

Project 505.0100

Ontwikkeling methoden voor het bepalen van nutriënten in levensmiddelen (P. Hollman)

Rapport 88.01

Januari 1988

Ontwikkeling van een HPLC-methode voor de bepaling van vitamine B₆ in levensmiddelen.

G.M. Binnendijk

Afdeling: Additieven/Micronutriënten

Goedgekeurd door: ir P.C.H. Hollman

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

circulatie

afd. AM (4x)

Hollman

Binnendijk

Broex

EXTERN

Agralin, Pudoc

Rijkskeuringdienst van Waren Maastricht (ir H. Roomans)

DLO

VKA

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

ABSTRACT

ONTWIKKELING VAN EEN HPLC-METHODE VOOR DE BEPALING VAN VITAMINE B₆ IN
LEVENS MIDDELEN

DEVELOPMENT OF AN HPLC-METHOD FOR THE DETERMINATION OF VITAMIN B₆ IN
FOODS

Report no. 88.01

January 1988

G.M. Binnendijk and P.H.C. Hollman

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

11 tables, 13 annexes, 7 references

The application of HPLC with fluorescence detection for the determination of vitamin B₆ in foods was investigated. Extraction of foods using hydrolysis by autoclaving at 121°C and/or enzymatic hydrolysis, resulted in interferences and slow eluting components which makes interpretation of the chromatograms difficult. Attempts to improve the selectivity of the chromatographic system were partly successful.

Clean-up procedures were investigated. Different Solid Phase Extraction columns were tested, with little success. Only COOH-columns proved to be effective in removing the slow eluting components. Also an automated columnswitching system was set up. This system also was effective in removing the slow eluting components and proved to be very efficient.

With this automated system different extraction procedures based on autoclaving at 121°C and enzymatic hydrolysis were tested. An optimum procedure for meat products was established. However, the enzymatic hydrolysis step of this procedure has to be reconsidered, because the enzyme used (Mylase 100) is no longer available.

Keywords: vitamin B₆, pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamine, foods, HPLC, fluorescence detection, clean-up, Solid Phase Extraction, columnswitching, enzymatic hydrolysis.

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	I
SAMENVATTING	III
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL EN METHODE	1
3 RESULTATEN	2
3.1 Inleidende experimenten	2
3.1.1 Selectiviteit	4
3.1.1.1 Eluens	4
3.1.1.2 Kolomkeuze	4
3.2 Clean-up	5
3.2.1 Algemene condities	5
3.2.2 Ionenwisseling chromatografie	5
3.2.3 Solid phase extraction	5
3.2.3.1 Cyano-kolom	6
3.2.3.2 C ₁₈ -kolom	6
3.2.3.3 Zwak zure ionenwisselaar	6
3.2.4 Kolomschakelen	7
3.2.4.1 Opbouw en werking systeem	7
3.3 Monsteronderzoek	8
3.3.1 Clean-up met COOH-kolom	10
3.3.2 Clean-up via kolomschakelen	13
3.4 Producten van dierlijke oorsprong	13
3.4.1 Zuurconcentratie en hydrolysietijd	16
3.4.2 Enzymatische hydrolyse	17
3.5 Enzymatische hydrolyse	17
3.5.1 Mylase 100	18
3.5.2 Diastase	18
3.5.3 Taka diastase	18
3.5.4 Fosfatase	18
4 CONCLUSIES	20
LITERATUUR	21
BIJLAGEN: 13	

SAMENVATTING

Een mogelijk alternatief voor de microbiologische bepaling van vitamine B₆ in levensmiddelen, gebaseerd op HPLC met fluorescentie-detectie, wordt in dit rapport nader onderzocht. In voorafgaand onderzoek (RIKILT-rapport 85.34) werden de optimale HPLC-parameters vastgesteld, waarbij tevens twee procedures (autoclaaf en enzymatische hydrolyse) voor de hydrolyse van de fosfaatesters van de vitamine B₆ componenten werden uitgewerkt.

Bij toepassing van bovengenoemde uitgangsprocedures op levensmiddelen blijkt dat bij de meeste produkten kwantificeren van vitamine B₆ onzeker of onmogelijk is vanwege interferenties en langzaam eluerende componenten. Getracht werd daarom de selectiviteit van de elutie te verbeteren, zowel door aanpassing van het eluens, als door keuze van een ander kolomtype (phenyl i.p.v. C18). Alleen aanpassing van het eluens blijkt een positief effect te hebben, waarbij echter de noodzakelijke selectiviteitswinst niet bereikt wordt.

Aandacht werd daarom besteed aan de clean up van de monsterextracten. Een aantal zgn. "Solid-Phase-Extraction" kolommetjes (Cyano, C₁₈, COOH) werd getest, maar geen enkel type blijkt te voldoen. De COOH-kolommetjes zijn echter wel geschikt voor het verwijderen van de langzaam eluerende componenten. Dezelfde conclusie kan getrokken worden voor de toepassing van "on-line" kolomschakeling met twee C₁₈-kolommen, waarmee een effectieve clean up voor wat betreft de langzaam eluerende componenten bewerkstelligd kan worden. De kolomschakeling werd geautomatiseerd, waardoor een doeltreffend, arbeidsbesparend systeem ontstaat.

De extractie van vitamine B₆ uit diverse levensmiddelen werd met het geautomatiseerde systeem nader onderzocht. Voor vleesprodukten werd een optimale procedure vastgesteld.

Tijdens het onderzoek werd tot tweemaal toe het enzym, dat gebruikt wordt voor de hydrolyse van de fosfaatesters, uit de handel genomen, waardoor tussentijds aanpassen van de procedures met alternatieve enzymen noodzakelijk was. De procedure voor vleesprodukten zal daarom opnieuw ge-optimaliseerd moeten worden met het alternatieve enzym.

1 INLEIDING

In Rikilt-rapport 83.77 (1), een literatuuroverzicht van methoden voor de bepaling van vitamine B₆, wordt de noodzaak beschreven om tot een snelle en specifieke methode te komen voor de bepaling van vitamine B₆ in levensmiddelen. In Rikilt-rapport 85.34 (2) wordt een eerste aanzet beschreven voor de bepaling van vitamine B₆ met HPLC in combinatie met fluorescentie detectie. In dit laatstgenoemde verslag wordt vooral ingegaan op de chromatografie en op mogelijke ontsluitingsprocedures. Reversed phase ion pair chromatografie blijkt hierbij te leiden tot een flexibel chromatografisch systeem. De ontsluitingsprocedures werden onderzocht aan de hand van de fosforzuren esters van de B₆ vitaminen, waarbij nog geen levensmiddelenmatrix betrokken werd. Zowel hydrolyse bij verhoogde temperatuur (autoclaaf) als enzymatische hydrolyse, of een combinatie van beide, blijken toepasbaar. Bovenstaande diende als uitgangspunt voor het vervolgonderzoek, beschreven in dit verslag, om tot een methode te komen voor de bepaling van vitamine B₆ in voedingsmiddelen van uiteenlopende aard.

2 MATERIAAL EN METHODE

De standaarden pyridoxaminedihydrochloride, pyridoxine-hydrochloride, pyridoxal hydrochloride, pyridoxamine-5'-fosfaathydrochloride en pyridoxal 5'-fosfaat waren afkomstig van Merck, pyridoxine-fosfaat van Serva en 4-deoxypyridoxine (interne standaard) van Sigma.

Vijf verschillende enzymen werden toegepast: Clara Diastase (Fluka), Mylase 100 (U.S. biochemical coöperation), Diastase (BDH), Taka Diastase (Serva) en fosfatase type IV S (Sigma).

Bij het onderzoek werden de monsters gemalen met een Moulinex en later eventueel vermalen met zuur met behulp van een Waring Blendor. De onderzochte levensmiddelen waren steeds rauwe, niet-toebereide producten. De zure hydrolyse werd uitgevoerd m.b.v. een autoclaaf (121°C), de enzymatische hydrolyse in een waterbad. Na filtratie (Acrodisk 0.45 µm, Gelman) werden de extracten, na eventuele voorzuivering, geïnjecteerd op het HPLC-systeem.

Pomp(en):

Waters model 590, indien kolomshakeling werd toegepast, werd in een aantal gevallen een extra pomp gebruikt (Model 6000 Waters), flow 1 ml/min.

Mobiele fase:

De zouten:

Natriumheptaansulfonaat (Serva), tetraethylammoniumchloride (Merck) en kaliumdiwaterstoffosfaat (Merck), alle drie toegepast in een variabele concentratie, werden opgelost in 500 ml Millipore water. De oplossing werd, met behulp van fosforzuur (Merck) op pH 2.6 gebracht, gemengd met acetonitril of isopropanol en aangevuld tot 1 liter. Vervolgens werd gefiltreerd (0.45 µm Millipore).

