Afd. Diervoeders/Meststoffen 1981-04-20
Verslag 82.26 pr.nr. 505.0100

Onderwerp: Literatuuronderzoek bepalings-
methoden vitamine C.

Verzendlijst: direkteur, direktie V.K.A., sektorhoofd (3x), afdeling
Meststoffen en Veevoeders(3x), afd. Normalisatie (Humme)
Projektbeheer

8226

Afdeling Diervoeders/Meststoffen 1981-04-20

Verslagnummer 82.26 pr.nr. 505.0100

Projekt: Ontwikkeling methodes voor het bepalen van nutriënten in levensmiddelen

Onderwerp: Literatuuronderzoek bepalingsmethoden vitamine C.

---

1. Doel:

Literatuuroverzicht analysemethodes voor vitamine C in voedingsmiddelen.

2/3. Samenvatting en conclusie:

Voor de bepaling van AA in verse groenten en fruit verdient het aanbeveling de HPLC methode (2.6.3) op te starten. Gezien de potentiele mogelijkheden van HPLC is het nuttig de toepasbaarheid voor een breder skala produkten te onderzoeken. Daarnaast is het noodzakelijk te beschikken over een methode waarvan aangenomen mag worden dat hiermee voor een groot aantal produkten betrouwbare resultaten verkregen kunnen worden. Methode 2.4 is hiervoor het meest geschikt.

Verantwoordelijk: ir P. Hollman

Medewerker/samensteller: ir P. Hollman

Projektleider: ir P. Hollman

OVERZICHT VAN METHODES VOOR DE BEPALING VAN VITAMINE C

---

1 Inleiding

Voor de bepaling van vitamine C in voedingsmiddelen is het noodzakelijk te beschikken over een methode die zowel L-ascorbinezuur (AA) als Dehydro-ascorbinezuur (DAA) bepaalt, omdat beide vitamine-C-aktiviteit vertonen (DAA ongeveer 80% van de aktiviteit van AA). Onderscheid tussen AA en DAA is zinvol omdat in vers plantaardig materiaal geen DAA voorkomt (9) en omzetting van AA in DAA kan plaatsvinden door oxidatie tijdens bijv. bewaring en verwerking van het produkt. Het DAA-gehalte kan aldus een parameter zijn voor de kwaliteit van het produkt.
Aan voedingsmiddelen wordt soms D-iso-ascorbinezuur (Arabo-ascorbinezuur) (IAA) toegevoegd als anti-oxidant en goedkope vervanger van AA. D-iso-ascorbnezuur (een epimeer van AA) bezit slechts 5% van de vitamine-C-aktiviteit van AA, en zal daarom bij de bepaling van vitamine-C niet met AA of DAA mogen samenvallen.

2 Methodes

2.1 Oxidatie van AA m.b.v. 2,6-dichloorfenolindofenol (DIP)
Dit is de klassieke vitamine-C analyse (1). De methode is niet erg specifiek, en geeft te hoge resultaten bij aanwezigheid van stoffen die door DIP geoxideerd worden (2), zoals Fe(II), Zn(II), reduktonen, cysteïne. Zonneveld (3) beschrijft een aangepaste methode voor groente, fruit en conserven, waarbij de storende reducerende stoffen bepaald kunnen worden door de oxidatie van AA te blokkeren m.b.v. formaldehyde.

2.2 Polarografische bepaling van AA in verse groenten en fruit (10), vlees en vleesprodukten (11), voedingsmiddelen (12) en aardappels (13). Deze methode wordt eveneens gestoord door oxideerbare stoffen. Davidek (11) beschrijft een methode voor vleesprodukten, waarbij het condensatieprodukt van DAA en o-fenyleendiamine polarografisch bepaald wordt, waardoor storende bestanddelen uitgeschakeld worden.

2.3 Koppeling van de oxidatieprodukten van AA met 2,4-dinitrofenylhydrazine en spektrofotometrische bepaling van het hydrazon (4). Aangezien de reaktie alleen maar specifiek is voor de endiolgroep, vormen veel verbindingen (o.a. reducerende suikers) het hydrazon, en veroorzaken daardoor een te hoge waarde. Deze methode leidt dan ook alleen tot betrouwbare resultaten in kombinatie met dunnelaag chromatografie. Toepassingen zijn beschreven voor levensmiddelen (5,7), mengvoeders (6,7) en melk (8).

2.4 Fluorimetrische bepaling van DAA na reaktie met o-fenyleendiamine (OPDA) (14,15). Storende stoffen die eveneens met OPDA een fluorescerend condensatieprodukt vormen, worden bepaald door middel van dezelfde reaktie, waarbij echter de vorming van het DAA-OPDA complex verhinderd wordt door toevoeging van boorzuur. Deze methode is geaccepteerd als officiele AOAC-methode.
Automatisering van de methode met behulp van een autoanalyzer is mogelijk (16).

2.5 Enzymatische bepaling van AA (17).
Het AA wordt hierbij door een tetrazoliumzout geoxideerd, waarna in een parallelle bepaling de oxideerbare storende stoffen gemeten worden, nadat vooraf het AA verwijderd is door ascorbinezuur-oxidase. Het ascorbinezuur-oxidase reageert met isoascorbinezuur en SO_2. De methode wordt geschikt geacht voor een breed skala van levensmiddelen (17). Genoemde publikatie is afkomstig van de fabrikant die sinds kort een testcombinatie op de markt brengt.

2.6 HPLC-methodes

2.6.1 Optimale kondities voor de scheiding van wateroplosbare vitamines in multivitaminepreparaten met behulp van reversed phase-NH_2 en -C_{18} worden bepaald (18).

