 ng/g tp (Livsmedesdatabasen 2018).

2.4.4 Maitotuotteet

Maitotuotteissa B₁₂-vitamiinipitoisuudet vaihtelevat tuoteryhmittäin (taulukko 4) (Arkbåge ym. 2003). B₁₂-vitamiinipitoisuuteen vaikuttaa esimerkiksi eläimelle syötetty rehu ja minkä eläimen maitoa tuotteeseen on käytetty (Gille ja Schmid 2015). Rutten ym. (2013) havaitsivat, että lehmänmaidon B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa oli paljon vaihtelua. He määrittivät B₁₂-vitamiinipitoisuuden 544 Holstein rotua olevan lehmän maidosta immunoradiometrisellä menetelmällä. Maitonäytteiden B₁₂-vitamiinipitoisuus vaihteli 1,0–12,9 µg/l tuorepainoa kohden (tp) ja keskiarvo oli 4,40 ± 1,54 µg/l tp. Arkbåge ym. (2003) käyttivät myös immunoradiometristä menetelmää määrittäessään täysmaidon B₁₂-

vitamiinipitoisuudeksi 3,2 ng/g tp. Mikrobiologisella määrittelyllä japanilaisesta päivittäiskaupasta ostetun maidon B₁₂-vitamiinipitoisuus oli 4,4 ± 0,3 ng/g tp, mutta tutkimuksesta ei käynyt ilmi maidon rasvapitoisuutta (Watanabe ym. 1998). Samassa tutkimuksessa rasvattoman maitojauheen B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi määritettiin 27,4 ± 0,5 ng/g kuivapainoa kohden (kp). LC-MS-menetelmällä täysmaitojauheen B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi määritettiin 17,6 ng/g kp (Luo ym. 2006). Fineli-tietokannan mukaan rasvaton maito sisältää B₁₂-vitamiinia 4 ng/g tp ja Ruotsin koostumustietokannan mukaan rasvaton maito sisältää B₁₂-vitamiinia 5,9 ng/g tp (Fineli 2017; Livsmedelsdatabasen 2018).

Fermentoiduissa maitotuotteissa mikrobit saattavat vaikuttaa B₁₂-vitamiinin määrään, koska osa mikrobeista kuluttaa B₁₂-vitamiinia (Scott ja Bishop 1988). Arkbåge ym. (2003) tutkivat 3 % rasvaa sisältävän jogurtin B₁₂-vitamiinipitoisuutta ja saivat immunoradiometrisellä menetelmällä pitoisuudeksi 2,1 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 3,2 ng/g tp. Fineli-tietokannan mukaan maustamaton jogurtti (rasvaa 2,5 %) sisältää B₁₂-vitamiinia 4 ng/g tp ja Ruotsin koostumustietokannan mukaan maustamaton jogurtti (rasvaa 3 %) sisältää B₁₂-vitamiinia 2,1 ng/g tp (Fineli 2017; Livsmedelsdatabasen 2018).

Juustojen kypsytyksessä hyödynnetään myös eri mikrobikantoja (Scott ja Bishop 1988; Poonam ym. 2012). Juustojen valmistuksessa B₁₂-vitamiinia menetetään valmistusprosessissa poistettavaan vesiliukoiseen heraan, mutta juustojen kypsytyksen aikana on kuitenkin mahdollista, että B₁₂-vitamiinin määrä voi myös lisääntyä juustossa käytettyjen mikrobien tuottaessa sitä. Kovissa ja puolikovissa juustoissa B₁₂-vitamiinipitoisuuden on havaittu olevan hyvin samanlainen, mutta joissakin pehmeissä juustoissa pitoisuudet ovat olleet selkeästi pienemmät. Mikrobiologista menetelmää käyttäen Arkbåge ym. (2003) määrittivät kovista juustoista esimerkiksi parmesan-juuston B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi 19 ng/g tp. Edam-juuston B₁₂-pitoisuus oli tässä tutkimuksessa 21 ng/g tp ja gouda-juuston 17 ng/g tp. Saman tutkimuksen mukaan pehmeät juustot sisälsivät vähemmän B₁₂-vitamiinia kuin kovat juustot. Brie-juuston B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi määritettiin 12 ng/g tp ja rahkan 3 ng/g tp, mutta mozzarella-juuston pitoisuus oli jopa 21 ng/g tp. Näihin juustojen B₁₂-vitamiinipitoisuuseroihin todennäköisesti vaikuttaa ainakin kypsytyksajan pituus, joka kovissa juustoissa on paljon pidempi. Fineli-tietokannan mukaan juustoista Edam sisältää B₁₂-vitamiinia 21 ng/g tp, Emmental (punaleima) 20 ng/g tp ja Brie-juusto 11 ng/g tp (Fineli 2017). Ruotsin

koostumustietokannan (Livsmedelsdatabasen 2018) mukaan juustojen B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat samaa luokkaa kuin Arkbåge ym. (2003) tutkimuksessa ja Fineli-tietokannassa (2017). Sen mukaan kovan juuston (rasvaa 23 %) B₁₂-vitamiinipitoisuus on 16 ng/g tp ja rasvaisemman (31 %) kovan juuston 16,5 ng/g tp ja Brie-juuston 11,3 ng/g tp.

Taulukko 4. Maitotuotteiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksia tuorepainoa kohden.

Viite	B ₁₂ -vitamiinipitoisuus (ng/g)			
	Maito	Jogurtti (rasvaa n. 3 %)	Edam	Brie
Arkbåge ym. 2003	3,2 ^a	3,2	21	12,0
Fineli	4,0 ^b	4,0	21	11,0
Livsmedelsdatabasen	5,9 ^b	2,1	16 ^c	11,3

a = täysmaito

b = rasvaton maito

c = kova juusto, rasvaa 23 %

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

Tutkielman tavoitteena oli tutkia kuinka paljon eläinperäiset elintarvikkeet sisältävät B₁₂-vitamiinia. Tutkimukseen valittiin keskeisiä eläinperäisiä elintarvikkeita sekä kaksi elintarvikkeeksi hyväksyttyä hyönteislajia. Tutkimuksen tarkoituksena oli myös verrata toisiinsa mikrobiologista ja erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografista (UHPLC) menetelmää B₁₂-vitamiinin määrittämisessä sekä tutkia eri uuttomenetelmien vaikutusta B₁₂-vitamiinipitoisuuteen.

3.1 Materiaalit ja menetelmät

3.1.1 Näytteet ja näytteiden esikäsittely

Tutkittaviksi elintarvikkeiksi valittiin naudan sisäpaisti, porsaan ulkofilee, broilerin rintafilee, naudan ja porsaan maksa, kirjolohifilee, silakkafilee, kananmuna, rasvaton maito, maustamaton jogurtti (rasvaa 2,5 %) ja Edam- ja Emmental-juusto. Näytteet ostettiin yhdestätoista eri vähittäiskaupasta pääkaupunkiseudulta ja sen lisäksi Hakaniemen kauppahallista ja lihatukku Veijo Votkin Oy:stä, niin että kaikkia elintarvikenimikkeitä oli

noin kymmenen kappaletta (liite 1). Lisäksi B₁₂-vitamiinipitoisuus määritettiin mahdollisista tulevaisuuden elintarvikkeista, kotisirkasta ja jauhomadosta.

Naudan sisäpaistia, porsaan ulkofileetä, broilerin rintafileetä, silakkafileitä ja kirjolohifileetä ostettiin 300–400 g ja naudan ja porsaan maksaa 100–150 g jokaisesta kaupasta. Lihat ja kalat pilkottiin kuutioiksi. Kirjolohifileistä poistettiin nahka ennen kuutiointia. Kaikista lihoista, maksoista ja kaloista tehtiin kokoomanäytteet. Kokoomanäyte koostettiin siten, että eri kaupoista ostettua elintarviketta punnittiin 20–30 g kokoomanäytteeseen. Kokoomanäyte pakkaskuivattiin ja pakkaskuivauksen jälkeen näyte jauhettiin, laitettiin vakuumiin ja varastoitiin -20 °C:ssa vitamiinimääritykseen asti.

Kananmunia ostettiin joka kaupasta yksi kennollinen (kananmunia 12 tai 6 kpl), niin että niitä oli yhteensä kymmenen kennon, ja että ne edustivat eri kananmunantuottajia. Jokaisesta kennosta otettiin kaksi kananmunaa, joiden keltuaiset ja valkuaiset eroteltiin ja sekoitettiin. Keltuaisista otettiin kaksi rinnakkaista ja valkuaisista kolme rinnakkaista näytettä, jotka pakkaskuivattiin. Pakkaskuivatut keltuaisnäytteet yhdistettiin, jauhettiin ja pakattiin kahteen pussiin, jotka laitettiin vakuumiin ja varastoitiin -20 °C:ssa vitamiinimääritykseen asti. Sama käsittely tehtiin valkuaisille. Lisäksi kolmen eri kananmunantuottajan keltuaisia pakattiin Falcon-putkiin ja pakastettiin. Nämä keltuaiset pakkaskuivattiin myöhemmin ja jauhettiin. Jauhatuksen jälkeen eri kananmunantuottajien keltuaisista analysoitiin B₁₂-vitamiinipitoisuus.

Eri valmistajien Edam-juustopakkauksia (300–500 g) ostettiin 10 kappaletta ja Emmental-juustopakkauksia (300–350 g) 11 kappaletta. Eri tuottajien rasvatonta maitoa ja maustamatonta jogurtia ostettiin yhden litran pakkauksissa kuudesta eri kaupasta yhteensä 13 maitopakkausta ja 11 jogurttipakkausta. Kaikista juustoista otettiin samankokoinen pala (50 g) ja saman valmistajan Edam- ja Emmental-juustot yhdistettiin. Molemmista juustolaaduista tehtiin kokoomanäytteet, jotka pakkaskuivattiin ja jauhettiin. Molemmat jauhetut juustolaadut jaettiin kahteen pussiin, jotka laitettiin vakuumiin ja varastoitiin -20 °C:ssa vitamiinimääritykseen asti. Jokaisesta maitotölkistä otettiin saman verran (1 dl) kokoomanäytteeseen, joka pakastettiin Falcon-putkissa. Maustamattomalle jogurtille tehtiin sama käsittely kuin maidolle.

Kotisirkat ja jauhomadot saatiin toiselta maisterintutkielman tekijältä, joka oli pakkaskuivannut ja jauhanut hyönteisnäytteet. Kotisirkat olivat peräisin Pohjolan hyönteistaloudelta (Inkeroinen) ja jauhomadot Entocubelta (Espoo).

3.1.2 Määrityksissä käytetyt reagenssit ja laitteet

Natriumasetaattipuskurin valmistukseen käytettiin natriumhydroksidia (Fluka analytical, Romania) ja etikkahappoa (Merck, Saksa). Uutoissa käytettiin 1-prosenttista natriumsyanidiliuosta (natriumsyanidi: Merck, Saksa), jossa liuottimena oli MilliQ-vesi (Millipore system, USA). Uutoissa käytetyt entsyymit olivat pankreatiini (Pancreatin from porcine pancreas P1750-1006, Sigma-Aldrich, USA) ja pepsiini (Pepsin from porcine gastric mucosa P7125-1006, Sigma, USA). B₁₂-vitamiinistandardina käytettiin syanokobalamiinia (Supelco, USA). B₁₂-vitamiinistandardiliuokset valmistettiin varastoliuoksesta (pitoisuus noin 0,2 mg/ml), jossa liuottimena oli 25 % etanoli (Altia, Suomi). Mikrobiologisessa määrityksessä käytetty kasvualusta oli Vitamin B₁₂ (*Lactobacillus*) assay broth (base) for microbiology, Merck, Saksa. Mikrobiologiseen alustaan lisättiin myös Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich, USA). Mikrobiologisessa määrityksessä käytetty mikrobi oli *Lactobacillus delbruckii* ATCC 7830. Mikrobiologisessa määrityksessä käytettiin vertailunäytteenä Commission of the European Communities, BCR, reference material N:487 pig liver, sample N:0360. Näytteiden puhdistuksessa UHPLC-määrityksiä varten käytettiin metanolia (Sigma-Aldrich, Chromasolv for HPLC, USA). Ajoliuoksiin käytettiin MilliQ-vettä, asetonitriiliä (Sigma-Aldrich, USA) ja trifluoretikkahappoa (Sigma-Aldrich, USA). Kaikki reagenssit olivat analyysilaatua ja ajoliuokset HPLC-laatua.

Kaikki näytteet jauhettiin jauhatuslaitteella Grindomix GM200 20 sekunnin ajan ja nopeudella 7. Punnitukseen käytettiin vaakaa Precisa 240A. Uutoissa käytettiin sentrifugia (Hermle Z 323) kierrosnopeudella 8000 rpm ja 10 minuuttia kerrallaan. Uutetut näytteet suodatettiin suodatinpaperilla (VWR European, qualitative filter paper 415, size 90 mm, particle retention: 12–15 µm). Mikrobiologisissa määrityksissä kasvualusta ruiskusuodatettiin suodattimella (Pall Acrodisc 32 mm syringe filter with 0,2 µm supor membrane). Mikrobiologisissa määrityksissä käytettiin 96-kuoppalevyjä (Costar[®] 3596, 96 well cell culture cluster, flat bottom with lid, sterile). Kuoppalevyt luettiin kuoppalevyjen lukijalaitteella (Multiskan EX, Labsystems), jossa oli Ascent Software -ohjelmisto. B₁₂-

vitamiinivarastoliuoksen pitoisuus tarkistettiin spektrofotometrilla (Lambda 25 UV/VIS, Perkin Elmer). pH:n säädöt tehtiin pH-mittarilla.

Näytteiden puhdistukseen UHPLC-määrittystä varten käytettiin immunoaffiniteettipylväitä (Easi-extract Vitamin B₁₂ immunoaffinity columns, R-Biopharm Rhone LTD). Puhdistusta varten näytteet ruiskusuodatettiin (GHP Acrodisc GF 25 mm GF/0,45 µm GHP membrane). Puhdistuksen jälkeen näytteet ruiskusuodatettiin (GHP Acrodisc 13 mm 0,2 µm GHP membrane) vielä UHPLC-näytepulloihin. UHPLC-laitteisto oli Waters Acquity UPLC system, USA. Käytetty kolonni oli Acquity HSS T3 C18 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm).