Kolommen:

Drie verschillende type kolommen werden gebruikt

- Hypersil 5 µm C₁₈ (Chrompack), 150 x 4.6 mm en 250 x 4.6 mm
- Lichrospher 5 µm C₁₈ (Merck), 125 x 4 mm en 250 x 4 mm
- µ Bondapack 10 µm phenyl (Waters), 150 x 3.9 mm.

Detector:

Perkin Elmer LS-4 fluorescentiedetector.

- excitatie: 286 nm emissie: 386 nm

Integrator:

Apple II-E, uitgerust met chromatohart en chromadapt.

Voor de clean up werden Baker SPE kolommen gebruikt:

cyano (3 ml), C₁₈ (3 ml) en zwakzure ionenwisselaar COOH (3 ml). Ook werd een sterk zure ionenwisselaar (Amberlite CG-120 I, 100-200 Mesh in K⁺-vorm) toegepast.

Bij de toepassing van kolomschakeling werd eerst handmatig geschakeld (Valco-Kranen) (3), later werd het systeem geautomatiseerd met behulp van een MUST (Chrompack). Voor de schematische werkgave zie bijlage 1.

3 RESULTATEN

3.1 Inleidende experimenten

Aangezien de retentie by reversed phase chromatografie van de gefosforyleerde B₆-vitaminen erg klein is, en zodoende samen met

interferenties in het vloeistoffront elueren, is hydrolyse van deze verbindingen noodzakelijk. In rapport 85.34 (2) zijn twee procedures onderzocht. Voor deze hydrolyse, nl. de enzymatische hydrolyse en de autoclaaf ontsluiting, waarbij de optimale condities voor beide methodes werden vastgesteld. Op basis van deze gegevens werden met behulp van de zure hydrolyse een aantal monsters onderzocht. Hiertoe werd 5 g monster met 50 ml 0.1 M zoutzuur vermalen, vervolgens werd gedurende 5 uur bij 121^o C ontsloten. De chromatogrammen van een aantal van deze produkten zijn afgebeeld in bijlage 2. Tengevolge van de interferenties is het onmogelijk vitamine B₆ kwantitatief te bepalen. Ook werd een monster erwt gedurende 0,5 uur en 5 uur m.b.v. de autoclaaf ontsloten. Het blijkt dat de interferenties toenemen naarmate extracten langer geautoclaveerd worden (bijlage 3). In beide gevallen blijken ook componenten met hoge retentie aanwezig te zijn. N.B. de fosfaatvormen van de B₆-vitaminen zijn na 5 uur autoclaveren kwantitatief omgezet (2).

Het was nodig de enzymatische hydrolyse aan te passen omdat het enzym Clara-Diastase plotseling door Fluka uit het assortiment werd geschrapt. Als alternatief voor Clara Diastase werd Mylase 100 gekozen. De optimale condities voor de hydrolyse moesten derhalve opnieuw worden vastgesteld (hoofdstuk 3.5.1). Op basis van deze gegevens werd een aantal monsters onderzocht met een gecombineerde methode: autoclaaf ontsluiting gevolgd door enzymatische hydrolyse. Hiertoe werd 10 g monster met 50 ml 0.1 M zwavelzuur vermalen, vervolgens werd gedurende 0,5 uur ontsloten bij 121^o C, hierna werd de pH van het extract op 4 gebracht en 10 ml 10% mylase 100 toegevoegd. Tenslotte werd gedurende 15 minuten bij 40^o C geïncubeerd. Het blijkt dat extracten van aardappel en erwt ook interferenties en componenten met hoge retentie bevatten. De enzymatische behandeling heeft geen invloed op het aantal interferenties (zie bijlage 4). Tengevolge van de interferenties is het moeilijk zo niet onmogelijk in een aantal van de onderzochte monsters vitamine B₆ kwantiteit te bepalen. Het is dus noodzakelijk een clean up uit te voeren of te trachten een selectievere elutie te bewerkstelligen.

3.1.1 Selectiviteit

3.1.1.1 Eluens

Nagegaan werd in hoeverre de selectiviteit van het scheidingssysteem verbeterd kon worden door isopropanol te vervangen door methanol of acetonitril. Toepassing van methanol gaf geen verbetering t.o.v. isopropanol. Met acetonitril wordt, en dan vooral voor PL, wel een betere selectiviteit verkregen (zie bijlage 5) maar ondanks dit is een clean up voor een aantal produkten noodzakelijk (voor een representatief voorbeeld zie bijlage 6).

3.1.1.2 Kolomkeuze

Het gedrag van de B₆-vitameren op een μ -Bondapack phenylkolom (150 x 3.9 mm, 10 μ m) werd onderzocht. Eluens samenstelling: 0.05 mol kaliumdiwaterstoffosfaat, 0.0075 mol natriumheptaansulponaat en 0.0075 mol tetra-ethylammoniumchloride oplossen in 500 ml water, de pH instellen op 2,6 m.b.v. fosforzuur, acetonitril toevoegen (variabel percentage) en aanvullen tot 1000 ml. Flow was 1 ml/min.

Tabel 1: K' van de B₆ vitameren als functie van het percentage acetonitril

%-acetonitril	PL	K' PM	PN
0	3.6	4.4	5.2
2	2.3	2.9	3.4
4	1.7	1.9	2.4
6	1.3	1.3	1.8

De elutievolgorde is dus: PL, PM en daarna PN.

De volgorde is dus anders dan bij C₁₈ (PL, PN en PM).

Het systeem is minder geschikt, m.b.t. monsteronderzoek, dan C₁₈ vanwege het lage schotelgetal.

3.2 Clean up

3.2.1 Algemene condities

Voor de in dit hoofdstuk beschreven experimenten golden de volgende condities (zie ook hoofdstuk 2):

- zure hydrolyse:

5 g monster mengen met 50 ml 0,2 N H_2SO_4 , 5 uur bij 121°C.

- chromatografie:

Kolom: Hypersil 50DS 250 x 4.6 mm

Eluens: 0.0075 mol natriumheptaansulfonaat + 0.0075 mol tetra-ethyl ammoniumchloride + 0.1000 mol kaliumdiwaterstoffosfaat, oplossen in 500 ml water, pH op 2.6 brengen m.b.v. fosforzuur, 35 ml 2-propanol toevoegen en aanvullen tot 1000 ml.

3.2.2 Ionenwisselingschromatografie

De opwerkingsmethode beschreven door Gregory (4) werd nagewerkt. De terugvindingspercentages bedragen voor een standaardmengsel: PL 90%, PN 90% en PM 80%, voor kaas: PL 60%, PN 50% en PM 20%, en voor spinazie: PL 70%, PN 90% en PM 50%. Met behulp van deze voorzuivering verdwijnen de interferende componenten niet voldoende (als voorbeeld zie bijlage 7).

Het verhogen van de hoeveelheid wasvloeistof, 20 ml in plaats van 10 ml gaf geen verbetering, dit geldt ook voor het opvoeren van de molariteit van de wasvloeistof (0,2 M in plaats van 0,1 M). Door de pH van de wasvloeistof te verlagen kan de molariteit van de wasvloeistof en de hoeveelheid wasvloeistof worden verhoogd (wassen met 30 ml fosfaatbuffer 0,8 M pH 4.5). Deze verandering leidde niet tot een verbetering.

3.2.3 Solid Phase extraction

3.2.3.1 Cyano-kolom (3 ml)

Eerst werd het gedrag van de B₆ vitameren bekeken. Hiertoe werd 0,5 ml standaardoplossing, pH als variabele, op de kolom gebracht en werd vervolgens geëluëerd met vloeistoffen met dezelfde pH en zoutconcentratie als het standaardmengsel. Werd 0.1 N zwavelzuur gebruikt dan

werden de B₆ vitaminen met 1.5 ml kwantitatief geëluëerd (PL: 101%, PN:98% en PM 104%). De opwerking volgens deze methode van frontale analyse geeft niet het gewenste resultaat (als voorbeeld zie bijlage 8). Wordt 0,5 ml neutrale standaardoplossing opgebracht en vervolgens geëluëerd met water dan worden de B₆ vitaminen enigszins vertraagd. Na 3 ml water blijkt PL door te breken. Bij het gebruik van methanol blijken de B₆ componenten wel vastgehouden te worden. Een combinatie van bovenstaande: 0,5 ml extract PH 7 op de kolom brengen, spoelen met 3 ml water en 5 ml methanol en vervolgens elueren met 2 ml 0.1 N zwavelzuur geeft een lage recovery (b.v. PN:35%). Uit verdere experimenten bleek dat niet reproduceerbaar met dit type kolom gewerkt kon worden.

3.2.3.2 C₁₈-kolom

De mogelijkheden met dit kolommateriaal zijn zeer beperkt. Het blijkt dat vooral PM nagenoeg onafhankelijk van de pH nauwelijks vertraagd wordt. PN en PL worden meer vertraagd, echter dit heeft als nadelig resultaat dat een grote verdunning optreedt (factor 5). Wel kan deze verdunning tot een factor 2,5 worden teruggebracht door te elueren met 10% acetonitril in 0,5 N zoutzuur. De recoveries bedragen: PL 95%, PN: 90% en PM: 105%. Wanneer 0,5 ml standaardoplossing (pH 4) wordt opgebracht op de kolom en de kolom vervolgens met 1 ml oplossing (pH 10) wordt gespoeld en hierna met 2 ml 10% acetonitril in 0,5 N zoutzuur wordt geëluëerd. Deze clean up is echter niet effectief genoeg.