2.6.2 Bepaling van AA in vitaminepreparaten, groente, fruit, vruchtesappen, en babyvoeding (19), onder de volgende kondities: isocratische elutie van reversed phase-C_{18} door middel van ion-pairing met tridecylammoniumformiaat, elutievloeistof water-methanol 1:1, UV-detektie.

2.6.3 Bepaling van AA in groente en fruit (20). Voor verse groente en fruit werd de volgende methode ontwikkeld: isocratische elutie van reversed phase-C_{18} door middel van ion-pairing met tetrabutylammoniumhydrogeensulfaat, elutievloeistof water-methanol 945:55, UV-detektie. De golflengte waarbij de detektie plaatsvond werd zodanig gekozen dat de pH geen invloed had op de UV-absorptie van AA.

2.7 Scheiding van iso-ascorbinezuur en AA

Bovengenoemde methodes geven niet de mogelijkheid tot onderscheid tussen IAA en AA (voor de HPLC-methodes is dit niet duidelijk). Hoewel IAA niet van nature aanwezig is in voedingsmiddelen, kan het hieraan toegevoegd zijn. Met het gestelde in de inleiding zal het dan noodzakelijk zijn IAA gescheiden van AA te bepalen.

2.7.1 Met behulp van papierchromatografie (21,22).

2.7.2 Met behulp van dunnelaag chromatografie (23).

2.7.3 Met behulp van HPLC (24)

In vruchtesappen werd onder de volgende kondities een scheiding tussen IAA en AA bereikt: Isocratische elutie van reversed phase-NH_2 bij 60°C, elutiemiddel 75% acetonitril in water. De UV-gevoeligheid van IAA blijkt in het pH-trajekt 4.4-4.7 sterk te varieren. Een scheiding op reversed phase-C_{18}, zowel met ionpairing als zonder ionpairing bleek niet goed mogelijk.

2.8 Omzetting van DAA in AA

Met vitamine C methodes die gebruik maken van eigenschappen van het AA kan het DAA-gehalte pas bepaald worden na reduktie van DAA. Hiervoor zijn een aantal methodes voorhanden (26, 27, 28, 29).

3 Diskussie

Een grote verscheidenheid aan methodes voor de bepaling van vitamine C wordt genoemd in de literatuur. De waarde van de methodes 2.1 tot en met 2.5 wordt vaak beperkt door de potentieel storende bestanddelen van de matrix waarin het vitamine zich bevindt.

Procedures om deze storingen te onderdrukken zijn dan noodzakelijk met alle mogelijkheden tot verliezen en fouten door deze extra bewerkingen (25).
HPLC biedt door zijn scheidend vermogen de mogelijkheid tot het vereenvoudigen van de voorbewerking van het monster, waardoor een efficiënte analyse mogelijk wordt.

4 Conclusie

Voor de bepaling van AA in verse groente en fruit verdient het aanbeveling methode 2.6.3 op te starten. Gezien de potentiele mogelijkheden van HPLC voor de analyse van vitamine C is het zeer nuttig de mogelijkheden van deze methode voor een breder toepassingsgebied te onderzoeken.
Daarnaast zal het noodzakelijk zijn te beschikken over een methode waarvan aangenomen mag worden dat hiermee voor een groot aantal produkten betrouwbare resultaten verkregen kunnen worden. Methode 2.4 is hiervoor het meest geschikt.
Een nieuwe methode die aandacht dient te krijgen is de enzymatische methode 2.5.

5 Literatuur

1. Tillmans J., Z. Unters. Lebensm. 54 (1927) 33.

2. Vuillemier J., Probst, Burbacher, Handbuch der Lebensmittelchemie (1967) Springer, Berlin-Heidelberg-New York. Band 2, 775.

3. Zonneveld, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 119 (1963) 319.

4. Roe, Kuether. J. Biol. Chem. 147 (1943) 399.

5. Strohecker R., Z. Lebensm. Unters. Forsch. 118 (1962) 394.

6. Vuillemier J., Proc. Twelfth World Poultry Congres Sydney (1962), 238.

7. Vuillemier J., Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung. 14 (1965) 168.

8. Toothill J., J. Dairy Res. 37 (1970) 29.

9. Lehnard A., Z. Lebensm. Unters. Forsch. 169 (1979) 82.

10. Krauze S., Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 50 (1959) 228.

11. Davidek J., Scientific Papers of the Institute of Chemical Technology (Food). Prague E 32 (1971a en b) blz. 17, 161.

12. Davidek J., Lebensm. Wiss. und Techn. 5 (1972) 213.

13. Davidek J., Lebensm. Unters. Forsch. 154 (1974) 18.

14. Deutsch, J. A.O.A.C. (1965) 48, 1248.

15. A.O.A.C., Official Methods of Analysis (1980) 43.061.

16. Egberg, J. A.O.A.C. 60 (1) 1977, 126.

17. Beutler, Deutsche Lebensmittel Rundschau 76 (3) (1980) 69.

18. Wills R., Shaw, J. Chrom. Science 15 (1977) 263.

19. Sood, Anal. Chem. 48 (6) (1976) 796.

20. Rückeman, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 171 (1980) 357.

21. De Ritter, J. A.O.A.C. 48 (1965) 985.

22. Weeks C., J. A.O.A.C. 50 (1967) 793.

23. Vuillemier J., Zeitschr. für Vitaminforsch. 37 (1967) 504.

24. Maithuong Bui-Nguyên, J. Chrom. 196 (1980) 163.

25. Strohecker R., Zacharias, Zobel, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 138 (2) (1968).

26. Hughes, Biochem. J. 64 (1956) 203.

27. Hewith, Biochem. J. 78 (1961) 384.

28. Franke W., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse 2.
Peach K., Tracely, 95-112, Springer 1955.

29. Herrmann, Zobel, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 117 (1962) 1.