3.1.3 Uttomenetelmän valinta esikokeilla

B₁₂-vitamiini on sitoutunut elintarvikematriisiin, yleensä proteiineihin ja tämä voi aiheuttaa ongelmia B₁₂-vitamiinin määrittämisessä (Ball 2006). Esikokeilla tutkittiin eri uutomenetelmien vaikutusta määritettyyn B₁₂-vitamiinipitoisuuteen, koska pyrittiin saamaan paras mahdollinen B₁₂-vitamiinipitoisuus riippumatta esimerkiksi elintarvikkeen proteiini- tai rasvapitoisuudesta. B₁₂-vitamiinin määrittäminen tehtiin esikokeissa vain mikrobiologisesti. Esikokeilla verrattiin kahta eri entsyymivalmistetta, pepsiniä ja pankreatiinia, ja sen lisäksi verrattiin eri uuttoaikojen ja uuttoliuoksen happamuuden vaikutusta. Entsyymikäsittelyiden vaikutusta verrattiin ilman entsyymejä uutettuun näytteeseen.

Esikokeisiin valittiin käsittely pankreatiinilla, koska Ververis (2016) totesi maisterintutkielmassaan tämän entsyymin tarpeelliseksi juustojen B₁₂-vitamiinipitoisuuden määrittämisessä. Pankreatiini on entsyymien seos, joka koostuu haimanesteen sisältämistä entsyymeistä, amylaasista, lipaasista ja trypsiinistä. Pankreatiini toimii parhaiten pH:ssa 4,5–7. Maisterintutkielman (Ververis 2016) tulosten perusteella inkubointiajoiksi valittiin 1,5 tuntia ja 3 tuntia lämpötilassa 37 °C, molemmat pH:ssa 6,2. Sen lisäksi kokeiltiin 1,5 tunnin inkubointia pankreatiinilla pH:ssa 4,5, koska se vähensi yhden pH:n säätövaiheen uutokäsittelystä. Määräksi valittiin 0,2 g:n lisäys pankreatiinia (8 x USP) näytteeseen ja lisäksi 1,5 tunnin inkubointiin kokeiltiin myös 0,1 g:n lisäystä. Pankreatiini jouduttiin lisäämään näytteeseen jauheena sen huonon liukenevuuden vuoksi.

Pepsiini valittiin esikokeisiin, koska se pilkkoo vain proteiineja. Pepsiiniä (0,1 g, 400 yksikköä/mg) testattiin 0,5 tunnin inkuboinnissa lämpötilassa 37 °C ja pH:ssa 4,5. Pepsiini lisättiin näytteeseen liuoksena. Keltuaiselle kokeiltiin lisäksi uuttoa ilman entsyymikäsittelyä, mutta kolmen tunnin inkuboinnilla 37 °C:n lämpötilassa. Esikokeisiin valittiin siis lopulta seitsemän erilaista käsittelyä (taulukko 5).

Taulukko 5. Esikokeisiin valitut käsittelyt.

Nro	Esikoe
1	ilman entsyymiä, ei inkubointia
2	pankreatiini (0,2 g) 1,5 h, pH 6,2, 37 °C
3	pankreatiini (0,2 g) 3 h, pH 6,2, 37 °C
4	pankreatiini (0,2 g) 1,5 h, pH 4,5, 37 °C
5	pankreatiini (0,1 g) 1,5 h, pH 6,2, 37 °C
6	pepsiini (0,1 g) 0,5 h, pH 4,5, 37 °C
7	ilman entsyymiä 3 h 37 °C (keltuainen)

3.1.4 Näytteen uutto ja entsyymikäsittely

Uuttokäsittelyn perustana käytettiin Chamlagainin ym. (2015) menetelmää. Näytteeseen (0,2–3 g) lisättiin natriumasetatipuskuria pH 4,5 noin 15 ml ja 1-prosenttista natriumsyanidiliuosta 100 µl ja sekoitettiin vortex-laitteella. Natriumsyanidiliuoksen avulla näytteen sisältämät B₁₂-vitamiinin eri muodot muutettiin syanokobalamiiniksi, joka on pysyvin B₁₂-vitamiinin muoto (Ball 2006). Tämän jälkeen lisättiin esikokeiden tulosten perusteella (taulukko 7) joko pepsiiniä tai pankreatiinia ja muutettiin tarvittaessa pH:ta. Inkuboinnin jälkeen näytettä keitettiin 30 minuuttia. Keiton aikana näytettä sekoitettiin muutaman kerran. Näyte jäähdytettiin ja sentrifugoitiin kaksi kertaa. Yhdistetyt supernatantit otettiin talteen ja pH säädettiin mikrobiologista määrittystä varten arvoon 6,2. Lopuksi yhdistetyt supernatantit suodatettiin suodatinpaperin läpi ja tilavuus säädettiin mittapullolla 25 millilitraan. Näyteuutetta säilytettiin -20 °C:ssa ja se sulatettiin 37 °C:ssa mikrobiologista tai UHPLC-määrittystä varten. Kaikki työskentely tapahtui hämärässä valossa tai näytteet suojattiin valolta B₁₂-vitamiinin valoherkkyyden vuoksi.

3.1.5 B₁₂-vitamiinin mikrobiologinen määrittäminen

Mikrobiologiseen B₁₂-vitamiinin määrittämiseen käytettiin Chamlagainin ym. (2015) muokkaamaa menetelmää, joka perustui Kelleherin ja Broinin (1991) käyttämään menetelmään. Standardina käytettiin syanokobalamiiniliuosta, jonka pitoisuus oli 0,1 ng/ml. Standardisuoraa varten syanokobalamiinia pipetoitiin kuoppalevyille 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 ja 8 pg. Jokaista pitoisuutta pipetoitiin yhteensä neljään kuoppaan, joihin lisättiin natriumasetattipuskuria pH 6,2 siten että kokonaistilavuudeksi tuli 100 µl. Näyteuutteesta tehtiin natriumasetattipuskuriin pH 6,2 kaksi laimennosta, joiden B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi arvioitiin noin 20–50 pg/ml. Jokaista laimennosta pipetoitiin yhteensä neljään kuoppaan 100 µl. Jokaisessa mikrobiologisessa määrittämisessä käytettiin myös nollanäytettä, jolle tehtiin samat laimennokset kuin näytteelle. Näin voitiin vähentää tuloksesta taustan ja entsyymien sisältämän B₁₂-vitamiinin vaikutus.

Kasvatusalustaan punnittiin kasvatusalustajauhetta 3,1 g. Siihen lisättiin vesi (50 ml) ja Tween[®] 80 (75 µl), minkä jälkeen kasvatusalustaa kuumennettiin parin minuutin ajan, jotta alusta saatiin liukenemaan kunnolla veteen. pH säädettiin arvoon 6,2. Alusta suodatettiin 0,2 µm:n suodattimen läpi. -70 °C:ssa glyseroli-kryosäilytys bakteeri *Lactobacillus delbrückii* ATCC 7830 lisättiin (75 µl) kasvatusalustaan juuri ennen pipetointia. Kasvatusalustaa pipetoitiin jokaiseen kuoppaan 200 µl. Valmis kuoppalevy laitettiin muovirasiaan, jonka sisälle oli kiinnitetty kostutettua paperia. Kuoppalevyä inkuboitiin 35 °C:ssa 17–19 tuntia, jonka jälkeen kuoppalevy luettiin lukijalaitteella aallonpituudella 595 nm.

3.1.6 B₁₂-vitamiinin määrittäminen UHPLC-menetelmällä

3.1.6.1 Näytteen puhdistus ja konsentrointi ennen UHPLC-määrittäystä

Ennen UHPLC-määrittäystä näytteet puhdistettiin ja konsentroidtiin immunoaffiniteettipylvään avulla, jotta elintarvikemateriaalin UHPLC-määrittäystä häiritsevät yhdisteet saatiin poistettua ja B₁₂-vitamiinia saatiin mahdollisimman paljon UHPLC-määrittämiseen. Puhdistus tehtiin Chamlagainin ym. (2015) mukaan. Näyteuutetta puhdistettiin arvioidusta B₁₂-vitamiinipitoisuudesta riippuen 10–20 ml. Immunoaffiniteettipylväästä valutettiin ensin sen sisältämä puskuriliuos pois. Sitten suodatettu näyteuute valutettiin immunoaffiniteettipylvään läpi ja pylvästä pestiin 9 ml:lla

vettä. Pylvääseen injektoitiin 50 ml ilmaa ylimääräisen veden kuivaamiseksi. Tämän jälkeen B₁₂-vitamiini eluoiitiin pylväästä 3 ml:lla metanolia ja lopuksi pylväs vielä huuhdeltiin 0,5 ml:lla metanolia. Metanoli haihdutettiin eluentista typpivirrassa 50 °C:n lämpötilassa. B₁₂-vitamiininäytteeseen lisättiin 300 µl vettä ja lopuksi se ruiskusuodatettiin (0,2 µm) UHPLC-näytepulloon.

3.1.6.2 UHPLC-määrittäminen

B₁₂-vitamiinin UHPLC-määrittämiseen käytettiin Chamlagainin ym. (2015) kehittämää menetelmää. Määrittämisessä käytettiin fotodiodirividetektoria (PDA: 210–600 nm) aallonpituudella 361 nm. Laitteistoon kuului myös automaattinen näytteenotto, jonka lämpötila pidettiin 4 °C:ssa. Näytteenotto injektoi näytteet kolonniin 20 µl:n injektio-tilaan läpi partial loop -tilassa. Pienten B₁₂-vitamiinipitoisuuksien takia näyteuutteet broilerin rintafileestä, porsaan ulkofileestä ja jauhomadosta injektoitiin full loop -tilassa. Injektio-tilavuus oli 10, 15 tai 20 µl riippuen elintarvikkeen B₁₂-vitamiinipitoisuudesta. Kolonniuunin lämpötila oli 30 °C ja kolonnina oli käänteisfaasikolonne C18.

Määrittämisessä käytettiin kahta ajoliuosta, MilliQ-vettä (liuos A) ja asetonitriiliä (liuos B), joihin oli molempiin lisätty 0,025 % trifluorietikkahappoa. Määrittämisessä käytettiin gradienttiajoa, jossa ajoliuoksien suhde (A:B) oli 0-0,5 minuutin kohdalla 95:5, 0,5–5 minuutin kohdalla 60:40, 5–6 minuutin kohdalla 60:40, ja lopuksi 6–10 minuutin kohdalla lineaarinen gradientti 60:40-suhteesta takaisin 95:5-suhteeseen kolonnin tasapainottamiseksi seuraavaa ajoa varten. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 0,32 ml/min ja ajoaika oli 10 minuuttia.

Näytteiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksien määrittämiseksi jokaisella ajokerralla muodostettiin standardisuora neljää syanokobalamiinipitoisuutta käyttäen. Pitoisuudet vaihtelivat 0,04–0,44 ng/µl ja jokainen standardiliuos injektoitiin kahdesti. Kromatogrammit integroitiin ja näytteiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet laskettiin Empower 2 -ohjelmalla. Pseudo-B₁₂-vitamiinin pitoisuus kotisirkassa määritettiin käyttämällä syanokobalamiinin standardisuoraa.

3.1.7 Tulosten laskeminen

Pakkaskuivauksen yhteydessä määritettiin näytteiden kosteuspitoisuudet (liite 3). Kosteuspitoisuus (%) laskettiin vähentämällä elintarvikkeen kuivauksen jälkeinen massa ennen kuivausta olleesta massasta ja jakamalla se alussa olleella massalla ja kertomalla sadalla (kuva 3). Mikrobiologisesta ja UHPLC-määrityksestä saatiin elintarvikkeen B₁₂-vitamiinipitoisuus kuivapainoa kohden, joten kosteuspitoisuus piti ottaa huomioon laskettaessa B₁₂-vitamiinipitoisuutta tuorepainoa kohden.

$$\text{Kosteuspitoisuus (\%)} = \frac{m_a - m_b}{m_a} \times 100 \%$$

$$B_{12} - \text{vitamiinipitoisuus (tp)} = \frac{B_{12} - \text{vitamiinipitoisuus (kp)} \times \text{kuiva} - \text{ainepitoisuus (\%)}}{100}$$

Kuva 3. Elintarvikkeen kosteuspitoisuuden (%) ja B₁₂-vitamiinipitoisuuden laskeminen tuorepainoa kohden (m_a = elintarvikkeen massa ennen kuivausta, m_b = elintarvikkeen massa kuivauksen jälkeen, tp = tuorepaino, kp = kuivapaino).

3.1.8 Tulosten oikeellisuus

Mikrobiologisen menetelmän toimivuutta seurattiin vertailunäytteellä (pig liver), joka uutettiin kuten muutkin näytteet, mutta ilman entsyymiä. Vertailunäyte oli mukana jokaisella levytyksellä ainakin yhdellä levyllä. Lisäksi referenssinäytteellä voitiin varmistaa, että bakteeri oli kasvanut kuoppalevyllä, mutta ylikasvua tai kontaminaatiota ei ollut tapahtunut. Pig liver -referenssimateriaalin sertifioitu pitoisuus oli 1120 ± 90 ng/g kuivapainoa kohden. Jos pitoisuus poikkesi sertifioidusta arvosta, levytys uusittiin. Pig liver -referenssinäytteen pitoisuudet kirjattiin valvontakorttiin (liite 2). Lisäksi mikrobiologisessa ja UHPLC-määrityksessä oli käytössä nollanäyte, jolla vähennettiin entsyymien sisältämä B₁₂-vitamiinin määrä elintarvikenäytteistä.

Standardiliuoksen pitoisuus tarkistettiin säännöllisesti noin joka kuukausi spektrofotometrisesti ja tarkastettuja arvoja käytettiin standardisuoran pisteissä. UHPLC-menetelmään ei ollut saatavilla sopivaa vertailumateriaalia, joten menetelmän toimivuudesta varmistuttiin vertailemalla standardisuoria aikaisemmin määritettyihin standardisuoriin. Mikrobiologisessa menetelmässä määritettiin yleensä kolme rinnakkaista,

joten tuloksissa ilmoitettiin näissä tapauksissa keskihajonta, mutta UHPLC-määritykset tehtiin kahtena rinnakkaisena, joten niistä ei voinut laskea keskihajontaa vaan ilmoitettiin vaihteluväli. Jos mikrobiologisessa määrityksessä yksi kolmesta rinnakkaisesta määrityksestä epäonnistui, niin tuloksissa ilmoitettiin vaihteluväli.

Esikokeissa tehokkaimman uuttomenetelmän valintaan vaikutti B₁₂-vitamiinipitoisuuden lisäksi rinnakkaismääritysten hajonta. Rinnakkaisissa määrityksissä ei saanut olla liikaa hajontaa, koska se saattoi tarkoittaa entsyymien epätasaista jakautumista näytteessä. Rinnakkaismäärityksistä laskettiin variaatiokerroin: $v = s / x * 100 \%$, jossa keskihajonta (s) jaettiin keskiarvolla (x). Jos variaatiokerroin oli yli 10 %, uuttomenetelmää ei käytetty elintarvikkeella.