3.2.3.3 Zwak zure ionenwisselaar

Het blijkt niet mogelijk om de B₆-vitaminen goed op deze kolom vast te houden (uitgaande van extract met pH 4). Ook bij hogere pH (pH = 5.5) treedt geen toename van de retentie op. Daarom werd gekozen voor frontale analyse. De kolom wordt als volgt geconditioneerd: spoelen met 3 ml hexaan en gedurende 1 minuut drogen, vervolgens spoelen met 3 ml methanol, 3 ml water en 3 ml buffer pH 4 (50 ml HCl 0,1 N m.b.v. natriumacetaatoplossing 2,5 N op pH 4). Daarna werd 0,5 ml extract opgebracht, gespoeld met 250 µl buffer pH 2,2 (0.05 M kaliumdiwaterstof-fosfaat m.b.v. fosforzuur op pH 2.2) en geëluëerd met de fosfaatbuffer.

De recoveries bepaald aan de hand van standaarden zijn: PL: 100,9% ($S = 1,2$), PN: 98,4% ($S = 2,3$) en PM: 99,1% ($S = 1,8$), $n = 4$. Tevens werd de toepasbaarheid van 4-deoxypyridoxine (4-DPN) als interne standaard nader onderzocht (zie bijlage 9). De recovery voor 4-DPN, toegevoegd aan standaarden, bedraagt: 98,1% ($S = 1,6$, $n = 4$). De recovery voor 4-DPN, toegevoegd aan monsters (o.a. aardappel, spinazie en varkensvlees) bedraagt 97,6% ($S = 2,4$, $n = 12$).

De extracten bevatten interfererende componenten, de langzaam eluerende verbindingen zijn verdwenen. (zie hoofdstuk 3.3.1).

3.2.4 Kolomschakelen

Nadat bleek dat geen van de eerder beschreven monstervoorbewerkingsmethoden voor alle monsters voldeed, werd de toepasbaarheid van kolomschakelen nader bekeken. Enerzijds om de langzaam eluerende componenten kwijt te raken maar ook om, door eventueel toepassen van twee dimensionale chromatografie, een selectievere elutie te bewerkstelligen.

3.2.4.1 Opbouw en werking systeem

In eerste instantie werd gewerkt met een handmatig gestuurd systeem (bijlage 1a) (3). Het principe van dit systeem is als volgt: Beide kranen staan op de positie zwart. Een bepaalde tijd na injectie zullen de te onderzoeken componenten van kolom 1 elueren. Door kraan B te laten draaien (positie wit) wordt de vloeistofstroom over kolom 2 geleid. Nadat de B⁶-vitameren op kolom 2 zijn overgebracht wordt kraan A gedraaid. Hierdoor wordt kolom 1 in tegengestelde richting schoongespoeld en verdwijnen de zgn. langzaam eluerende componenten. Vervolgens wordt kraan A gedraaid en wordt de vloeistof stroom via beide kolommen naar de detector gevoerd. Een nadeel van dit systeem is dat schoonspoelen van kolom 1 en de analyse via kolom 2 niet gelijktijdig plaatsvinden.

In een later stadium werd het systeem geautomatiseerd, de voordelen hiervan zijn:

- minder kans op fouten
- forse arbeidsbesparing
- de mogelijkheid om 's nachts te analyseren komt vrij.

Door een extra pomp in het systeem op te nemen, en het systeem anders op te bouwen kan spoelen van kolom 1 enerzijds en de analyse en de integratie anderzijds gelijktijdig plaatsvinden (bijlage 1b), waardoor de analysetijd teruggebracht wordt van 32 naar 20 minuten. De (on)mogelijkheden en het bedieningsgemak van de toegepaste apparatuur hebben tot een complexe opbouw geleid: de injectieautomaat geeft bij de injectie een signaal aan de programmeerbare pomp. Door deze actie start het programma van de pomp, die op zijn beurt de met chromachart en chromadapt uitgeruste Apple II e start. De Apple II e stuurt de kranen en verzamelt de analysedata. De analyse verloopt als volgt: bij het begin van de analyse staan beide kranen op zwart (pomp A via kolom 1 en pomp B via 2). Een bepaalde tijd na injectie zullen de te onderzoeken componenten van kolom 1 elueren. Door kraan A te draaien wordt de vloeistofstroom van pomp A over kolom 1 + 2 geleid (A wit, B zwart). Nadat de B₆ vitameren op kolom 2 zijn gebracht worden beide kranen gedraaid (A zwart, B wit) waardoor de analyse via kolom 2 doorloopt en kolom 1 in tegengestelde richting wordt gespoeld. Na het verzamelen van de data geeft de Apple II e een signaal aan de pomp, waardoor de sturing weer door de pomp wordt overgenomen, en de Apple II e produceert hierna het analyserapport. Nadat kolom 1 is gespoeld geeft de pomp weer een signaal aan de Apple II e die de kranen weer in de uitgangspositie zet. Het systeem is nu gereed voor de volgende injectie.

3.3 Monsteronderzoek

3.3.1 Clean up met COOH-kolom

Aan de hand van voedingsmiddelen werd geprobeerd de optimale ontsluitingsprocedure vast te stellen. Vanwege het feit dat bij hand gestuurde kolomschakeling de kans op schakelfouten groot en daarbij tijdrovend is, werd de eerder beschreven zwak zure ionenwisselaar toegepast. Het effect van deze clean up is dat vooral de langzaam eluerende componenten verdwijnen. Voor dit experiment werden de monsters, aardappel, zuurkool en spinazie in de verhouding 1 + 1 vooraf gemalen met zwavelzuur 0,4 N en in de diepvries bewaard.

Na ontdooien werd 20 g extract vermalen met 40 ml zwavelzuur 0,2 N. Varkensvlees en een macrobiotische zuigelingenvoeding werden in de

verhouding 1 + 5 met zwavelzuur vermalen, hiervan werd na ontdooien 60 g in bewerking genomen. De extracten werden gedurende respectievelijk 15, 30 en 60 minuten geautoclaveerd, vervolgens werd de pH op 4 gebracht (natriumacetaat 2,5 N) en gedurende 20 minuten enzymatisch gehydrolyseerd (10 ml 10% mylase 100, T = 40^o C). Vervolgens werd de interne standaard 4-DPN toegevoegd, het volume op 100 ml gebracht en het extract gefiltreerd. Hierna werd het filtraat gezuiverd over de COOH kolom (zie hoofdstuk 3.2.3.3) en geïnjecteerd op het chromatografisch systeem (zie bijlage 10).

Chromatografie:

Kolommen: 125 + 250 x 4 mm Lichrospher, eluens: 0.0075 mol natriumheptaansulfonaat, 0.0075 mol tetra-ethylammoniumchloride en 0.05 M kaliumdiwaterstoffsfaat oplossen in 500 ml water, op pH 2.6 brengen m.b.v. fosforzuur, 95 ml acetonitril toevoegen en aanvullen tot 1000 ml.

Tabel 2: Gehalte aan B₆ vitameren als functie van de zure hydrolysetijd van een vijftal produkten. Clean up met COOH-kolom.

produkt	autoclaaf-tijd (min)	Gehalte PL	(mg/100 g) PN	PM	Totaal gehalte (mg/100 g)	Recovery 4-DPN (%)	Op recovery gecorrigeerd totaal gehalte (mg/100 g)
aardappel	15	0,037	0,044	0,015	0,096	98,4	0,098
	30	0,040	0,055	0,015	0,110	98,5	0,112
	60	0,034	0,076	0,015	0,125	97,0	0,129
vrouw	15	-	0,031	0,030	0,061	100,3	0,061
holle	30	-	0,038	0,029	0,067	100,9	0,066
	60	-	0,055	0,031	0,086	99,0	0,087
spinazie	15	0,060	0,016	0,015	0,091	114,2	0,080
	30	0,063	0,016	*	*	*	*
	60	0,067	0,020	0,014	0,101	94,5	0,107
varkens-	15	0,300	0,031	0,066	0,397	96,0	0,414
vlees	30	0,250	0,033	0,070	0,353	92,4	0,382
	60	0,175	0,033	0,071	0,279	*	*
zuurkool	15	0,012	0,078	0,026	0,116	97,8	0,119
	30	0,013	0,078	0,026	0,117	98,0	0,119
	60	0,015	0,082	0,026	0,113	98,4	0,125

- = gehalte nihil

* = gegevens ontbreken

recovery 4-DPN: 98,9%, S = 5,1, n = 13.

Uit tabel 2 blijkt dat het totaalgehalte voor alle plantaardige producten toeneemt met toenemende autoclaaftijd. Voor varkensvlees ligt de optimale autoclaaftijd bij 15 minuten. De A.O.A.C. past bij de monsterontsluiting voor dierlijke producten een andere procedure toe dan voor plantaardige producten (5).

Bognar (6) vindt voor aardappel een gemiddeld gehalte van 0,079 mg/100g ($n = 7$ $S = 0,01$) en voor varkensvlees 0,402 - 0,570 mg/100 g. Vanderslice (7) vermeldt een gehalte van respectievelijk 0.140 - 0.270 mg/100 g en 0.260 - 0.610 mg/100 g. Het gevonden gehalte voor aardappel wijkt sterk af met hetgeen Bognar vermeldt. Hij voert alleen een zure hydrolyse uit (30 min, 121 °C, 0,2 N zwavelzuur) en komt tot de conclusie dat dan de fosforzure esters kwantitatief gehydrolyseerd zijn. Dit is in tegenspraak met hetgeen eerder werd gevonden (2). Vanderslice bepaalt en de fosforzure esters en het vrije vitamine B₆. De gevonden gehalten stemmen redelijk, met hetgeen hij vindt, overeen.

3.3.2 Clean up via kolomschakelen

Een aantal producten werd onderzocht. Hiertoe werd 10 g monster met 50 ml zoutzuur 0,1 N vermalen (het gebruik van zowel zoutzuur als zwavelzuur wordt in de literatuur beschreven). Vervolgens werd gedurende 30 minuten gehydrolyseerd bij verhoogde temperatuur. De pH van de extracten werd op 4 gebracht (natriumacetaat 2,5 N) en 10 ml 10% mylase 100 werd toegevoegd. Na de enzymatische hydrolyse (60 minuten bij 40 °C, veiligheidsmarge in tijdsduur is factor 3 zie hfd 3.5.1) werd het volume op 100 ml gebracht. Het extract werd gefiltreerd en vervolgens geïnjecteerd. Bij de analyse werd gebruik gemaakt van het handgestuurde schakelsysteem (bijlage 1A en bijlage 11).

Kolommen:

Hypersil 50DS, 150 x 4,6 mm en 250 x 4,6 mm.

Eluens:

0,05 mol kaliumdiwaterstoffosfaat, 0,0075 mol natriumheptaansulfonaat en 0,0075 mol tetra-ethylammoniumchloride oplossen in 500 ml water op pH 2,6 brengen met fosforzuur, brengen met 100 ml acetonitril en aanvullen tot 1000 ml.

Tabel 3: gehalte aan vitamine B₆ in een aantal produkten bepaald
m.b.v. één dimensionale chromatografie

produkt	gehalte (mg/100 g)			totaal gehalte (mg/100 g)
	PL	PN	PM	
varkensvlees	0,190	0,045	0,056	0,291
spruit	0,077	0,050	0,053	0,180
zilvervliesrijst	0,021	0,041	0,076	0,138
zuurkool	0,009	0,118	0,029	0,156
eigeel	0,159	*	0,016	0,175
rode kool	0,003	0,034	0,018	0,055
spinazie	0,075	0,010	0,018	0,103
kaas	0,007	*	0,045	0,052
melk	0,055	*	0,022	0,077
brood	0,020	0,037	0,022	0,079

* = gegevens ontbreken

In de literatuur worden de volgende gehalten vermeld:

Tabel 4: Gehalten van vitamine B₆ vermeld in literatuur.

	Bognar (6) gehalte (mg/100 g)			Vanderslice (7) gehalte (mg/100 g)	
	PL	PN	PM	totaal	
varkens- vlees	0.287-0.385	0-0.05	0.111-0.130	0.402-0.570	0.260-0.610
eigeel ¹⁾	0.234	-	0.018	0.252	0.270-0.540
melk	-	-	0.022	0.022	0.020-0.070

1) Beide auteurs vermelden het gehalte aan vitamine B₆ in ei. Om dit gehalte te kunnen vergelijken met het gehalte in eigeel is een correctiefactor 3 toegepast (een ei bestaat voor 1/3 deel uit eigeel, in eiwit zit geen vitamine B₆).

De gevonden gehalten stemmen het best overeen met de cijfers die Vanderslice vermeldt. Opgemerkt moet worden dat de ontsluitingsprocedure nog niet geoptimaliseerd is.

Vervolgens werd onderzocht of door toepassing van twee dimensionale chromatografie de noodzakelijke selectiviteits winst behaald kon worden. Hiertoe werden vier van dezelfde produkten, die al eerder m.b.v. de één dimensionale chromatografie waren onderzocht, op identieke wijze ontsloten, geanalyseerd en de resultaten onderling vergeleken (zie tabel 3).

Kolommen:

μ Bondapack phenyl 10 μm (150 x 3.9 mm) en Hypersil ODS 5 μm (250 x 4.6 mm).

Eluens:

Zoals bij een dimensionale chromatografie, uitzondering: acetonitrilgehalte in dit geval 7%.

Tabel 5: gehalte aan vitamine B₆ in een aantal produkten bepaald m.b.v. twee dimensionale chromatografie.

produkt	PL	gehalte mg/100 g		totaal
		PN	PM	
spruit	0,072	0,060	0,029	0,161
spinazie	0,068	0,015	0,012	0,095
zuurkool	0,010	0,108	0,022	0,140
rode kool	0,012	0,252	0,012	0,276

Het blijkt dat het PN-gehalte van rode kool sterk afwijkt. Dit enorme verschil wordt veroorzaakt door het feit dat PN in dit geval cōelueerd met een onbekende component uit de rode kool. Deze onbekende component werd m.b.v. één dimensionale chromatografie wel van PN gescheiden. De gehalten van de andere produkten stemmen redelijk met elkaar overeen. De aldus toegepaste twee dimensionale chromatografie levert niet de noodzakelijke selectiviteitswinst (bijlage 12).

3.4 Produkten van dierlijke oorsprong

Gezien het feit dat een aparte ontsluitingsprocedure voor produkten van dierlijke oorsprong vastgesteld moet worden en het aantal interferenties niet hoog is, is hier eerst aandacht aan besteed.

Variabelen die nader onderzocht werden zijn:

- zuurconcentratie
- hydrolysetijd (zuur)
- hydrolysetijd (enzymatisch)

De temperatuur is voor beide gevallen niet gevarieerd. Bij de enzymatische hydrolyse werden de concentratie van het enzym en de pH waarbij de hydrolyse wordt uitgevoerd ook niet gevarieerd.

Kolommen:

Lichrospher 5 μ m C₁₈ 125 x 4 mm en 250 x 4 mm

Eluens:

0,1 mol kaliumdiwaterstoffosfaat, 0,015 mol natriumheptaansulonaat en 0,0075 mol tetra-ethylammoniumchloride oplossen in 500 ml water, pH op 2,6 brengen met behulp van fosforzuur, mengen met 100 ml acetocitril en aanvullen tot 1 liter.

3.4.1 Zuurconcentratie en hydrolysetijd

Hiertoe zijn 3 verschillende soorten vlees (varken, rund en kip) opgewerkt waarbij de hydrolyseduur en de zuurconcentratie zijn gevarieerd: 5 gram vlees, gemalen onder vloeibare stikstof, werd vermalen met 50 ml zwavelzuur, na zure hydrolyse werd het monsterextract m.b.v. natriumacetaat op pH 4 gebracht, vervolgens werd 10 ml 10% mylase 100 toegevoegd en gedurende 20 minuten bij 40^o C geïncubeerd, het monsterextract werd gefiltreerd en tenslotte geïnjecteerd op het geautomatiseerde systeem.

Tabel 6: gehalte aan vitamine B₆ in drie soorten vlees als functie van de hydrolyseduur en zuurconcentratie. (gemiddelde van 2 waarnemingen).

vlees	hydrolyseduur (min)	zuurconcentratie (N)	gehalte (mg/100 g)			totaal
			PL	PN	PM	
varken	15	0,1	0,273	0,028	0,069	0,370
	15	0,2	0,284	0,032	0,060	0,376
	30	0,1	0,241	0,032	0,066	0,339
	30	0,2	0,256	0,045	0,060	0,368
	60	0,1	0,183	0,036	0,081	0,300
	60	0,2	0,217	0,034	0,069	0,320
rund	15	0,1	0,038	0,025	0,118	0,181
	15	0,2	0,044	0,031	0,116	0,193
	30	0,1	0,057	0,024	0,149	0,230
	30	0,2	0,067	0,023	0,141	0,231
	60	0,1	0,043	0,024	0,140	0,207
	60	0,2	0,061	0,024	0,140	0,225
kip	15	0,1	0,471	0,001	0,132	0,604
	15	0,2	0,558	0,019	0,130	0,707
	30	0,1	0,365	*	0,159	*
	30	0,2	0,533	0,022	*	*
	60	0,1	0,320	0,021	0,140	0,481
	60	0,2	0,463	0,018	*	*

* = gegevens ontbreken

Uit tabel 6 blijkt dat bij het gebruik van 0,2 N zuur de hoogste totaalwaarde aan vitamine B₆ wordt gevonden. Ook blijkt dat een hydrolyseduur van 15 minuten het optimum is voor varkens- en kippevlees, voor rundvlees ligt het optimum bij 30 minuten.