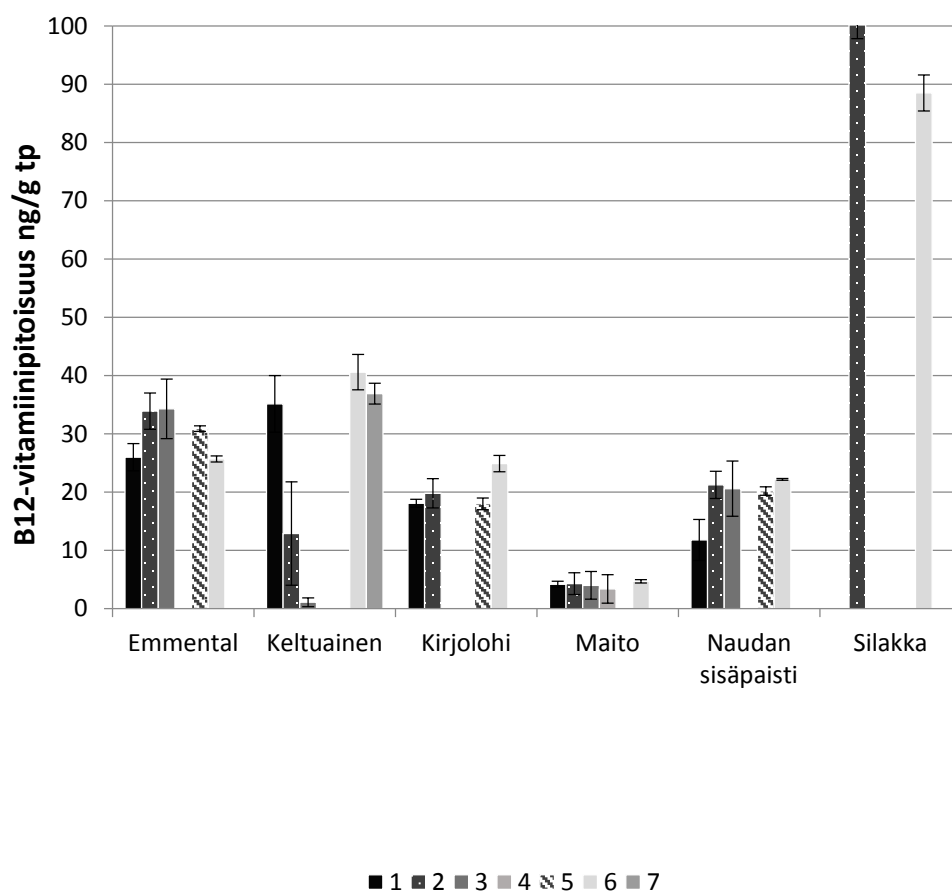
3.2 Tulokset

3.2.1 Esikokeet mikrobiologisella menetelmällä

Esikokeiden tulosten perusteella kaikille näytteille ei voitu käyttää samaa entsyymikäsittelyä ja uuttomenetelmää. Kuvassa 4 on esitetty esikokeiden tulokset ja taulukossa 6 esikokeiden perusteella kullekin elintarvikkeelle käytetty uutto- ja entsyymimenetelmä. Emmental-juustolle suurin B₁₂-vitamiinipitoisuus saatiin käyttämällä uuttovaiheessa pankreatiinia. Inkubointiajalla, 1,5 tuntia ja 3 tuntia, ei ollut vaikutusta saatuun B₁₂-vitamiinipitoisuuteen. Pidemmällä inkubointiajalla rinnakkaismääritysten hajonta oli kuitenkin suurempi (variaatiokerroin yli 10 %). 0,2 g:n pankreatiinilisäyksellä saatiin hieman suurempi pitoisuus kuin 0,1 g:n lisäyksellä. Juustonäytteille valittiinkin näiden tulosten perusteella uuttokäsittely pankreatiinilla (0,2 g) 1,5 tunnin inkuboinnilla. Keltuaisella suurimmat B₁₂-vitamiinipitoisuudet saatiin käyttämällä uuttovaiheessa pepsiiniä ja uutettaessa ilman entsyymikäsittelyä. Kananmunalle valittiin kuitenkin uuttokäsittely pepsiinillä tehokkaimman uuttokäsittelyn varmistamiseksi. Kun uuttovaiheessa käytettiin pankreatiinia, huomattiin keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuuden olevan pienempi kuin ilman entsyymikäsittelyä. Pankreatiinilla käsitelty keltuaisnäytteet päätettiin analysoida myös UHPLC-menetelmällä, jotta voitiin varmistua B₁₂-vitamiinipitoisuuden pienenemisestä pankreatiinikäsittelyssä.

Kirjolohelle saatiin selkeästi suurin B₁₂-vitamiinipitoisuus pepsiinillä, kun taas silakalle suurin B₁₂-vitamiinipitoisuus saatiin pankreatiinikäsittelyllä 1,5 h (kuva 4). Tämän

perusteella kirjolohelle valittiin uuttokäsittely pepsiinillä ja silakalle uuttokäsittely pankreatiinilla. Maidolle saadut pitoisuudet eivät eronneet eri uuttokäsittelyillä, mutta pankreatiinia käytettäessä tuloksissa oli suurempi hajonta (variaatiokerroin yli 10 %). Siksi maito- ja jogurttinäytteille valittiin uuttokäsittely pepsiinillä. Myös naudan sisäpaistilla ei havaittu selkeitä eroja B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa entsyymikäsittelyiden välillä, joten lihanäytteille valittiin pepsiinikäsittely, koska sillä saatiin hieman suurempi B₁₂-vitamiinipitoisuus ja rinnakkaismäärittelyssä oli vähiten hajontaa. Näiden lisäksi myös hyönteisille valittiin käsittely pepsiinillä niiden lihaa muistuttavan proteiinkoostumuksen vuoksi.



Kuva 4. Esikokeisiin valitun juuston, kananmunan keltuaisen, kirjolohen, maidon, naudan sisäpaistin ja silakan B₁₂-vitamiinipitoisuus tuorepainoa (tp) kohden. Määrittäminen on tehty mikrobiologisella menetelmällä eri uuttomenetelmiä (1-7) käyttäen. Keltuaisella uuttomenetelmällä nro 7 ja naudan sisäpaistilla uuttomenetelmällä nro 1 ilmoitettu pitoisuuksien vaihteluväli (n = 2), muilla ilmoitettu keskihajonta (n = 3).

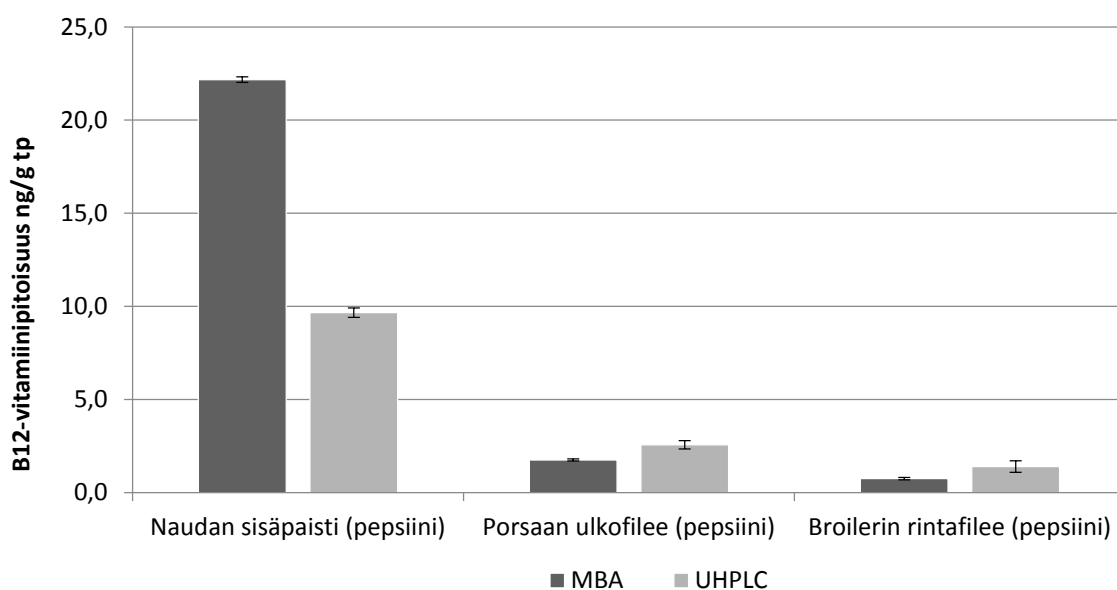
Taulukko 6. Esikokeiden perusteella elintarvikkeille valitut uutto- ja entsyymikäsittelyt, joita käytettiin varsinaisissa määrittelyissä.

Elintarvike	Käsittely
Maito ja jogurtti	Pepsiini (0,5 h, pH 4,5)
Juustot	Pankreatiini (1,5 h, pH 6,2)
Kananmuna	Pepsiini (0,5 h, pH 4,5)
Lihat ja maksat	Pepsiini (0,5 h, pH 4,5)
Kirjolohi	Pepsiini (0,5 h, pH 4,5)
Silakka	Pankreatiini (1,5 h, pH 4,5)
Hyönteiset	Pepsiini (0,5 h, pH 4,5)

3.2.2 Näytteiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet

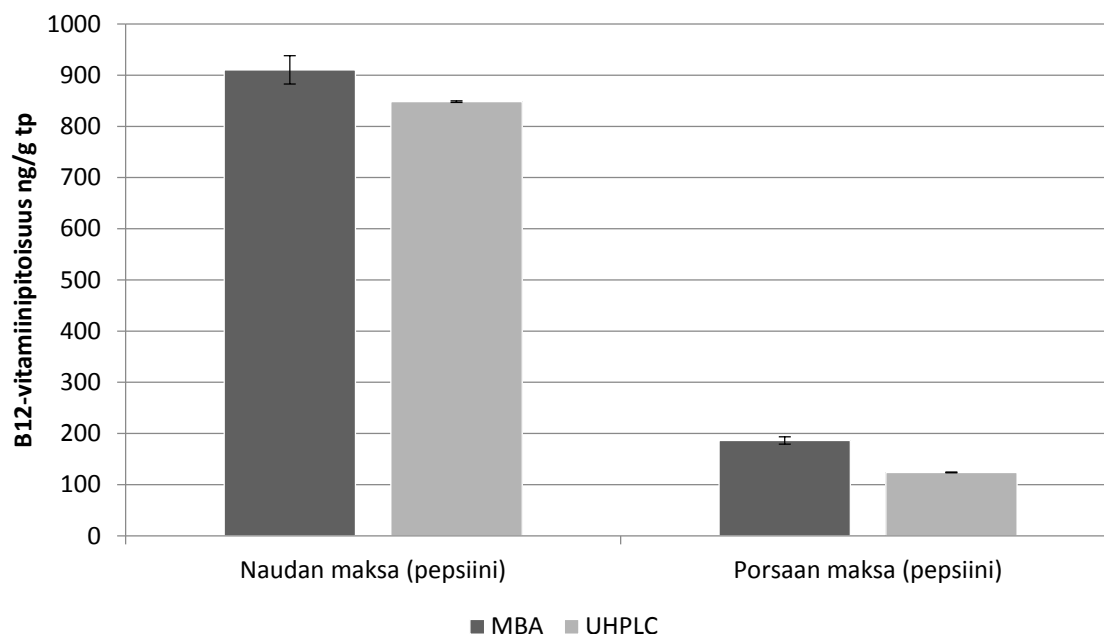
3.2.2.1 Liha ja kala

Naudan sisäpaistissa oli B₁₂-vitamiinia huomattavasti enemmän kuin porsaan ulkofileessä tai broilerin rintafileessä (kuva 5). UHPLC-menetelmällä määritetty naudan sisäpaistin B₁₂-vitamiinipitoisuus oli 10 ng/g tuorepainoa kohden (tp) ja mikrobiologisella menetelmällä se oli 22 ± 0,1 ng/g tp. Porsaan ulkofileen B₁₂-vitamiinipitoisuus oli UHPLC-menetelmällä 3 ± 0,1 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 2 ng/g tp. Broilerin rintafileessä B₁₂-vitamiinipitoisuus oli sama molemmilla menetelmillä, 1 ng/g tp.



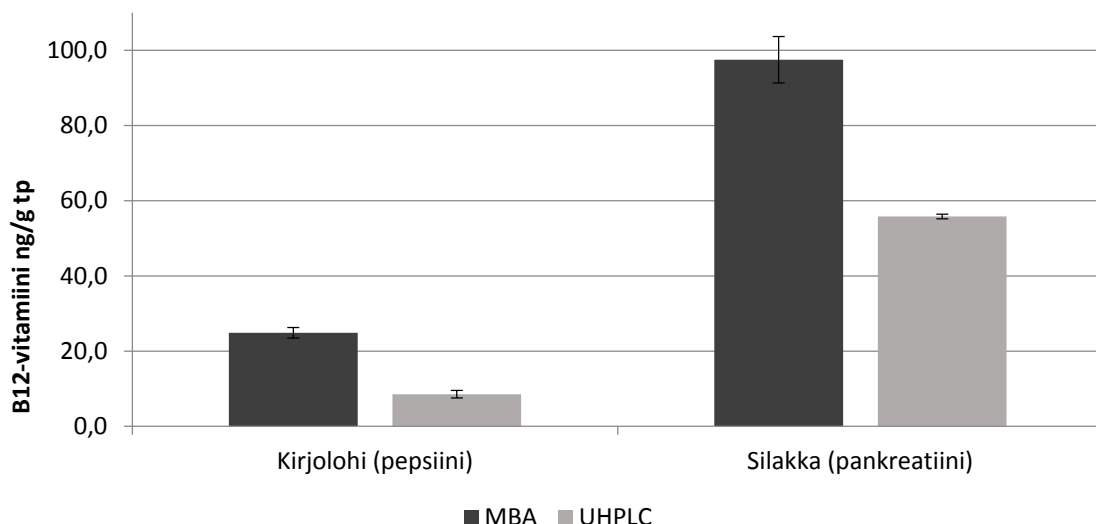
Kuva 5. Naudan sisäpaistin, porsaan ulkofileen ja broilerin rintafileen B₁₂-vitamiinipitoisuus tuorepainoa (tp) kohden määritettynä mikrobiologisella menetelmällä (MBA) ja erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografisella menetelmällä (UHPLC) (MBA: n = 3 ja UHPLC: n = 2). MBA-menetelmällä ilmoitettu keskihajonta ja UHPLC-menetelmällä ilmoitettu vaihteluväli. Suluissa on ilmoitettu uuttokäsittelyssä käytetty entsyymi.