Vervolgens werd vastgesteld of een verhoging van de zuurconcentratie leidt tot een hoger totaalgehalte aan vitamine B₆. Het vlees werd gemalen met een moulinex en vervolgens vermalen met zwavelzuur in de verhouding: 1 + 5, 30 g slurry werd gemengd met 25 ml zwavelzuur.

Na de zure hydrolyse werd het extract op pH 4 gebracht (natriumacetaat 2,5 N), 10 ml 10% mylase 100 toegevoegd en gedurende 20 minuten geïncubeerd bij 40 °C.

Tabel 7: gehalte aan vitamine B₆ in drie soorten vlees als functie van de hydrolyseduur en zuurconcentratie (gemiddelde van 2 waarnemingen).

vlees	hydrolyseduur	zuurconcentratie	PL	gehalte (mg/100 g)		
				PN	PM	totaal
varken	15	0,2	0,358	-	0,067	0,425
	15	0,3	0,345	-	0,066	0,411
	15	0,4	0,330	-	0,063	0,392
	30	0,3	0,340	-	0,066	0,406
	30	0,4	0,327	-	0,061	0,389
rund	15	0,2	0,286	-	0,182	0,468
	15	0,3	0,289	-	0,184	0,473
	15	0,4	0,287	-	0,181	0,467
	30	0,3	*	*	*	*
	30	0,4	0,290	-	0,184	0,474
kip	15	0,2	0,666	-	0,082	0,748
	15	0,3	0,652	-	0,087	0,740
	15	0,4	0,620	-	0,091	0,713
	30	0,2	0,637	-	0,090	0,726
	30	0,3	0,634	-	0,096	0,730
	30	0,4	0,602	-	0,094	0,697

- = nihil

* = gegevens ontbreken

De afwijkende gehalten, vooral bij rundvlees, tussen de twee proeven (Tabel 6 en 7) kunnen als volgt worden verklaard: bij het eerste experiment werden de monsters gemalen onder vloeibare stikstof en vervolgens in de diepvries bewaard.

Dit heeft vooral invloed op het PL-gehalte en het voorkomen van PN. Bij de tweede proef zijn de monsters vermalen met zwavelzuur en vervolgens bewaard in de diepvries. Tevens blijkt dat bij toenemende hydrolysetijd of een hydrolyse met een hogere zuurconcentratie een afname van PL en een lichte toename van PM valt waar te nemen. Dus enerzijds wordt PL afgebroken en anderzijds wordt of PL omgezet in PM of er wordt nog PM vrijgemaakt uit de matrix, dan wel uit PMP. Gezien het bovenstaande en het feit dat bij rundvlees bij het tweede experiment een niveau wordt gevonden dat onafhankelijk is van hydrolyseduur en zuurconcentratie wordt voor vlees voor de volgende combinatie gekozen: 15 minuten hydrolyseren met 0,2 N zwavelzuur bij 121^o C.

3.4.2 Enzymatische hydrolyse

Wanneer de standaard fosforzure esters van vitamine B₆ enzymatisch worden behandeld m.b.v. Mylase 100 dan zijn deze esters na circa 20 minuten volledig omgezet (zie hoofdstuk 3.5.1). Nagegaan werd, m.b.v. vleesmonsters, hoe lang enzymatisch gehydrolyseerd moet worden nadat al 15 minuten is gehydrolyseerd bij 121^o C bij een zuurconcentratie van 0,2 N. Hiertoe werd vlees gemalen met een Moulinex en 100 g hiervan werd gemalen met 800 g zwavelzuur 0,2 N, uit deze slurry werd 45 g gemengd met 10 ml zwavelzuur 0,2 N. Na de zure hydrolyse werd het extract m.b.v. natriumacetaat 2,5 N op pH 4,0 gebracht, vervolgens werd 10 ml 10% Mylase 100 toegevoegd en geïncubeerd gedurende respectievelijk 0, 20, 40 en 60 minuten bij 40^o C. Hierna werd het volume op 100 ml gebracht.

Tabel 8: Gehalte aan vitamine B₆ als functie van de enzymatische hydrolyseduur. (gemiddelde van 2 waarnemingen).

vlees	hydrolyseduur (min)	gehalte (mg/100 g)			
		PL	PN	PM	totaal
varken	0	0,300	-	0,033	0,333
	20	0,300	-	0,086	0,386
	40	0,298	-	0,090	0,388
	60	0,310	-	0,092	0,402
rund	0	0,293	-	0,036	0,329
	20	0,298	-	0,109	0,407
	40	0,298	-	0,118	0,416
	60	0,296	-	0,120	0,416
kip	0	0,672	-	0,040	0,712
	20	0,667	-	0,094	0,761
	40	0,676	-	0,099	0,775
	60	0,656	-	0,099	0,755

- = nihil

Uit tabel 8 blijkt dat het optimum voor de enzymatische ontsluiting van vleesextracten bij 40 minuten ligt.

De optimale ontsluitingsprocedure voor vlees is dus:

- zure hydrolyse gedurende 15 minuten bij 121^oC, zwavelzuurconcentratie 0,2 N.
 - enzymatische hydrolyse gedurende 40 minuten bij 40^oC, enzymconcentratie: 10 ml 10% Mylase 100 per $\pm$ 50 ml extract (zie bijlage 13).
- Inmiddels bleek ook het enzym Mylase 100 uit de handel te zijn genomen, zodat wederom naar een alternatief gezocht moet worden (zie hoofdstuk 3.5).

3.5 Enzymatische hydrolyse

In totaal zijn, naast Clara diastase, vier enzymen op hun toepasbaarheid getest: Mylase 100, Diastase, Taka diastase en een fosfatase.

3.5.1 Mylase 100

Aan 50 ml standaardoplossing van de fosforzure esters, niveau 0,05 mg/100 g en 0,10 mg/100 g op produktbasis bij een inweeg van 10 g, werd 10 ml 10% Mylase 100 toegevoegd en vervolgens geïncubeerd bij 40^o C.

Tabel 9: De omzetting van de fosforzure esters als functie van de tijd.

	PLP-→PL (% PL/PLP)		PMP-→PM (% PM/PMP)		PNP-→PN (% PN/PMP)	
niveau (mg/100 g) op produktbasis	0,05	0,10	0,05	0,10	0,05	0,10
reactie tijd (min)						
20	98	97	102	103	101	97
40	98	96	100	101	96	94
60	97	96	101	102	95	94

Uit tabel 9 blijkt dat de omzetting na 20 minuten kwantitatief is.

3.5.2 Diastase

Aan 5 ml respectievelijk 1 ml standaardoplossing van de fosforzure esters van vitamine B₆ (pH 4,0), niveau 0,1 mg/100 g op produktbasis bij inweeg van 10 g en een volume van 100 ml, werd 1 ml enzymoplossing toegevoegd (5 g Diastase + 25 ml water). Vervolgens werd geïncubeerd bij 45°C en de omzettingsgraad werd bepaald. Tevens werd de vitamine B₆ stabiliteit onder deze condities onderzocht: 5 ml standaardoplossing, (pH 4) niveau 0,1 mg/100 g, werd gemengd met 1 ml water en verwarmd tot 45°C.

Uit bovenstaande experimenten blijkt dat:

- Diastase niet geschikt is als enzym omdat componenten afkomstig uit de diastase coëlueren met de B₆ vitaminen.
- Na 4 uur is $\pm$ 80% PLP omgezet in PL, is $\pm$ 110% PNP omgezet in PN en is $\pm$ 90% PMP omgezet in PM.
- Vitamine B₆ onder de beschreven omstandigheden stabiel is.
(PL: 108%, PN: 101% en PM 100%)

3.5.3 Taka diastase

Aan 100 ml standaardoplossing (pH 4,5) van de fosforzure esters van vitamine B₆, niveau zoals bij diastase, werd 2 g Taka diastase toegevoegd. Vervolgens werd gehydrolyseerd bij 40°C en de omzettingsgraad werd bepaald. De omzetting na 65 minuten bedraagt: PLP: 13%, PNP: 100% en PMP: 4%. Uit bovenstaande valt af te leiden dat, in ieder geval voor wat de praktische uitvoerbaarheid betreft, Taka diastase ongeschikt is.

3.5.4 Fosfatase

De zuurtegraad voor de hydrolyse met b.v. fosfatase ligt, volgens opgave v.d. fabrikant bij pH 4,8. Injectie van een monsterextract met pH 4,8 heeft tot gevolg dat de piekvorm minder ideaal is. Daarom werd de bufferconcentratie van het eluens aangepast.

Eluenssamenstelling:

0,15 mol kaliumdiwaterstoffosfaat, 0,045 mol natriumheptaansulfonaat en 0,0075 mol tetra-ethylammoniumchloride oplossen in 500 ml water, de pH op 2,6 brengen, mengen met 100 ml acetonitril en aanvullen tot 1000 ml.

5 ml standaardoplossing van de fosforzure esters van vitamine B₆, niveau zoals bij diastase, pH 4,8 resp. pH 4,5 werd gemengd met 1 ml enzymoplossing (concentratie $2 \text{ mg/ml H}_2\text{O} \hat{=} 9,6 \text{ U/ml H}_2\text{O}$). Vervolgens werd geïncubeerd bij 37°C en de omzettingsgraad werd m.b.v. HPLC bepaald. Tevens werd de standaardstabiliteit bij pH 4,8 gecontroleerd (zie diastase).

Tabel 10: De omzetting van de fosforzure esters als functie van de tijd (pH 4,8).

hydrolysetijd (min)	PLP→PL (% PL/PLP)	PNP→PN (% PN/PNP)	PMP→PM (% PM/PMP)
50	87	90	53
93	94	95	77
130	95	94	83
160	102	97	93
185	103	97	95

Tabel 11: De omzetting van de fosforzure esters als functie van de tijd (pH 4,5).

hydrolysetijd (min)	PLP→PL (% PL/PLP)	PNP→PN (% PN/PNP)	PMP→PM (% PM/PMP)
61	90	93	35
105	96	95	50
140	97	97	61
200	92	89	66

- Het blijkt dat de omzetting bij pH 4,8 na 185 minuten nagenoeg volledig is.
- De omzetting bij pH 4,5 gaat minder snel dan bij pH 4,8.
- Vitamine B₆ is onder de beschreven omstandigheden stabiel (pH 4,8 T: 37°C). Na 170 minuten in de recovery voor PL: 105% voor PN: 98% en voor PM: 99%.

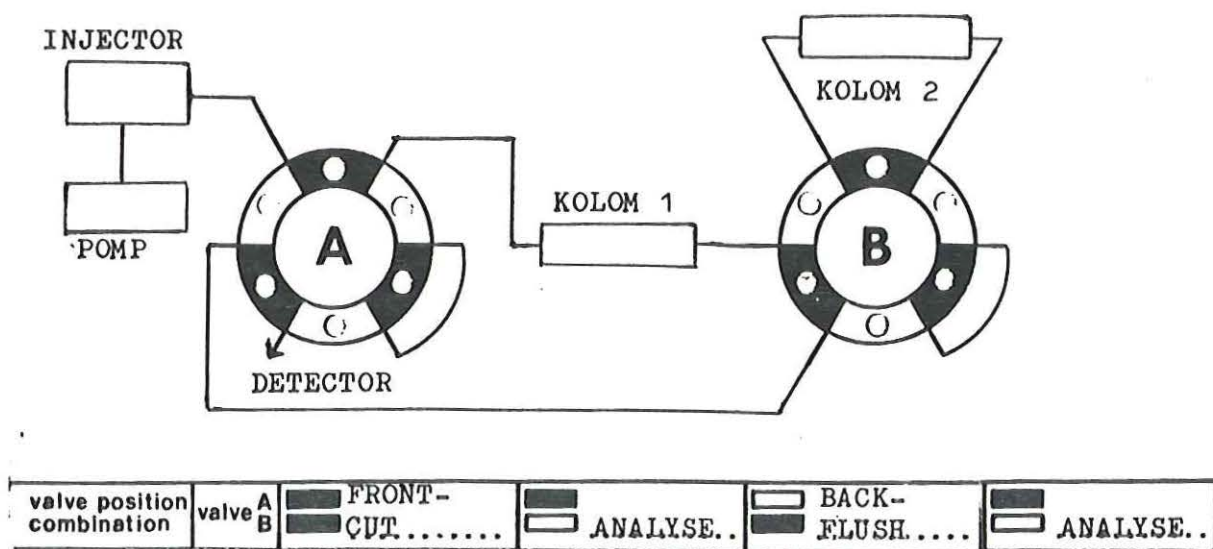
Van de geteste alternatieven is fosfatase (pH 4,5) de meest geschikte. Na 185 minuten zijn de fosforzure esters omgezet in de vrije vorm.

4 CONCLUSIES

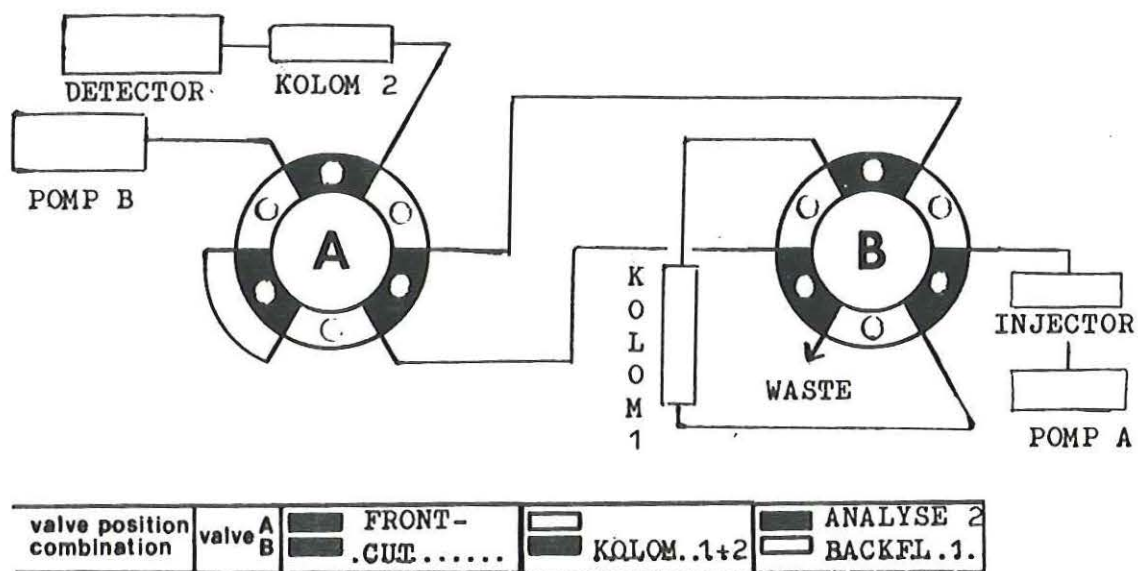
De gecombineerde ontsluitingsprocedure (zure en enzymatische hydrolyse) is het meest geschikt voor de bepaling van vitamine B₆ in voedingsmiddelen. Wanneer alleen de zure hydrolyse wordt toegepast dan blijkt de intensiteit en het aantal interferenties en het aantal langzaam eluerende componenten groter te zijn dan bij de gecombineerde ontsluiting. Vooral plantaardige produkten, opgewerkt met de gecombineerde methode, blijken interferenties en langzaam eluerende componenten te bevatten zodat de uitgangsmethode niet algemeen toepasbaar is. Door de isopropanol in het eluens te vervangen door acetonitril kon een selectievere elutie worden bewerkstelligd. Vooral pyridoxal wordt dan beter van de matrixcomponenten gescheiden. De toepassing van een phenyl-kolom (één dimensionaal) gaf geen betere scheiding. Om tot een effectieve clean up te komen is een aantal type SPE-kolommen (cyano, C₁₈ en COOH) en een sterk zure ionenwisselingskolom getest. Geen van de monstervoorbewerkingsmethoden blijkt te voldoen. Wel kunnen met behulp van de COOH-kolom de langzaam eluerende componenten worden verwijderd maar niet de interferenties. 4-DPN is hierbij een geschikte interne standaard (recovery 4-DPN: $\bar{x} = 98,9$, $n = 13$, $s = 5,1$). De toepassing van twee dimensionale chromatografie (phenyl en C₁₈ kolom) met kolomschakeling levert niet de noodzakelijke selectiviteitswinst. Bij rode kool bleek een stoorcomponent te coëlueren met pyridoxine. Kolomschakeling met twee C₁₈-kolommen blijkt een effectieve oplossing voor het verwijderen van de langzaam eluerende componenten. Verder kwam vast te staan dat er aparte ontsluitingsprocedures voor plantaardige en voor dierlijke produkten opgesteld moeten worden. Als optimale procedure voor vleesprodukten werd vastgesteld: ontsluiting van het monster in 0,2 N zwavelzuur gedurende 15 minuten bij 121 °C, gevolgd door een enzymatische hydrolyse (Mylase 100, pH 4) gedurende 40 minuten. Tijdens het onderzoek bleek dat het enzym Mylase 100 niet meer leverbaar is zodat naar een alternatief gezocht moest worden. Van de drie geteste enzymen bleek fosfatase het meest geschikt. Aan de hand van monsters zal het optimum nog vastgesteld moeten worden.