Naudan maksassa B₁₂-vitamiinia oli huomattavasti enemmän kuin porsaan maksassa (kuva 6). Lisäksi MBA-tulokset olivat suurempia kuin UHPLC-tulokset. UHPLC-menetelmällä määritettynä naudan maksan B₁₂-vitamiinipitoisuus oli 848 ng/g tp ja porsaan maksan 124 ng/g tp. Mikrobiologisella menetelmällä määritettynä vastaavat tulokset olivat 910 ± 28 ng/g tp ja 186 ± 7 ng/g tp.



Kuva 6. Naudan ja porsaan maksan B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella (MBA) ja UHPLC-menetelmällä (MBA: n = 3 ja UHPLC: n = 2) tuorepainoa (tp) kohden. MBA-menetelmällä ilmoitettu keskihajonta ja UHPLC-menetelmällä ilmoitettu vaihteluväli. Suluissa on ilmoitettu uuttokäsittelyssä käytetty entsyymi.

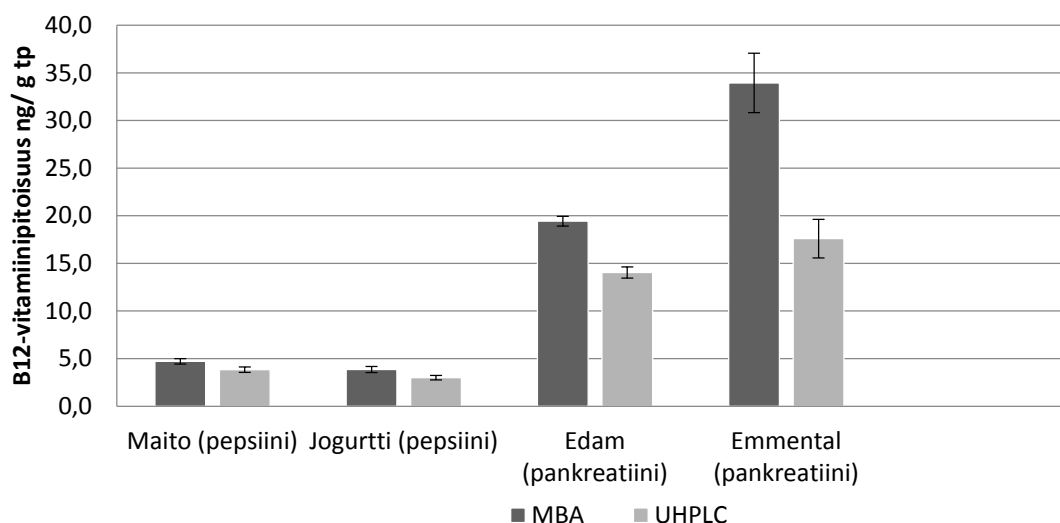
Kirjolohessa oli vähemmän B₁₂-vitamiinia kuin silakassa ja myös kaloilla MBA-tulokset olivat suurempia kuin UHPLC-tulokset (Kuva 7). Kirjolohen B₁₂-vitamiinipitoisuus UHPLC-menetelmällä oli 9 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 25 ± 1 ng/g tp. Silakan B₁₂-vitamiinipitoisuus UHPLC-menetelmällä oli 56 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 98 ± 6 ng/g tp.



Kuva 7. Kirjoloheen ja silakan B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella (MBA) ja UHPLC-menetelmällä (MBA: n = 3 ja UHPLC: n = 2) tuorepainoa (tp) kohden. MBA-menetelmällä ilmoitettu keskihajonta ja UHPLC-menetelmällä ilmoitettu vaihteluväli. Suluissa on ilmoitettu uutokäsittelyssä käytetty entsyymi.

3.2.2.2 Maitotuotteet ja kananmuna

Juustoissa oli B₁₂-vitamiinia huomattavasti enemmän kuin maidossa ja jogurtissa (kuva 8). Emmental-juuston B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi saatiin UHPLC-menetelmällä 18 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 34 ± 3 ng/g tp. Edam-juustossa B₁₂-vitamiinia oli vähemmän kuin Emmentalissa, UHPLC-menetelmällä pitoisuus oli 14 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 19 ± 1 ng/g tp. Maidon B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi saatiin UHPLC-menetelmällä 4 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 5 ± 0,3 ng/g tp. Jogurtin B₁₂-vitamiinipitoisuus oli UHPLC-menetelmällä 3 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 4 ± 0,3 ng/g tp.



Kuva 8. Maidon, jogurtin ja juustojen, Edamin ja Emmentalin, B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella (MBA) ja UHPLC-menetelmällä (MBA: n = 3 ja UHPLC: n = 2). MBA-menetelmällä ilmoitettu keskihajonta, UHPLC-menetelmällä ilmoitettu vaihteluväli. Suluissa ilmoitettu uutokäsittelyssä käytetty entsyymi.

Keltuaisesta määritettyyn B₁₂-vitamiinipitoisuuteen vaikutti käytetty entsyymikäsittely (taulukko 7). Ilman entsyymikäsittelyä keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuus oli UHPLC-menetelmällä 13 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 39 ± 2 ng/g tp, kun kolmen tunnin pankreatiinikäsittelyllä B₁₂-vitamiinia ei havaittu ollenkaan UHPLC-menetelmällä ja mikrobiologisella menetelmälläkin vain 1 ± 0,8 ng/g tp. Pepsiinillä käsitellystä keltuaisesta ei enää tehty UHPLC-määrittystä, koska pankreatiinin kanssa havaittiin suuria ongelmia. Kun pelkän valkuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuutta määritettiin, valkuainen hyytyi uuton yhteydessä entsyymikäsittelystä huolimatta, joten B₁₂ -vitamiinin eristys valkuaisen proteiinirakenteesta ei onnistunut ja pitoisuutta ei voitu määrittää.

Taulukko 7. Keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella menetelmällä (MBA) ja UHPLC-menetelmällä ilman entsyymikäsittelyä uutossa ja 1,5 tunnin ja 3 tunnin pankreatiinikäsittelyllä uuton yhteydessä. tp = tuorepaino

Uutto	Pitoisuus ng/g tp	
	MBA (n = 3)	UHPLC (n = 1)
ilman entsyymiä	39 ± 2	13
1,5 h pankreatiini, pH 6,2, 0,2 g	22 ± 5	1
3 h pankreatiini, pH 6,2, 0,2 g	1 ± 0,8	0

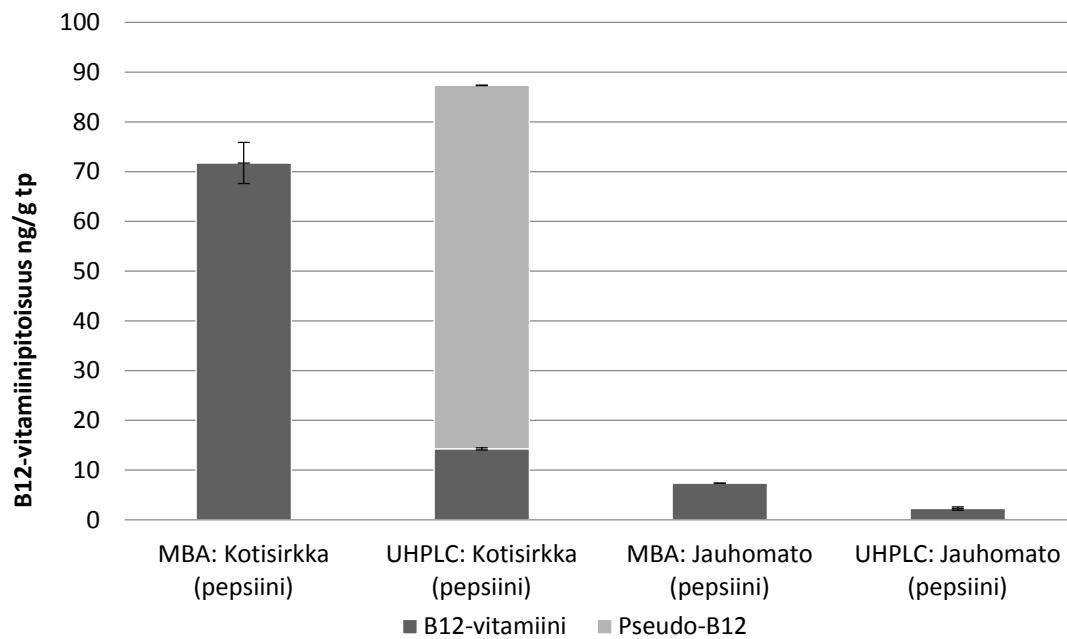
Pankreatiinin aiheuttamista ongelmista huolimatta B₁₂-vitamiinipitoisuus määritettiin mikrobiologisella menetelmällä vielä kolmen eri kananmunatuottajan keltuaisista (Kultamuna, Laitilan kanatarha ja Siwa) ilman entsyymikäsittelyä ja pepsiiniä käyttäen. Pepsiinillä saatiin suurempia B₁₂-vitamiinipitoisuuksia kuin oli saatu pankreatiinilla tai ilman entsyymiä (taulukko 8). Esimerkiksi Kultamunan keltuaisessa B₁₂-vitamiinipitoisuus oli ilman entsyymikäsittelyä 31 ± 1 ng/g tp ja pepsiinikäsittelyllä 64 ± 1 ng/g tp. Myös Laitilan kanatarhan ja Siwan keltuaisissa B₁₂-vitamiinipitoisuus oli suurempi pepsiinikäsittelyllä, mutta näillä keltuaisilla variaatiokerroin oli rinnakkaisista tuloksista yli 10 %, joten rinnakkaisissa näytteissä oli myös suuri hajonta.

Taulukko 8. Kultamunan, Laitilan kanatarhan ja Siwa-munien keltuaisien B₁₂-vitamiinipitoisuus tuorepainoa (tp) kohden mikrobiologisella menetelmällä (MBA) pepsiini-uutolla ja ilman entsyymikäsittelyä uutossa.

Keltuainen	MBA: ilman entsyymiä (ng/g tp)	MBA: pepsiini 0,5 h (ng/g tp)
Kultamuna	31 ± 1	64 ± 1
Laitilan kanatarha	27 ± 2	50 ± 5
Siwa	24 ± 1	53 ± 9

3.2.2.3 Hyönteiset

Kotisirkassa oli B₁₂-vitamiinia enemmän kuin jauhomadossa (kuva 9). Kotisirkan B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi saatiin mikrobiologisella menetelmällä 72 ± 4 ng/g tp. UHPLC-määrityksessä havaittiin, että osa kotisirkan sisältämästä B₁₂-vitamiinista olikin pseudo-B₁₂-vitamiinia. UHPLC-määrityksessä B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi saatiin 14 ng/g tp ja sen lisäksi kotisirkassa oli 73 ng/g tp pseudo-B₁₂-vitamiinia. Jauhomadon B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi saatiin UHPLC-menetelmällä 2 ng/g tp ja mikrobiologisella menetelmällä 7 ng/g tp.



Kuva 9. Kotisirkkan ja jauhomadon B₁₂-vitamiinipitoisuus mikrobiologisella (MBA) ja UHPLC-menetelmällä (MBA: kotisirkka n = 3 ja jauhomato n = 2, UHPLC: n = 2). Kuvassa ilmoitettu kotisirkalla MBA-menetelmällä keskihajonta ja muilla vaihteluväli. Suluissa on ilmoitettu uuttokäsittelyssä käytetty entsyymi. Pseudo-B₁₂-vitamiinin pitoisuus on määritetty käyttäen syanokobalamiinin standardisuoraa.

3.3 Pohdinta

3.3.1 Esikokeiden hyödyllisyys

Esikokeiden tavoitteena oli tutkia erilaisten uuttomenetelmien tehokkuutta B₁₂-vitamiinin uutossa ja mahdollisesti löytää yksi eri elintarvikeryhmille sopiva uuttomenetelmä. Esikokeet osoittautuivatkin erittäin tarpeellisiksi, koska tulosten perusteella jouduttiin toteamaan, että kaikille näytteille ei voitu käyttää samaa entsyymikäsittelyä uuton yhteydessä. Tämän tutkimuksen näytevalikoimassa oli proteiini- ja rasvapitoisuudeltaan eroavia elintarvikkeita. Esikokeiden alussa arvioitiin, että käsittely pankreatiinilla voisi toimia monelle elintarvikeryhmälle. Kirjallisuuden perusteella oli havaittu, että suuri proteiini- ja/tai rasvapitoisuus voi häiritä B₁₂-vitamiinin määrittystä ja pankreatiinin sisältämän entsyymien seoksen arvioitiin ratkaisevan tämän ongelman (Ball 2006). Pepsiini, vain proteiineja pilkkovana entsyyminä, osoittautui kuitenkin sopivaksi suuremmalle osalle tutkimuksen näytteistä, mutta varsinkin paljon rasvaa sisältäville juustonäytteille se ei toiminut.

Pankreatiinikäsittely valittiin esikokeiden perusteella silakalle ja juustoille ja pepsiniinikäsittely kirjolohelle, keltuaiselle, maidolle ja jogurtille, lihanäytteille ja hyönteisille. Silakalla, juustoilla ja kirjolohella pitoisuuserot olivat selkeät, kun vertailtiin pankreatiinia ja pepsiniä, joten entsyymikäsittelyn valinta näille oli selvä. Verratut entsyymikäsittelyt antoivat samansuuruiset B₁₂-vitamiinipitoisuudet maidolle, mutta pankreatiiniuutoissa havaittiin rinnakkaisten määritysten välillä enemmän hajontaa. Myös naudan sisäpaistilla ei ollut selkeitä eroja B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa pankreatiini- ja pepsiniinikäsittelyn välillä, mutta tarkasteltaessa rinnakkaismääritysten hajontaa, huomattiin, että pankreatiinikäsittelyllä hajontaa oli selvästi enemmän. Tämän perusteella epäiltiin, että pankreatiini ei mahdollisesti jakautunut tasaisesti näytteeseen.

Kun keltuaisnäytteelle tehtiin pankreatiinikäsittely, B₁₂-vitamiinipitoisuus pieneni verrattuna ilman entsyymikäsittelyä uutettuun keltuaisnäytteeseen. Syyn epäiltiin johtuvan esimerkiksi yhdisteistä, jotka jotenkin estävät B₁₂-vitamiinin vapautumista elintarvikemateriaalista tai tuhoavat B₁₂-vitamiinia. Levine ja Doscherholmen (1983) havaitsivat kananmunan sisältävän ainakin proteiineja, kobalafiliinejä (cobalaphilins), jotka estivät B₁₂-vitamiinin imeytymistä, joten epäiltiin, että keltuaisessa saattoi olla myös yhdisteitä, esimerkiksi proteiineja tai lipidejä, jotka vaikuttivat B₁₂-vitamiinin pysyvyyteen tai vapautumiseen. Pepsiniinillä B₁₂-vitamiinipitoisuus oli huomattavasti suurempi, joten saattoi olla mahdollista, että pepsini taas pilkkoi näitä yhdisteitä tai pelkällä proteaasilla yhdisteet eivät vapautuneet keltuaisen rakenteesta.