LITERATUUR

- 1) RIKILT rapport 83.77. Literatuuroverzicht analysemethoden voor vitamine B₆ in voedingsmiddelen.
- 2) RIKILT rapport 85.34. Ontwikkeling methode voor het bepalen van vitamine B₆ in levensmiddelen.
- 3) Tuinstra, L.G.M.Th., Traag, W.A., Keukens, H.J.: De Ware(n) Chemicus, 11 (1981), 129.
- 4) Gregory, J.F., Kirk, J.R.: J. Food Sci., 42 (1977), 1073.
- 5) Horwitz, W.: Official Methodes of Analysis of the association of Official Analytical Chemist 43.159 pag. 849, 12e ed., Washington.
- 6) Bognar, A.: Z. Lebensm. Unters. Forsch., 181 (1985) 200.
- 7) Vanderslice e.a.: J. Agric. Food Chem., 28, 1145.

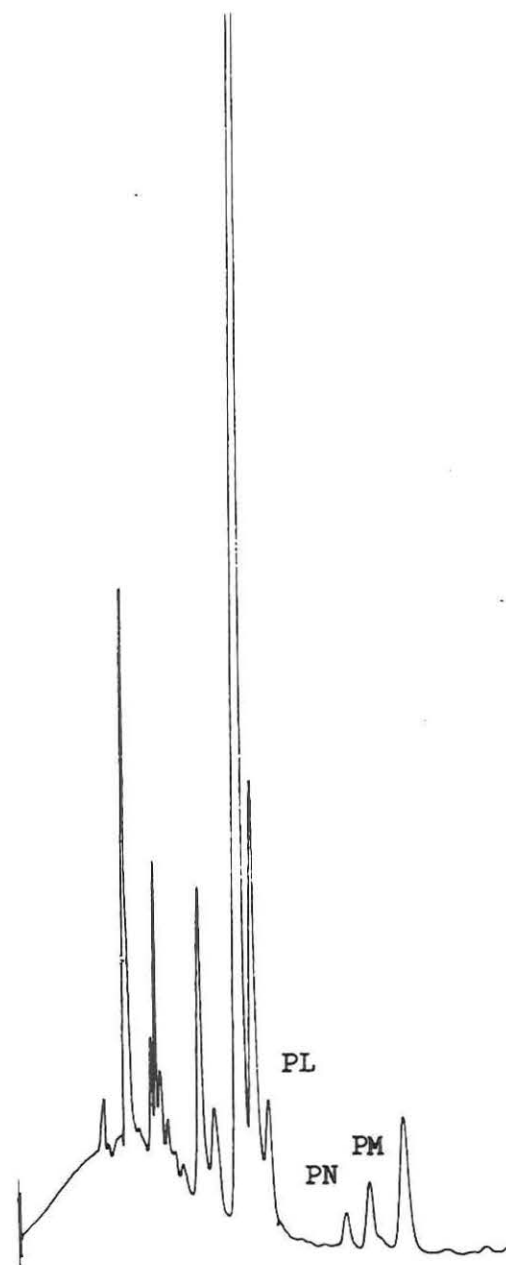


Bijlage 1A: handmatig gestuurde systeem