Keitto 30 minuutin ajan uuton yhteydessä denaturoi proteiineja, joten osalle elintarvikkeista se on riittävä tapa varmistaa tehokas B₁₂-vitamiiniuutto, mutta esimerkiksi tässä tutkimuksessa Edam- ja Emmental-juusto sisälsivät niin paljon rasvaa, että pankreatiinin sisältämää lipaasia tarvittiin rasvan pilkkomiseen ja tehokkaimman uuton varmistamiseen. Tässä tutkimuksessa verrattiin myös pepsiniinikäsittelyn sisältämää uuttoa ja ilman entsyymikäsittelyä olevaa uuttoa ja havaittiin, että esimerkiksi kirjolohelle pepsiniin käyttö oli kuitenkin tarpeellinen määritetyn B₁₂-vitamiinipitoisuuden parantamiseksi, vaikka uutto sisälsikin jo 30 minuutin keittämisen. Siksi se valittiin myös muille liha- ja kalaelintarvikkeille varmistamaan tehokas uuttuminen. Mahdollisesti myös pH:ta säätämällä vielä happamemmaksi olisi voitu parantaa B₁₂-vitamiinin vapautumista ilman entsyymikäsittelyä, koska ihmisen elimistössä hapan mahaneste vapauttaa B₁₂-vitamiinin elintarvikemateriaalista, mutta pH:n säätöä yhtä happamaksi kuin mahaneste ei kokeiltu tässä tutkimuksessa (Nielsen ym. 2012).

Jatkotutkimustarve olisi varsinkin kananmunalle sopivan uuttomenetelmän löytämisessä. Keltuaisessa havaittavaan B₁₂-vitamiinipitoisuuteen vaikuttaa ilmeisesti sen sisältämät vitamiinia sitovat tai pilkkovat yhdisteet, joten näiden yhdisteiden inaktivoiminen olisi erittäin tärkeää (Levine ja Doscherholmen 1983). Valkuainen taas sisältää paljon proteiinia ja kuumauuton yhteydessä havaittiinkin, että pepsiinikäsittelystä huolimatta valkuaisen proteiinit koaguloituivat. Valkuainen tarvitsisi mahdollisesti voimakkaamman entsyymikäsittelyn proteiinirakenteen rikkomiseksi ja B₁₂-vitamiinin vapauttamiseksi.

Entsyymikäsittelyä käytettäessä pitää myös varmistua entsyymin tasaisesta jakautumisesta näytteeseen. Pankreatiini jouduttiin lisäämään näytteeseen jauheena sen huonon liukenevuuden vuoksi, kun taas pepsiini voitiin lisätä liuksena. Pankreatiinia käytettäessä havaittiin liha- ja maitonäytteissä suurta hajontaa rinnakkaisten määritysten B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa, joka saattoi juuri johtua siitä, että entsyymi ei ollut sekoittunut näytteisiin kunnolla jauheena lisättäessä.

Elintarvikeryhmät ovat niin monimuotoisia sisältäen erilaisia hiilihydraatti-, proteiini- ja rasvapitoisuuksia, joten kaikille elintarvikeryhmille sopivan uuttomenetelmän kehittäminen voi olla hyvin vaikeaa ja joka tapauksessa jatkotutkimusta vaativaa. Kumar ym. (2010) suosittivat, että jokainen laboratorio selvittäisi sopivimman uuttomenetelmän käyttämälleen näyttemateriaalille. Tämä voisikin olla selkein tapa varmistua tutkimuksen yhteydessä oikeista B₁₂-vitamiinin saannoista.

3.3.2 Elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet eri elintarvikeryhmissä

3.3.2.1 Liha ja kala

Tässä tutkimuksessa UHPLC-menetelmällä määritetyt B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat liha- ja kalaelintarvikkeissa pienemmät kuin mikrobiologisella menetelmällä määritetyt pitoisuudet. Suurimmat erot (yli 50 %) pitoisuuksissa menetelmien välillä olivat kirjolohifileessä ja naudan sisäpaistissa (taulukko 9). Myös silakkafileessä ja porsaan maksassa pitoisuuserot menetelmien välillä olivat suhteellisen suuret, silakkafileessä B₁₂-vitamiinipitoisuus oli UHPLC-menetelmällä 43 % ja porsaan maksassa 33 % pienempi kuin mikrobiologisella menetelmällä. Naudan maksan B₁₂-vitamiinipitoisuus oli UHPLC-menetelmällä vain 7 % pienempi kuin mikrobiologisella menetelmällä. Broilerin rintafileessä menetelmien välillä ei ollut eroa B₁₂-vitamiinipitoisuudessa. Porsaan

ulkofileessä pitoisuus oli suurempi UHPLC-menetelmällä. Broilerin rintafileen ja porsaan ulkofileen sisältämä B₁₂-vitamiinipitoisuus oli kokonaisuudessaan hyvin pieni, joten tästä saattoi johtua, ettei menetelmien välillä havaittu pitoisuuseroja. Broilerinliha- ja porsaanlihauutteita olisi ollut tarpeen konsentroida enemmän molempiin menetelmiin. Pitoisuudet olivat nyt hyvin lähellä määritysrajaa. Pseudo-B₁₂-vitamiinia ei havaittu liha- ja kalanäytteiden kromatogrammeissa.

Tässä tutkimuksessa naudanlihan B₁₂-vitamiinipitoisuus oli paljon suurempi kuin broilerin ja porsaan lihan. Ero johtuu märehitijöiden ruuansulatuskanavassa olevista B₁₂-vitamiinia tuottavista mikrobeista (Burgess ym. 2009). Porsaat ja broilerit saavat tarvitsemansa B₁₂-vitamiinin ruokinnan yhteydessä rehusta, joten rehussa käytetty B₁₂-vitamiinin määrä vaikuttaa ei-märehitijöiden lihan sisältämään B₁₂-vitamiinin määrään. Odotetusti molemmat maksat, naudan ja porsaan, sisälsivät B₁₂-vitamiinia eniten, koska maksa toimii B₁₂-vitamiinin varastona. Havaittu kirjolohi- ja silakkafileen B₁₂-vitamiinipitoisuusero selittyy todennäköisesti erilaisella ympäristöllä ja siitä johtuvalla erolla ravinnossa. Nettleton ja Exler (1992) havaitsivat tutkimuksessaan eroja B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa villikalajien ja kasvatettujen kalojen välillä, minkä ajateltiin johtuvan juuri ravinnosta. Kirjolohea on kasvatettuna kalana ruokittu rehulla, kun taas silakka villikalana on syönyt vaihtelevaa ravintoa, joten B₁₂-vitamiinin saanti on näillä kalalajeilla ollut hyvin erilainen. Eläinten ruokinnassa käytettyjen rehujen koostumus on myös saattanut muuttua vuosien aikana, koska nykyisin kiinnitetään enemmän huomiota myös eläinten ravinnon saantiin. Tällöin B₁₂-vitamiinin saanti on voinut muuttua, joka hankaloittaa elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksien vertailua aikaisemmin määritettyihin pitoisuuksiin.

Tämän tutkimuksen lisäksi myös useammassa B₁₂-vitamiinin määritysmenetelmiä toisiinsa vertailevissa tutkimuksissa on todettu, että mikrobiologisella menetelmällä pitoisuudet ovat olleet suuremmat kuin nestekromatografisella tai muulla vertailuun käytetyllä menetelmällä määritetyt (Watanabe ym. 1998; Heudi ym. 2006; Guggisberg ym. 2012). Guggisbergin ym. (2012) tutkimuksessa mikrobiologisella ja nestekromatografisella menetelmällä saadut B₁₂-vitamiinipitoisuudet naudan- ja porsaanlihalle erosivat yhtä paljon kuin tässä tutkimuksessa. Naudanlihassa pitoisuusero menetelmien välillä oli noin 5–7 ng/g ja porsaanlihassa noin 1–6 ng/g. Sen lisäksi Guggisbergin ym. (2012) tutkimuksessa naudan- ja porsaanlihan nestekromatografisella menetelmällä määritetyt B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat hyvin samanlaiset kuin nyt UHPLC-menetelmällä määritetyt pitoisuudet.

Taulukko 9. Nestekromatografisen (UHPLC) ja mikrobiologisen (MBA) määrittymenetelmän välinen ero (%) lihojen ja kalojen B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa ja UHPLC:llä määritettyjen pitoisuuksien vertailu koostumustietokanta Finelin (2017) arvoihin.

Elintarvike	B ₁₂ -vitamiinipitoisuus (ng/g) tp			Ero % (UHPLC < MBA) ¹	Fineli (ng/g)	Ero % (UHPLC < Fineli) ²
	MBA	UHPLC	Erotus (MBA - UHPLC)			
Naudan sisäpaisti	22	10	12	55	14	29
Broilerin rintafilee	1	1	0	0	10	90
Porsaan ulkofilee	2	3	- 1	33 % suurempi	7	57
Naudan maksa	910	848	62	7	1100	23
Porsaan maksa	186	124	62	33	400	69
Kirjolohifilee	25	9	16	64	50	82
Silakkafilee	98	56	42	43	149	62

1) Kuinka monta % MBA-tulosta pienempi UHPLC-tulos on.

2) Kuinka monta % Fineli-arvoa pienempi UHPLC-tulos on.

tp = tuorepaino

Elintarvikekoostumustietokanta Finelissä (2017) ilmoitettuihin B₁₂-vitamiinipitoisuuksiin verrattaessa UHPLC-menetelmällä määritetyt B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat pienemmät kaikille liha- ja kalanäynteille (taulukko 9). Naudan maksassa ero oli pienin, UHPLC-menetelmällä määritetty pitoisuus oli 23 % pienempi kuin Finelin (2017) arvo. Broilerin rintafileeessä pitoisuusero taas oli suurin, UHPLC-menetelmällä määritetty pitoisuus oli 90 % pienempi kuin Finelin (2017) arvo. Ruotsin koostumustietokanta Livsmedelsdatabasenin (2018) mukaan broilerin rintafileen B₁₂-vitamiinipitoisuus on vain 2,6 ng/g, joten sen ilmoittama arvo on paljon lähempänä tässä tutkimuksessa määritettyä.

Fineli-tietokannassa lihojen B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat pääosin peräisin Tanskan elintarvikekoostumustaulukosta vuodelta 1996 (taulukko10) (Moller ja Saxholt 1996; Fineli 2017). Tanskan vuoden 1996 elintarvikekoostumustaulukossa ja nykyisessä vuoden 2018 elintarvikekoostumustietokannassa, Levnedsmiddeltabeller, lihojen B₁₂-vitamiinipitoisuuden viitteeksi on ilmoitettu Søndergaardin julkaisu vuodelta 1979. Søndergaard (1979) on määrittänyt B₁₂-vitamiinipitoisuuden mikrobiologisella menetelmällä. Ruotsin koostumustietokannassa naudanlihalle on ilmoitettu analyysimenetelmäksi mikrobiologinen menetelmä. Fineli-tietokannassa (2017)

kirjolohifileen B₁₂-vitamiinipitoisuus on peräisin vuoden 1991 koostumustaulukosta ja pitoisuus on määritetty mikrobiologisesti. Ruotsin koostumustietokannassa taas silakkafileen B₁₂-vitamiinipitoisuus on määritetty mikrobiologisesti (Livmedelsdatabasen 2018). Tanskan koostumustietokannassa kirjolohi- ja silakkafileen B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat peräisin USA:n koostumustietokannasta USDA:sta, mutta silti käytettyä määritysmenetelmää ei ollut mahdollista selvittää (Levnedsmiddeltabeller 2018). Eri maiden koostumustietokannoista on siis pääosin käytetty B₁₂-vitamiinin määrittämiseen mikrobiologista menetelmää. Tietokannoissa käytetyt julkaisut ovat olleet myös aika vanhoja. Mikrobiologisen menetelmän käytön ja vanhojen B₁₂-vitamiiniarvojen perusteella voisikin olla tarpeen määrittää liha- ja kalaelintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksia uudelleen Fineli-tietokantaan.

Taulukko 10. Suomen, Ruotsin ja Tanskan elintarvikekoostumustietokantojen B₁₂-vitamiinipitoisuudet, arvon alkuperä sekä määrittämisessä käytetty menetelmä naudan, porsaan ja broilerin lihalle, naudan ja porsaan maksoille ja kirjolohelle ja silakalle (Fineli 2017; Levnedsmiddeltabeller 2018; Livsmedelsdatabasen 2018).

Näyte	Fineli Suomi			Livsmedelsdatabasen Ruotsi			Levnedsmiddeltabeller Tanska		
	Pitoi- suus ng/g tp	Arvon alku- perä	Analyysi- menetelmä	Pitoi- suus ng/g tp	Arvon alku- perä	Analyysi- menetelmä	Pitoi- suus ng/g tp	Arvon alku- perä	Analyysi- menetelmä
Naudan paisti	14	Levned smiddel tabeller 1996 ¹⁾	MBA ^{a)}	11,9	Viralli- nen labora- torio	MBA ^{a)}	14	³⁾	MBA ^{a)}
Porsaan ulkofilee	7	Levned smiddel tabeller 1996 ¹⁾	MBA ^{a)}	7,6	Viralli- nen labora- torio	*)	7	³⁾	MBA ^{a)}
Naudan maksa	1100	Levned smiddel tabeller 1996 ¹⁾	MBA ^{a)}	1100	Viralli- nen labora- torio	*)	1100	³⁾	MBA ^{a)}
Porsaan maksa	400	Levned smiddel tabeller 1996 ¹⁾	MBA ^{a)}	400	*)	*)	400	³⁾	MBA ^{a)}
Broilerin rintafilee	10	Lasket- tu saman- kaltai- sesta tuot- teesta	*)	2,6	Viralli- nen labora- torio	*)	3,1	USDA Data- base ⁴⁾	*)
Kirjolo- hifilee	50	The compo- sition of foods ²⁾	MBA ^{a)}	50	*)	*)	39,2 ^{b)}	USDA Data- base ⁴⁾	*)
Silakka- filee	149	Lasket- tu resep- tistä	*)	93	Viralli- nen labora- torio	MBA ^{a)}	101 ^{b)}	USDA Data- base ⁴⁾	*)

*) käytettyä analyysimenetelmää ei pystytty jäljittämään

¹⁾ Moller ja Saxholt 1996. Koostumustaulukossa annettu viite: Søndergaard 1979.

²⁾ Holland ym. 1991.

³⁾ Søndergaard 1979.

⁴⁾ USDA Food composition databases. 2018. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/> United States Department of Agriculture Agricultural Research Service.

^{a)} Mikrobiologinen menetelmä: käytetty testiorganismi *L. delbrueckii*.

^{b)} kokonainen kala

tp = tuorepaino

3.3.2.2 Maitotuotteet ja kananmuna

Maitotuotteista ja kananmunan keltuaisesta UHPLC-menetelmällä määritetyt B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat myös pienemmät kuin mikrobiologisella menetelmällä määritetyt pitoisuudet (taulukko 11). Keltuaisella ero oli suurin. UHPLC-menetelmällä määritetty pitoisuus oli 67 % pienempi kuin mikrobiologisella menetelmällä määritetty pitoisuus. Pienin ero (20 %) menetelmien välillä oli rasvattomalla maidolla. Myös Emmental-juustolla pitoisuusero menetelmien välillä oli suuri, sillä UHPLC:llä määritetty pitoisuus oli 47 % pienempi kuin mikrobiologisella menetelmällä määritetty pitoisuus. Kromatogrammeissa ei havaittu inaktiivista pseudo-B₁₂-vitamiinia.

Taulukko 11. Nestekromatografisen (UHPLC) ja mikrobiologisen (MBA) määrittämenetelmän välinen ero (%) maitotuotteiden ja keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa ja UHPLC:llä määritettyjen pitoisuuksien vertailu koostumustietokanta Finelin (2017) arvoihin.

Elintarvike	B ₁₂ -vitamiinipitoisuus (ng/g) tp			Ero % (UHPLC < MBA) ¹	Fineli (ng/g)	Ero % (UHPLC < Fineli) ²
	MBA	UHPLC	Erotus (MBA - UHPLC)			
Edam-juusto	19	14	5	26	21	33
Emmental-juusto	34	18	16	47	20	6
Rasvaton maito	5	4	1	20	4	0
Maustamaton jogurtti	4	3	1	25	4	25
Keltuainen	39	13	26	67	69	81

1) Kuinka monta % MBA-tulosta pienempi UHPLC-tulos on.

2) Kuinka monta % Fineli-arvoa pienempi UHPLC-tulos on.

tp = tuorepaino

Fineli-tietokannan ilmoittamat B₁₂-vitamiinipitoisuudet maitotuotteille ja keltuaiselle ovat maitoa ja Emmental-juustoa lukuun ottamatta huomattavasti suurempia kuin nyt UHPLC-menetelmällä määritetyt pitoisuudet (taulukko 11) (Fineli 2017). Varsinkin keltuaisessa on hyvin suuri ero, sillä UHPLC-menetelmällä määritetty pitoisuus on 81 % pienempi kuin Finelin ilmoittama pitoisuus. Ruotsin koostumustietokanta Livsmedelsdatabasenissa B₁₂-vitamiinipitoisuudet maitotuotteille ja keltuaiselle ovat hieman pienempiä kuin Fineli-

tietokannassa, mutta silti ne ovat suurempia kuin UHPLC:llä määritetyt pitoisuudet (Livsmedelsdatabasen 2018).

Livsmedelsdatabasenin (2018) arvot ovat virallisen laboratorion mikrobiologisesti määrittämiä, joten ne vastaavat kuitenkin hyvin tässä tutkimuksessa mikrobiologisesti määritettyjä B₁₂-vitamiinipitoisuuksia (taulukko 12). Keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuudeksi on tietokannassa ilmoitettu 38,8 ng/g, maidolle 5,9 ng/g ja Edam-juustolle 16 ng/g. Fineli-tietokannan (2017) arvot ovat myös mikrobiologisesti määritettyjä ja peräisin vuoden 1991 koostumustaulukosta. Emmental-juuston ja kananmunan keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat Finelissä silti huomattavasti suuremmat kuin tässä tutkimuksessa mikrobiologisesti määritetyt pitoisuudet. Tanskan elintarvikekoostumustietokannassa maitotuotteiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet ovat pienempiä ja kananmunan keltuaista lukuun ottamatta paljon lähempänä tässä tutkimuksessa UHPLC-menetelmällä määritettyjä pitoisuuksia (Levnedsmiddeltabeller 2018). Juustojen ja maidon arvot ovat Tanskan koostumustietokannassa peräisin Søndergaardin vuoden 1979 julkaisusta ja jogurtin ja kananmunan keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuudet on määrittänyt Tanskan teknillinen yliopisto. Søndergaard (1979) on määrittänyt B₁₂-vitamiinipitoisuuden mikrobiologisella menetelmällä mutta Tanskan teknillisen yliopiston käyttämä menetelmä ei selvinnyt. Fineli-tietokannan (2017) arvot ovat kuitenkin huomattavasti suurempia kuin tässä tutkimuksessa UHPLC-menetelmällä määritetyt maitotuotteiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet. Finelin arvot ovat myös vanhoja, joten voisi olla tarpeen määrittää myös maitotuotteiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksia uudelleen Fineli-tietokantaan nestekromatografisella menetelmällä.

Taulukko 12. Suomen, Ruotsin ja Tanskan elintarvikekoostumustietokantojen B₁₂-vitamiinipitoisuudet, arvon alkuperä sekä määrittämissä käytetty menetelmä Edam- ja Emmental-juustolle, rasvattomalle maidolle, maustamattomalle jogurtille ja kananmunan keltuaiselle (Fineli 2017; Levnedsmiddeltabeller 2018; Livsmedelsdatabasen 2018).

Näyte	Fineli Suomi			Livsmedelsdatabasen Ruotsi			Levnedsmiddeltabeller Tanska		
	Pitoi- suus ng/g tp	Arvon alku- perä	Analyysi- menetelmä	Pitoi- suus ng/g tp	Arvon alku- perä	Analyysi- menetelmä	Pitoi- suus ng/g tp	Arvon alku- perä	Analyysi- menetelmä
Edam- juusto (rasvaa 24-27 %)	21	The compo- sition of foods ¹⁾	MBA ^{a)}	16	Viralli- nen labora- torio	MBA ^{a)}	13,8	²⁾	MBA ^{a)}
Emmen- tal- juusto (rasvaa 27-30 %)	20	The compo- sition of foods ¹⁾	MBA ^{a)}	-	-	-	15	²⁾	MBA ^{a)}
Rasva- ton maito	4	The compo- sition of foods ¹⁾	MBA ^{a)}	5,9	Viralli- nen labora- torio	MBA ^{a)}	4,8	²⁾	MBA ^{a)}
Mausta- maton jogurtti (rasvaa 3 %)	2	The compo- sition of foods ¹⁾	MBA ^{a)}	2,1	Viralli- nen labora- torio	MBA ^{a)}	2,4	DTU ³⁾	*)
Kanan- munan keltu- ainen	69	The compo- sition of foods ¹⁾	MBA ^{a)}	38,8	Viralli- nen labora- torio	MBA ^{a)}	34,2	DTU ³⁾	*)

*) käytettyä analyysimenetelmää ei pystytty jäljittämään

¹⁾ Holland ym. 1991.

²⁾ Søndergaard 1979.

³⁾ DTU. Technical University of Denmark, National Food Institute.

^{a)} Mikrobiologinen menetelmä: käytetty testiorganismi *L. delbrueckii*

tp = tuorepaino

Arkbågen ym. (2003) tutkimuksessa immunoradiometrisesti määritetyt maitotuotteiden B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat myös osittain suurempia kuin tässä tutkimuksessa UHPLC:llä määritetyt. Edam-juuston B₁₂-vitamiinipitoisuus oli Arkbågen ym. (2003) tutkimuksessa 21 ng/g, kun tässä tutkimuksessa UHPLC:llä pitoisuus oli 14 ng/g. Jogurtin mikrobiologisesti määritetty B₁₂-vitamiinipitoisuus oli Arkbågen ym. (2003) tutkimuksessa 3,2 ng/g ja sama pitoisuus saatiin tässä tutkimuksessa UHPLC-määrittämisellä. Maitotuotteiden B₁₂-vitamiinipitoisuudessa voi kuitenkin olla vaihteluita myös muista kuin määrittämenetelmästä johtuvista syistä (Scott ja Bishop 1988; Rutten ym. 2013). Maidossa

on havaittu vaihtelevia B₁₂-vitamiinipitoisuuksia vuodenaikojen ja lehmille syötetyn rehun mukaan, jolla on tällöin vaikutusta kaikkien maidosta tehtyjen tuotteiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksiin (Rutten ym. 2013). Juuston valmistuksessa B₁₂-vitamiinia menetetään vesiliukoiseen heraan, mutta osassa juustoja käytetään kypsytyksessä B₁₂-vitamiinia tuottavia mikrobeja, jolloin juuston B₁₂-vitamiinipitoisuus onkin suurempi kuin maidon (Scott ja Bishop 1988). Emmental-juuston kypsytyksessä käytetään esimerkiksi bakteeria *Propionibacterium freudenreichii*, joka on B₁₂-vitamiinin tuottaja (Arkbåge ym. 2003; Poonam ym. 2012). Tässä tutkimuksessa Emmental- ja Edam-juuston välinen B₁₂-vitamiinin pitoisuusero johtuikin todennäköisesti Emmental-juuston kypsytyksessä käytetystä B₁₂-vitamiinin tuottajabakteerista. Hapanmaitotuotteissa taas B₁₂-vitamiinin määrää saattaa vähentää tuotteen fermentoinnissa käytetty maitohappobakteerikanta (Arkbåge ym. 2003). Todennäköisesti tästä johtuen jogurtin B₁₂-vitamiinipitoisuus olikin tässä tutkimuksessa pienempi kuin maidon.

Tässä tutkimuksessa verrattiin myös eri tuottajien kananmunien B₁₂-vitamiinipitoisuuksia mikrobiologisella menetelmällä. Eri tuottajien kananmunissa ei havaittu suuria eroja B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa, mutta Kultamunan kananmunissa oli kuitenkin noin 10 ng/g enemmän B₁₂-vitamiinia kuin kahden muun tuottajan kananmunissa. Kanoja ruokitaan B₁₂-vitamiinia sisältävällä rehulla, joten todennäköisesti tällaiset erot voivat johtua rehun koostumuksen eroista (Burgess ym. 2009).

3.3.2.3 Hyönteiset

Tässä työssä tutkittujen hyönteisten B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa oli myös eroa mikrobiologisen ja UHPLC-menetelmän välillä (taulukko 13). Jauhomadon B₁₂-vitamiinipitoisuuksien ero eri menetelmien välillä oli pieni. UHPLC:llä määritetty pitoisuus oli vain 5 % pienempi kuin mikrobiologisella menetelmällä määritetty pitoisuus. Kotisirkalla pitoisuuksien ero oli huomattavasti suurempi menetelmien välillä, sillä UHPLC:llä määritetty pitoisuus oli 81 % pienempi. UHPLC-kromatogrammin avulla voitiin varmistaa, että suurin osa mikrobiologisessa määrittämisessä B₁₂-vitamiiniksi määritetystä olikin oikeasti pseudo-B₁₂-vitamiinia, joka on siis ihmiselle inaktiivinen B₁₂-vitamiinin muoto.

Taulukko 13. Nestekromatografisen (UHPLC) ja mikrobiologisen (MBA) määrittämenetelmän välinen ero (%) hyönteisten B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa ja UHPLC:llä määritettyjen pitoisuuksien vertailu kirjallisuudessa julkaistuihin pitoisuuksiin (Finke 2002).

Hyönteiset	B ₁₂ -vitamiinipitoisuus (ng/g) tp					
	MBA	UHPLC	Erotus (MBA - UHPLC)	Ero % (UHPLC < MBA) ¹	Finke 2002 (ng/g)	Ero % (UHPLC < Finke 2002) ²
Kotisirkka	72	14	58	81	53,7	74
Jauhomato	7	2	5	71	5,6	64

1) Kuinka monta % MBA-tulosta pienempi UHPLC-tulos on.

2) Kuinka monta % Finken (2002) arvoa pienempi UHPLC-tulos on.

tp = tuorepaino

Hyönteiset eivät kykene tuottamaan B₁₂-vitamiinia, mutta hyönteisten on mahdollista elää B₁₂-vitamiinia tuottavan mikrobin kanssa symbioosissa (Douglas 2017). Sen lisäksi hyönteiset saavat B₁₂-vitamiinia ravinnon mukana. Syötäväksi kasvatettavia hyönteisiä ruokitaan rehuseoksella, joten sen sisältämällä B₁₂-vitamiinin määrällä on vaikutusta hyönteisten sisältämään B₁₂-vitamiinipitoisuuteen. Verrattuna kirjallisuudessa julkaistuihin kotisirkan ja jauhomadon B₁₂-vitamiinipitoisuuksiin UHPLC:llä määritetyt pitoisuudet olivat yli 50 % pienemmät kuin kirjallisuudessa ilmoitetut arvot (taulukko 13) (Finke 2002). Finken (2002) tutkimuksessa B₁₂-vitamiinin määrittämenetelmää ei kerrottu, mutta verrattuna mikrobiologisen määrittäksen arvoihin menetelmä on todennäköisesti ollut mikrobiologinen. Hyönteisten käyttö elintarvikkeissa on yleistymässä lähivuosina niiden soveltuessa muun muassa proteiinipitoisuuden vuoksi mahdollisiksi lihan korvaajiksi. Seuraavaksi olisikin hyvä määrittää hyönteisten B₁₂-vitamiinipitoisuus luotettavammalla määrittämenetelmällä, jotta saadaan oikeaa tietoa hyönteisten vitamiinipitoisuuksista ja voidaan arvioida kattavasti niiden soveltuvuutta lihan korvaajaksi.

3.3.2.4 Uutto- ja määrittämenetelmän valinta B₁₂-vitamiinin määrittäksessä

Tässä tutkimuksessa UHPLC-menetelmällä määritetyt B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat selvästi pienempiä kuin mikrobiologisella menetelmällä määritetyt. Osalle elintarvikkeita ero oli hyvinkin suuri. Elintarvikkeissa on siis todennäköisesti muita yhdisteitä, kuten deoksiribosideja tai deoksinukleotideja, jotka vaikuttavat positiivisesti mikrobiologiseen määrittäykseen. Mikrobiologinen menetelmä olisikin hyvä korvata nestekromatografisella B₁₂-vitamiinin määrittämenetelmällä tulevaisuudessa, koska mikrobiologisen menetelmän testiorganismien reagoiminen B₁₂-vitamiinin lisäksi myös B₁₂-vitamiinin kaltaisiin tai

korrinoidirakenteeltaan epätäydellisiin yhdisteisiin vääristää huomattavasti elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuuksia. Elintarvikkeille tarvittaisiin myös uutta tutkimusta, jossa kattavasti määritettäisiin eri elintarvikeryhmien B₁₂-vitamiinipitoisuuksia, koska tällä hetkellä julkisesti saatavissa oleva tieto koostumustietokannoissa on osittain jo hyvin vanhaa ja pääasiallisesti määritetty mikrobiologisella menetelmällä. Tästä johtuen ihmisten ruokavaliosta arvioituun B₁₂-vitamiinin saantiin aiheutuu myös virhettä, jolla voi olla merkitystä esimerkiksi silloin, kun arvioidaan tiettyä ruokavaliota noudattavan tai imeytymishäiriöistä kärsivän henkilön B₁₂-vitamiinin saantia. B₁₂-vitamiinin puutosoireet ilmenevät vasta vuosia jatkuneen puutostilan jälkeen ja ovat yleensä hyvin haitallisia terveydelle, joten riittävän B₁₂-vitamiinin saannin varmistamisessa tarvitaan ennakkointia.

Sen lisäksi, että valitaan nestekromatografinen menetelmä määrittämenetelmäksi, jotta analysoidaan vain aktiivista B₁₂-vitamiinin muotoa, on tärkeä kiinnittää huomiota myös uutto- ja entsyymikäsitteilyn valintaan. Tässä tutkimuksessa havaittiin suuriakin eroja B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa eri entsyymejä käytettäessä samalla elintarvikkeella. Esimerkiksi keltuaisella B₁₂-vitamiinipitoisuus pieneni merkittävästi pankreatiinia käytettäessä ja Emmental-juuston B₁₂-vitamiinipitoisuus oli paljon huonompi pepsiinillä kuin pankreatiinilla. Määritettäessä B₁₂-vitamiinipitoisuuksia elintarvikkeista olisikin tärkeää ensin tutkia entsyymi- ja uuttokäsittelyn vaikutusta B₁₂-vitamiinipitoisuuteen tutkittavalla elintarvikkeella.

Uutto- ja entsyymikäsitteilyn ja määrittämenetelmän valinnan lisäksi olisi hyvä ottaa huomioon vielä riittävän edustava näytteenotto elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinin määrittäksessä. Esimerkiksi maidossa on havaittu vaihtelua B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa vuodenaikojen ja käytetyn rehun mukaan ja hapanmaitotuotteissa vaihtelua voi esiintyä muun muassa fermentoinnissa käytettyjen mikrobien takia, jotka kuluttavat B₁₂-vitamiinia (Arkbåge ym. 2003; Rutten ym. 2013). Myös muissa elintarvikkeissa on esiintynyt vaihtelua B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa eri syistä johtuen. Tässä tutkimuksessa hankittiin samaa elintarviketta noin kymmenen kappaletta eri vähittäiskaupoista, joista tehtiin kokoomanäyte, josta B₁₂-vitamiinipitoisuus määritettiin. Kokoomanäytettä haluttiinkin käyttää mahdollisten B₁₂-vitamiinin vaihteluiden takia, jotta tulos olisi mahdollisimman luotettava. Analysoimalla vain yksittäisiä elintarvikkeita ei olisi ollut mahdollista huomioida eri syistä johtuvien vaihteluiden vaikutusta B₁₂-vitamiinipitoisuuteen.

4 PÄATELMÄT

Tässä tutkimuksessa määritettiin B₁₂-vitamiinipitoisuus keskeisistä eläinperäisistä elintarvikkeista. Kukin elintarvikenäyte oli koostettu noudattaen edustavan näytteenoton periaatteita. Esikokeilla valittiin kullekin elintarviketyypille sopivin uutto- ja entsyymikäsittely. Näytteiden vitamiinipitoisuudet määritettiin mikrobiologisella ja UHPLC-menetelmällä. Tässä tutkimuksessa havaittiin, että uutto pepsiinikäsittelyllä paransi määritettyä B₁₂-vitamiinipitoisuutta kirjolohella, keltuaisella, naudan sisäpaistilla ja maidolla, kun taas pankreatiinikäsittely paransi määritettyä B₁₂-vitamiinipitoisuutta juustoilla ja silakalla. Pankreatiinikäsittely osoittautuikin soveltuvan hyvin enemmän rasvaa sisältäville elintarvikkeille. Kananmunan B₁₂-vitamiinipitoisuuden määrittäminen osoittautui kuitenkin erityisen haastavaksi pankreatiinikäsittelyn pienentäessä keltuaisen B₁₂-vitamiinipitoisuutta huomattavasti. Tutkimuksia kananmunan B₁₂-vitamiinin määrittämiseen soveltuvasta uuttokäsittelystä tarvitaankin lisää.

Tämän tutkimuksen elintarvikkeista odotetusti eniten B₁₂-vitamiinia oli naudan ja porsaan maksan lisäksi silakassa, juustoissa ja naudan sisäpaistissa. Näiden kaikkien B₁₂-vitamiinipitoisuus oli yli 10 ng/g tp. Vähiten B₁₂-vitamiinia oli broilerin rintafileeessä. Maksassa B₁₂-vitamiinia oli eniten, koska se toimii B₁₂-vitamiinin varastona. Naudanlihassa B₁₂-vitamiinipitoisuus oli broilerin ja porsaan lihaa suurempi, koska naudalla märehtijänä on ruuansulatuskanavassaan B₁₂-vitamiinia tuottavia mikrobeja, kun taas broileri ja porsas saavat tarvitsemansa B₁₂-vitamiinin rehun mukana. Silakassa B₁₂-vitamiinia oli huomattavasti enemmän kuin kirjolohessa. Yleensä B₁₂-vitamiinipitoisuuden erot eri kalalajien välillä johtuvat erilaisesta ympäristöstä ja ravinnosta. Juustoista Emmentalissa oli B₁₂-vitamiinia enemmän kuin Edamissa. Tämä todennäköisesti johtui Emmental-juuston valmistuksessa käytettävästä bakteerista *P. freudenreichii*, joka on B₁₂-vitamiinin tuottaja. Maitoa ja jogurttia verrattaessa maidossa oli B₁₂-vitamiinia hieman enemmän, mikä johtui todennäköisesti hapanmaitotuotteiden fermentoinnissa käytettävistä maitohappobakteereista, jotka voivat kuluttaa B₁₂-vitamiinia. Hyönteisistä kotisirkassa oli B₁₂-vitamiinia hieman enemmän kuin jauhomadossa. Hyönteiset eivät tuota B₁₂-vitamiinia, mutta voivat elää tuottajamikrobin kanssa symbioosissa. Sen lisäksi elintarvikekäyttöön kasvatettavia hyönteisiä ruokitaan B₁₂-vitamiinia sisältävällä rehulla.

Mikrobiologisella ja UHPLC-menetelmällä määritetyissä B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa oli selkeä ero menetelmien välillä. Liha- ja kalaelintarvikkeilla B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat

UHPLC-määrityksellä 7–64 % pienempiä kuin mikrobiologisella määrityksellä. Maitotuotteilla ja keltuaisella B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat 20–67 % pienempiä UHPLC-määrityksellä ja myös hyönteisillä eroa oli 71–81 %. UHPLC-menetelmällä määritetyillä B₁₂-vitamiinipitoisuuksilla oli myös merkittävä ero koostumustietokantojen, Finelin ja Ruotsin Livsmedelsdatabasenin, arvoihin.

Tämä tutkimus osoitti, että näytteenkäsittely (uutto ja mahdollinen entsyymikäsittely) on tärkeä vaihe B₁₂-vitamiinin määrityksessä. Kaikille elintarvikkeille ei voida käyttää samaa esikäsittelemenetelmää vaan menetelmä on valittava tutkittavalle näytetyypille erikseen. Tässä tutkimuksessa havaitut erot B₁₂-vitamiinipitoisuuksissa mikrobiologisen ja UHPLC-menetelmän välillä vahvistivat kirjallisuudessa esitettyä epäilyä siitä, että mikrobiologinen menetelmä vääristää B₁₂-vitamiinipitoisuuksia myös elintarvikkeilla, koska menetelmässä käytetty testiorganismi voi reagoida myös B₁₂-vitamiinin kaltaisiin tai korrinoidirakenteeltaan epätäydellisiin yhdisteisiin. Hyönteisistä kotisirkalla pystyttiinkin osoittamaan UHPLC-määrityksen avulla sen sisältävän B₁₂-vitamiinin ihmiselle inaktiivista pseudomuotoa. Mikrobiologisessa määrityksessä havaittiin vain suurempi B₁₂-vitamiinipitoisuus. Mikrobiologinen menetelmä on herkkä ja siinä on alhaiset materiaalikustannukset, mutta jatkossa elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuus kannattaisi määrittää UHPLC-menetelmällä, koska prosentuaalinen ero menetelmien välillä oli suurimmalla osalla elintarvikkeista hyvin suuri ja UHPLC-menetelmällä voidaan erottaa aktiivinen B₁₂-vitamiini inaktiivisesta pseudomuodosta ja deoksiribosideista ja deoksinukleotideista. UHPLC-menetelmällä määritetyt B₁₂-vitamiinipitoisuudet olivat myös selkeästi koostumustietokannoissa esitettyjä arvoja pienempiä. Elintarvikkeille olisikin tarpeen toteuttaa kattava tutkimus edustava näytteenotto huomioiden, jossa elintarvikkeiden B₁₂-vitamiinipitoisuus määritettäisiin nestekromatografisella menetelmällä.

LÄHDELUETTELO

Adams JF, Ross SK, Mervyn L, Boddy K, King P. 1971. Absorption of cyanocobalamin, coenzyme B₁₂, methylcobalamin, and hydroxocobalamin at different dose levels. *Scand J Gastroenterol* 6(3):249-252.

Allen RH, Seetharam B, Podell E, Alpers DH. 1978. Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 61:47-54.

Arkbåge K, Witthöft C, Fondén R, Jägerstad M. 2003. Retention of vitamin B12 during manufacture of six fermented dairy products using a validated radio protein-binding assay. *Int Dairy J* 13:101-109.

Ball GFM. 2006. *Vitamins in foods: Analysis, bioavailability and stability*. Boca Raton: CRC Press. 775 s.

Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK. 2010. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 115(8):1632-1639.

Birn H, Verroust PJ, Nexø E, Hager H, Jacobsen C, Christensen EI, Moestrup SK. 1997. Characterization of an epithelial ~460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B₁₂ and binds receptor-associated protein. *J Biol Chem* 272(42):26497-26504.

Birn H, Willnow TE, Nielsen R, Norden AGW, Bönsch C, Moestrup SK, Nexø E, Christensen EI. 2002. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption and accumulation of transcobalamin-B₁₂. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F408-F416.

Burgess CM, Smid EJ, van Sinderen D. 2009. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *Int J Food Microbiol* 133:1-7.

Campos-Gimenéz E, Fontannaz P, Trisconi MJ, Kiling T, Gimenez C, Andriux P. 2008. Determination of vitamin B₁₂ in food products by liquid Chromatography/UV detection with immunoaffinity extraction: single laboratory validation. *J AOAC Int* 91(4):786-793.

Chamlagain B, Edelmann M, Kariluoto S, Ollilainen V, Piironen V. 2015. Ultra-high performance liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of active vitamin B₁₂ in cells of *Propionibacterium* and fermented cereal matrices. *Food Chem* 166:630-638.

Crofts TS, Seth EC, Hazra AB, Taga ME. 2013. Cobamide structure depends on both lower ligand availability and CobT substrate specificity. *Chem Biol* 20:1265-1274.

Czerwonka M, Szterk A, Waszkiewich-Robak B. 2014. Vitamin B12 content in raw and cooked beef. *Meat Sci* 96:1371-1375.

Davey GK, Spencer EA, Appleby PN, Allen NE, Knox KH, Key TJ. 2003. EPIC-Oxford: lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33883 meat-eaters and 31546 non meat-eaters in the UK. *Public Health Nutr* 6(3):259-268.

Denton CA, Kellogg WL. 1953. The vitamin B₁₂ activity of eggs and some materials affected by extraction in the presence of sodium cyanide or sodium bisulfite. *Arch Biochem Biophys* 46(1):105-109.

Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D. 1975. Vitamin B₁₂ absorption from eggs. *Proc Soc Exp Biol Med* 149:987-990.

Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D. 1978. Vitamin B₁₂ assimilation from chicken meat. *Am J Clin Nutr* 31:825-830.

Doscherholmen A, McMahon J, Economon P. 1981. Vitamin B₁₂ absorption from fish. *Proc Soc Exp Biol Med* 167(4):480-484.

- Douglas AE. 2017. The B vitamin nutrition of insects: the contributions of diet, microbiome and horizontally acquired genes. *Curr Opin Insect Sci* 23:65-69.
- Fineli. Elintarvikkeiden koostumustietokanta. Versio 18. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, Ravitsemusyksikkö, Helsinki 2017. Saatavilla: www.fineli.fi.
- Finke MD. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol* 21:269-285.
- Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A, He Q, Moestrup SK. 2004. The functional cobalamin (vitamin B₁₂)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* 103(5):1573-1579.
- Gille D, Schmid A. 2015. Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutr Rev* 73(2):106-115.
- Guggisberg D, Risse MC, Hadorn R. 2012. Determination of vitamin B12 in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column. *Meat Sci* 90:279-283.
- Herbert V. 1987. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin B₁₂ in humans. *Am J Clin Nutr* 45:671-678.
- Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. 2003. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 78:131-136.
- Heudi O, Kiliç T, Fontannaz P, Marley E. 2006. Determination of vitamin B₁₂ in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction. *J Chromatogr A* 1101:63-68.
- Heyssel RM, Bozian RC, Darby WJ, Bell MC. 1966. Vitamin B₁₂ turnover in man - The assimilation of vitamin B₁₂ from natural foodstuff by man and estimates of minimal daily dietary requirements. *Am J Clin Nutr* 18(3):176-184.
- Holland B, Brown J, Buss DH. 1991. McCance and Widdowson's The composition of Foods. 5. painos. The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Juzeniene A, Nizauskaite Z. 2013. Photodegradation of cobalamins in aqueous solutions and in human blood. *J Photochem Photobiol B Biol* 122:7-14.
- Kelleher BP, Broin SD. 1991. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtiter plates. *J Clin Path* 44:592-595.
- Kozyraki R, Cases O. 2013. Vitamin B12 absorption: Mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie* 95:1002-1007.
- Kuluttajaliitto. Ruokakaloja on kokonainen kirjo. Saatavilla: <http://syohyvaa.fi/ruokakaloja-on-kokonainen-kirjo/>. Viitattu: 21.2.2018.
- Kumar SS, Chouhan RS, Thakur MS. 2010. Trends in analysis of vitamin B12. *Anal Biochem* 398:139-149.
- Leeson S, Caston LJ. 2003. Vitamin enrichment of eggs. *J Appl Poult Res* 12:24-26.
- Levine AS, Doscherholmen A. 1983. Vitamin B₁₂ bioavailability from egg yolk and egg white: relationship to binding proteins. *Am J Clin Nutr* 38:436-439.
- Levnedsmiddeltabeller. 2018. Danish food composition data. National Food Institute. Technical University of Denmark. Saatavilla: <http://frida.fooddata.dk>.
- Livsmedelsdatabasen. 2018. Livsmedelsverket, Swedish National Food Agency, Uppsala. Saatavilla: <http://www7.slv.se/SokNaringsinnehall>.
- Loikas S, Paju A, Koskela K, Kouri T. 2016. B₁₂-vitamiinin puutteen parempaan diagnostiikkaan. *Suomen Lääkärilehti* 71(15):1065-1071.

Luo X, Chen B, Ding L, Tang F, Yao S. 2006. HPLC-ESI-MS analysis of vitamin B12 in food products and in multivitamins-multimineral tablets. *Anal Chim Acta* 562:185-189.

Maa- ja metsätalousministeriö. Tiedote: Suomi sallii hyönteisten pääsyn elintarvikemarkkinoille. 20.9.2017. Saatavilla: http://mmm.fi/artikkeli/-/asset_publisher/suomi-sallii-hyonteisten-paasyn-elintarvikemarkkinoille. Viitattu 23.2.2018.

Marley EC, Mackay E, Young G. 2009. Characterisation of vitamin B12 immunoaffinity columns and method development for determination of vitamin B12 in a range of foods, juices and pharmaceutical products using immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with UV detection. *Food Addit Contam* 26(3):282-288.

Mathews FS, Gordon MM, Chen Z, Rajashankar KR, Ealick SE, Alpers DH, Sukumar N. 2007. Crystal structure of human intrinsic factor: Cobalamin complex at 2.6-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(44):17311-17316.

Moller A, Saxholt E. 1996. *Levnedsmiddeltabeller*. Levnedsmiddelstyrelsen.

Nettleton JA, Exler J. 1992. Nutrients in wild and farmed fish and shellfish. *J Food Sci* 57(2):257-

Neumann WL, Coss E, Rugge M, Genta RM. 2013. Autoimmune atrophic gastritis -pathogenesis, pathology and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:529-541.

Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, Nexø E, Moestrup SK. 2012. Vitamin B12 transport from food to the body's cells - a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:345-354.

Obeid R, Fedosov SN, Nexø E. 2015. Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Mol Nutr Food Res* 59:1364-1372.

O'Leary F, Samman S. 2010. Vitamin B₁₂ in health and disease. *Nutrients* 2:299-316.

Pakin C, Bergaentzle M, Aoude-Werner D, Hasselmann C. 2005. α -Ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B12 in foodstuffs. *J Chromatogr A* 1081:182-189.

Paul C, Brady DM. 2017. Comparative bioavailability and utilization of particular forms of B₁₂ supplements with potential to mitigate B₁₂-related genetic polymorphisms. *Integr Med* 16(1):42-49.

Pawlak R, Lester Se, Babatunde T. 2014. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B₁₂: a review of literature. *Eur J Clin Nutr* 68:541-548.

Poonam, Pophaly SD, Tomar SK, De S, Singh R. 2012. Multifaceted attributes of dairy propionibacteria: a review. *World J Microbiol Biotechnol* 28:3081-3095.

Qian L, Quadros EV, Regec A, Zittoun J, Rothenberg SP. 2002. Congenital transcobalamin II deficiency due to errors in RNA editing. *Blood Cells Mol Dis* 28(2):134-142.

Qin W, Zhang Z, Liu H. 1997. Chemiluminescence flow sensor for the determination of vitamin B₁₂. *Anal Chim Acta* 357:127-132.

Quadros EV. 2009. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol* 148:195-204.

Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JF. 2009. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood* 113(1):186-192.

Russell RM, Baik H, Kehayias JJ. 2001. Older men and women efficiently absorb vitamin B₁₂ from milk and fortified bread. *J Nutr* 131:291-293.

Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagné C, Toliat MR, Nürnberg G, Wittkamp T, Buers I, Sharifi A, Stucki M, Becker C, Baumgartner M, Robenek H, Marquardt T, Höhne W, Gasnier B, Rosenblatt DS, Fowler B, Nürnberg P. 2009. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cbIF defect of vitamin B₁₂ metabolism. *Nat Genet* 41(2):234-239.

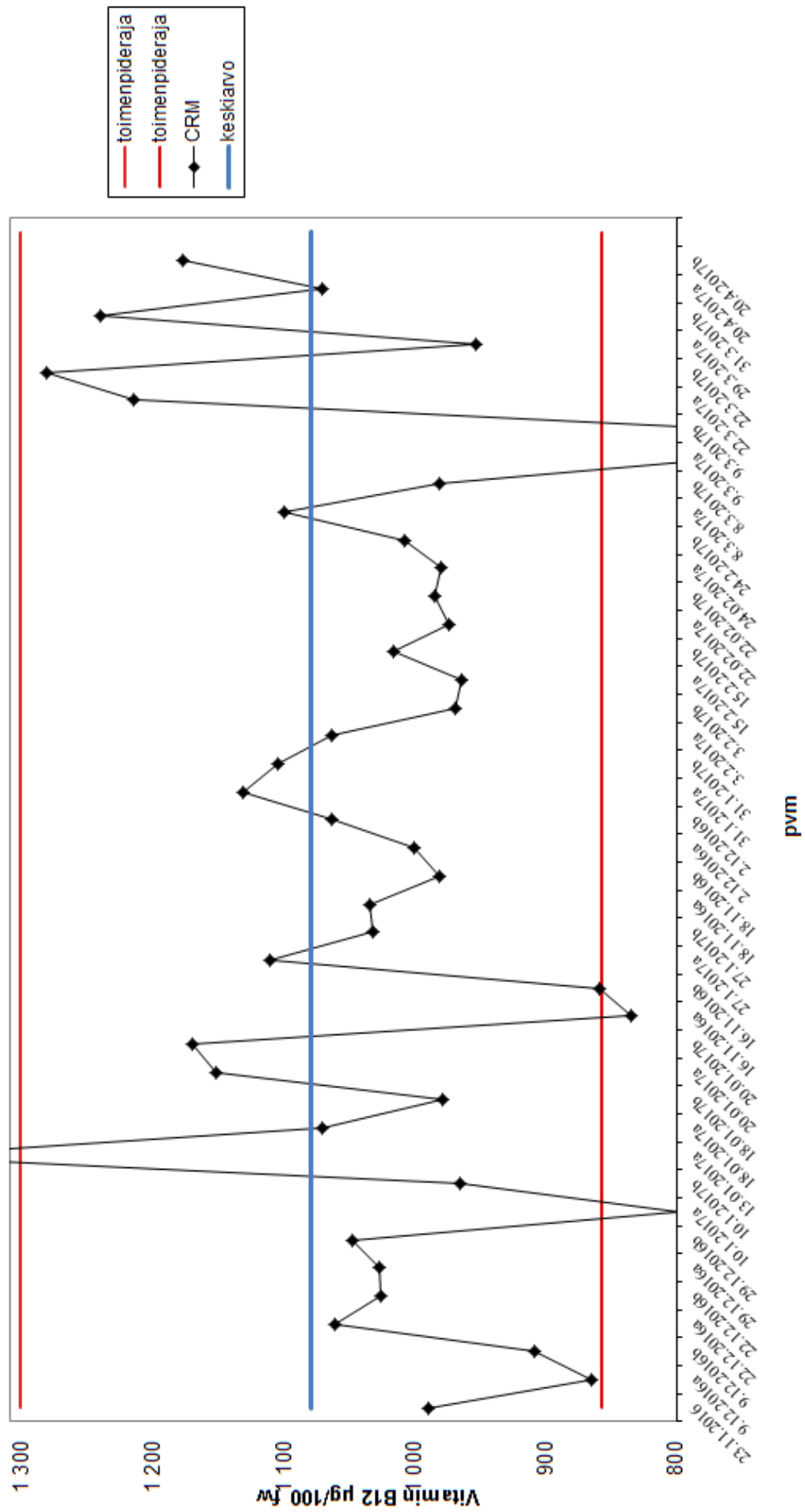
- Rutten MJM, Bouwman AC, Sprong RC, van Arendonk JAM, Visker MHPW. 2013. Genetic variation in vitamin B₁₂ content of bovine milk and its association with SNP along the bovine genome. *Plos One* 8(4):1-6.
- Santos F, Vera JL, Lamosa P, de Valdez GF, de Vos WM, Santos H, Sesma F, Hugenholtz J. 2007. Pseudovitamin B₁₂ is the corrinoid produced by *Lactobacillus reuteri* CRL1098 under anaerobic conditions. *FEBS Lett* 581:4865-4870.
- Schwartz M. 1960. Intrinsic factor antibody in serum from patients with pernicious anaemia. *Lancet* 2:1263-1267.
- Scott KJ, Bishop DR. 1988. Nutrient content of milk and milk products: Vitamins of the B complex and vitamin C in retail cheeses. *J Sci Food Agric* 43:187-192.
- Søndergaard H. 1979. Statens levnedsmiddelinstituts undersøgelser over B₁₂-vitaminholdet i danske levnedsmidler. Statens levnedsmiddelinstitut, Ernæringsbiologisk afdeling.
- Stabler SP. 2012. Vitamin B₁₂. Teoksessa: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, toim. Present knowledge in nutrition. 10. p. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. s 343-358.
- Stupperich E, Nexø E. 1991. Effect of the cobalt-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B₁₂ binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. *Eur J Biochem* 199:299-303.
- Sych JM, Lacroix C, Stevens MJA. 2016. Vitamin B₁₂ - Physiology, production and application. Teoksessa: Vandamme EJ, Revuelta JL, toim. Industrial biotechnology of vitamins, biopigments and antioxidants. Weinheim, Saksa: Wiley. s 129-159.
- Szterk A, Roszko M, Malek K, Czerwonka M, Waszkiewicz-Robak B. 2012. Application of the SPE reversed phase HPLC-MS technique to determine vitamin B₁₂ bio-active forms in beef. *Meat Sci* 91:408-413.
- Truswell AS. 2007. Vitamin B₁₂. *Nutr Diet* 64(4):S120-S125.
- Valtion ravitsemusneuvottelukunta. 2014. Suomalaiset ravitsemussuosituksset. Saatavilla: http://www.ravitsemusneuvottelukunta.fi/files/attachments/fi/vrn/ravitsemussuosituksset_2014_fi_web.3_es.pdf. Viitattu 12.10.2016.
- van Heerden SM, Schönfeldt HC, Kruger R, Smit MF. 2007. The nutrient composition of South African lamb (A2 grade). *J Food Compos Anal* 20:671-680.
- Van Wyk J, Britz TJ. 2010. A rapid HPLC method for the extraction and quantification of vitamin B₁₂ in dairy products and cultures of *Propionibacterium freudenreichii*. *Dairy Sci Technol* 90:509-520.
- Ververis E. 2016. On the cobalamin (vitamin B₁₂) production by *Propionibacterium freudenreichii*: B₁₂ levels in cheeses during ripening and attempts to inactivate a gene encoding BluB-CobT2 fusion enzyme. EKT Series 1760: University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences. 105 s.
- Watanabe F, Takenaka S, Abe K, Tamura Y, Nakano Y. 1998. Comparison of a microbiological assay and a fully automated chemiluminescent system for the determination of vitamin B₁₂ in food. *J Agric Food Chem* 46(4):1433-1436.
- Watanabe F, Bito T. 2018. Determination of cobalamin and related compounds in foods. *J AOAC Int* 101:1-6.
- Wuerges J, Garau G, Geremia S, Fedosov SN, Petersen TE, Randaccio L. 2006. Structural basis for mammalian vitamin B₁₂ transport by transcobalamin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(12):4386-4391.
- Zironi E, Gazzotti T, Barbarossa A, Devicienti C, Scardilli M, Pagliuca G. 2013. Technical note: Development and validation of a method using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of vitamin B₁₂ concentrations in milk and dairy products. *J Dairy Sci* 96(5):2832-2836.

Liite 1. Näytteiden ostopaikat

B12-näytteet	Naudan sisäpaisti	Naudan maksa	Porsaan ulkofilee	Porsaan maksa	Broilerin rintafilee	Silakkafile	Kirjolohi-file	Kananmuna	Rasvaton maito	Juusto punaleima Emmental	Juusto Edam	Maustatamaton jogurtti (rasvaa 2,5 %)
Itäkeskus Alepa								2	2	4	2	2
Itäkeskus Citymarket	1		1		1	1	1	1	2	2	2	2
Itäkeskus Prisma	1	1	1	1	1	1	1	2	3	2	2	2
Hakaniemen KH Ekström						1	1					
Hakaniemen KH Hakkarainen	1	1	1	1	1							
Hakaniemen KH Liha-haka	1	1	1	1	1							
Hakaniemen KH Reiniliha	1	1	1	1	1							
Hakaniemen KH Reitin kala						1	1					
Hakaniemen KH Töölön kala							1					
Herttoniemi Alepa								1	2			2
Herttoniemi K-supermarket	1		1	1	1	1	1	1	2	1	2	2
Keskusta K-supermarket Postitalo						1	1					
Nurmijärvi K-supermarket	1		1	1	1	1	1					
Nurmijärvi S-market	1		1	1		1						
Stockmann		1				1						
Viiikki Prisma	1		1	1	1	1	1	2				
Viiikki Valintatalo	1		1	1	1		1	1	2	2	2	1
Votkin		5		9								
Yhteensä	10	10	10	10	9	10	10	10	13	11	10	11

Liite 2. Mikrobiologisen määrittelyn valvontakortti

B12 content in CRM 487 (fw) 2016-2017



Liite 3. Näytteiden kosteuspitoisuudet

Elintarvike	Kosteuspitoisuus (%)
Naudan sisäpaisti	74
Porsaan ulkofilee	71
Broilerin rintafilee	75
Naudan maksa	69
Porsaan maksa	73
Kirjolohi	68
Silakka	75
Edam	43
Emmental	32
Keltuainen	55
Valkuainen	87
Kotisirkka	71
Jauhomato	61