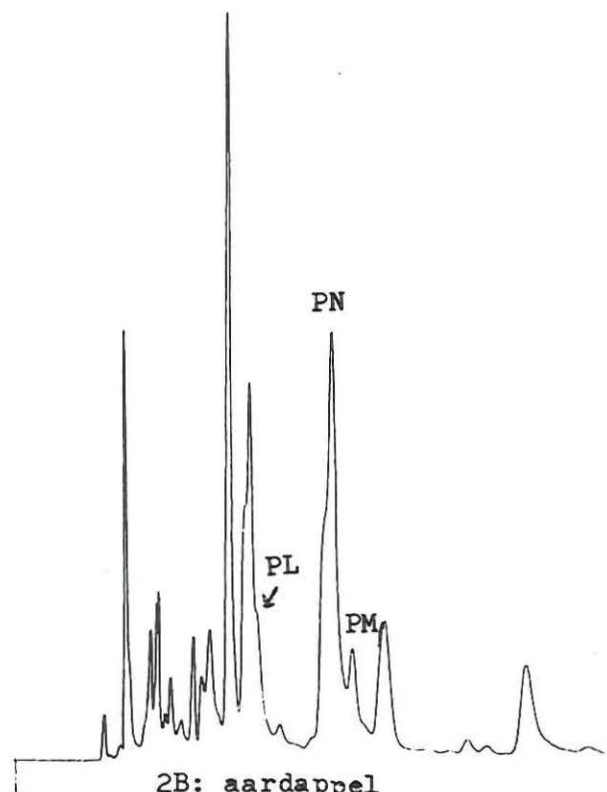


Bijlage 1B: geautomatiseerde systeem

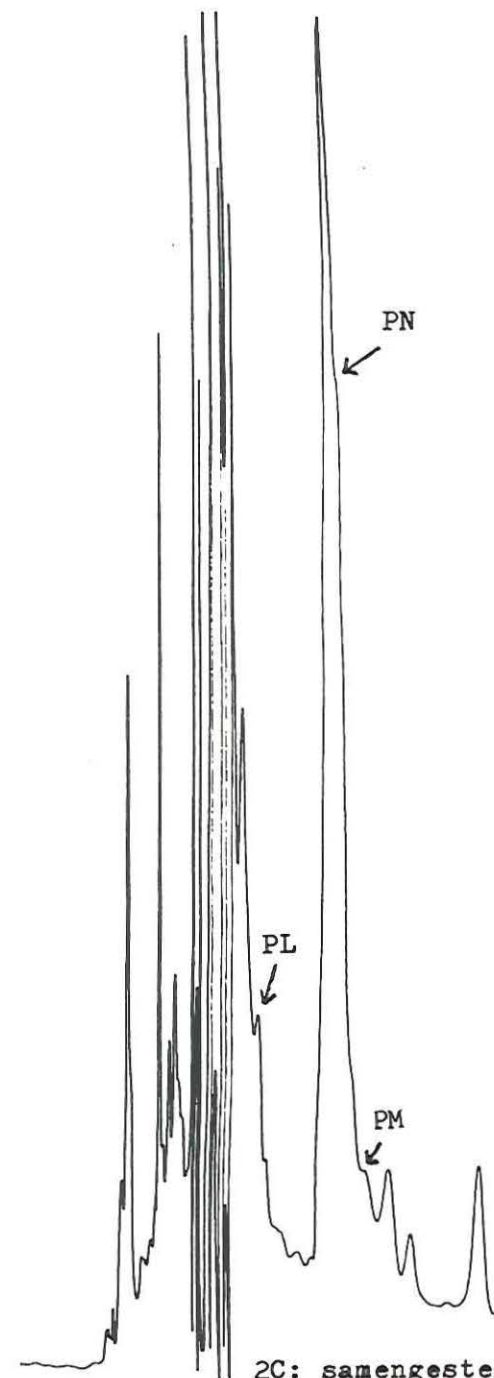
Bijlage 1: kolomschakelsystemen



2A: spinazie

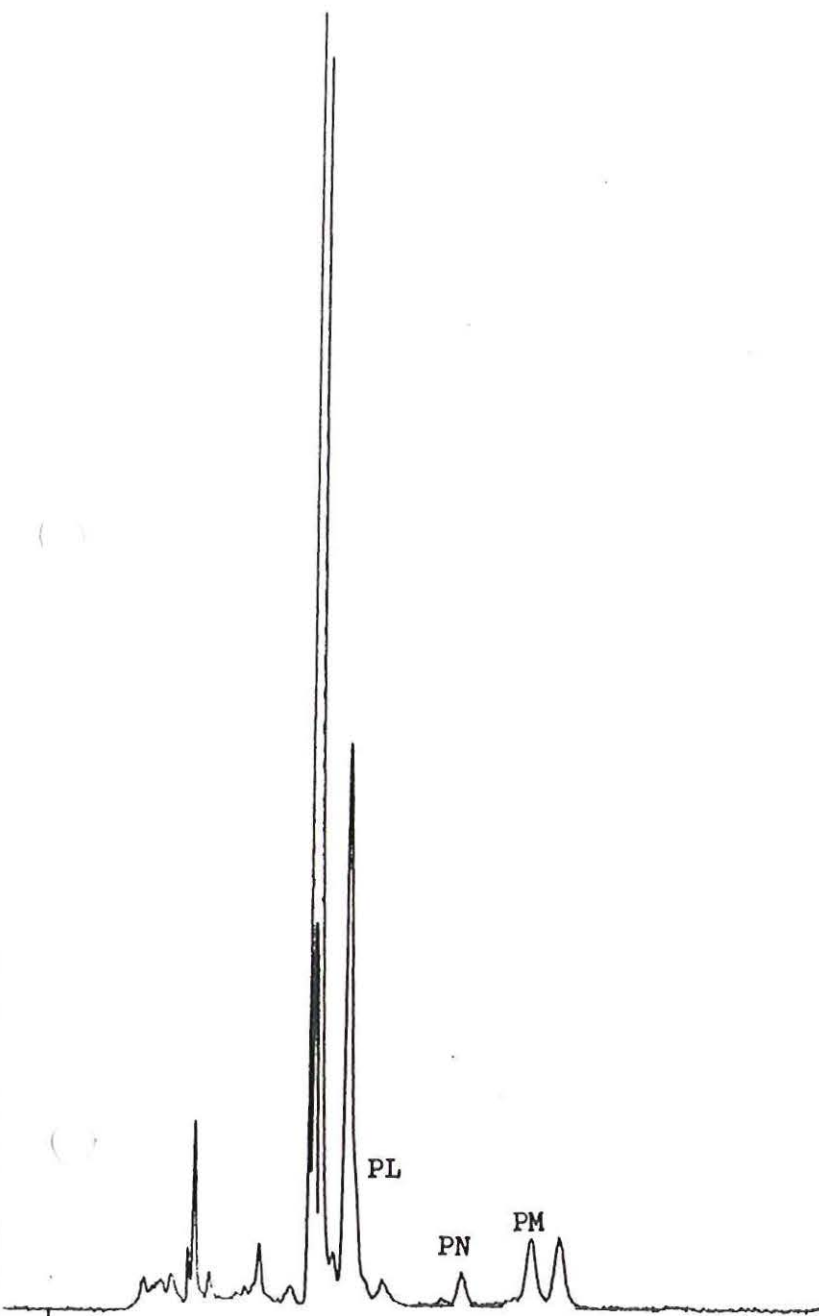


2B: aardappel

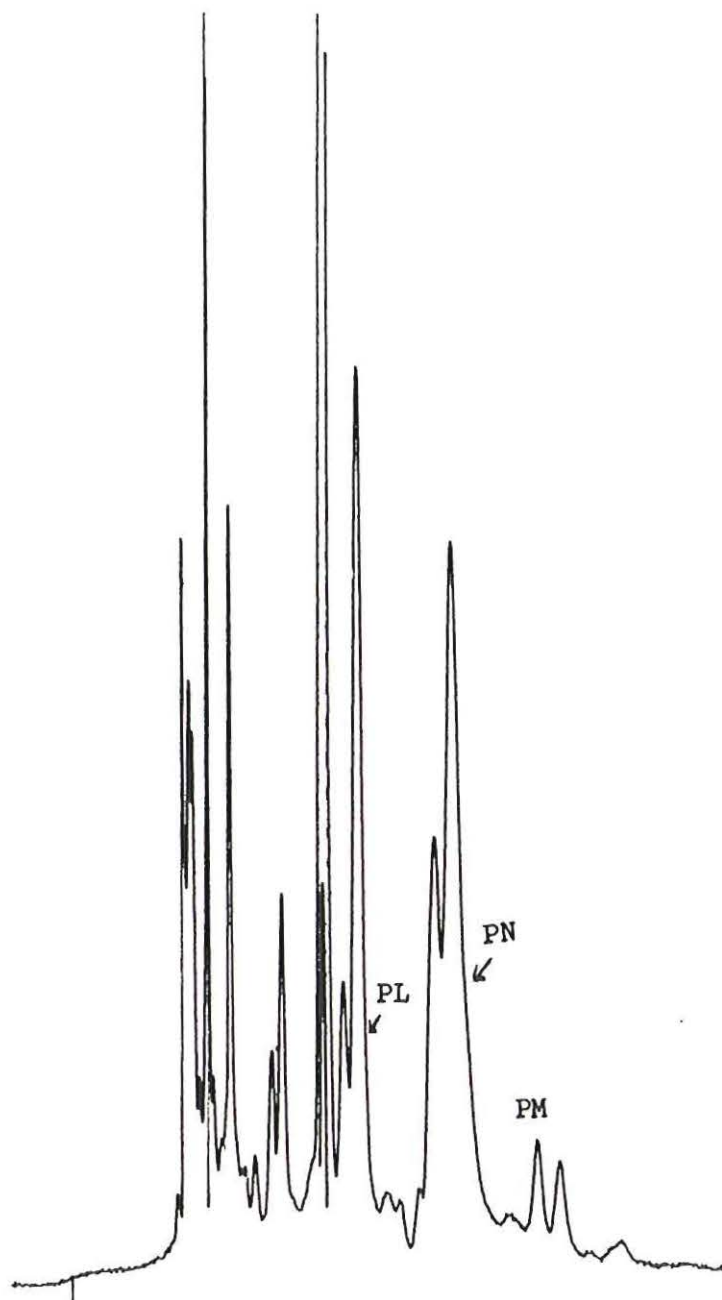


2C: samengestelde maaltijd

Bijlage 2: chromatogrammen van een aantal produkten na zure hydrolyse (5 uur 121°C, 0,2 n H_2SO_4)
 Cromatografie zie bijlage 3



Bijlage 3A: extract $\frac{1}{2}$ uur

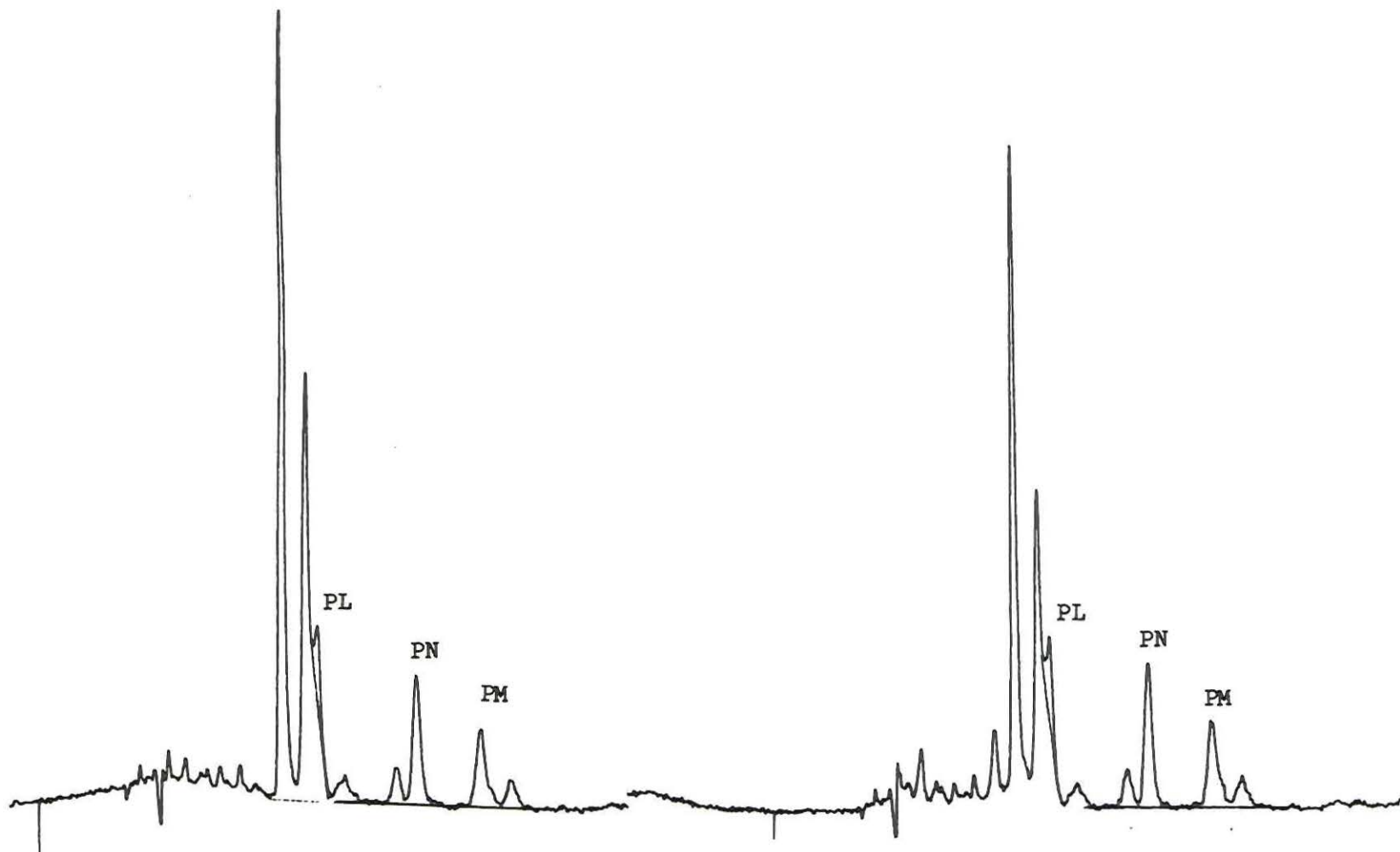


Bijlage 3B: extract 5 uur

Bijlage 3: erwtenextract $\frac{1}{2}$ uur resp. 5 uur ontsloten (121°C , $0.2 \text{ n H}_2\text{SO}_4$)

Chromatografie: kolom Hypersil 50DS, $250 * 4.6 \text{ mm}$.

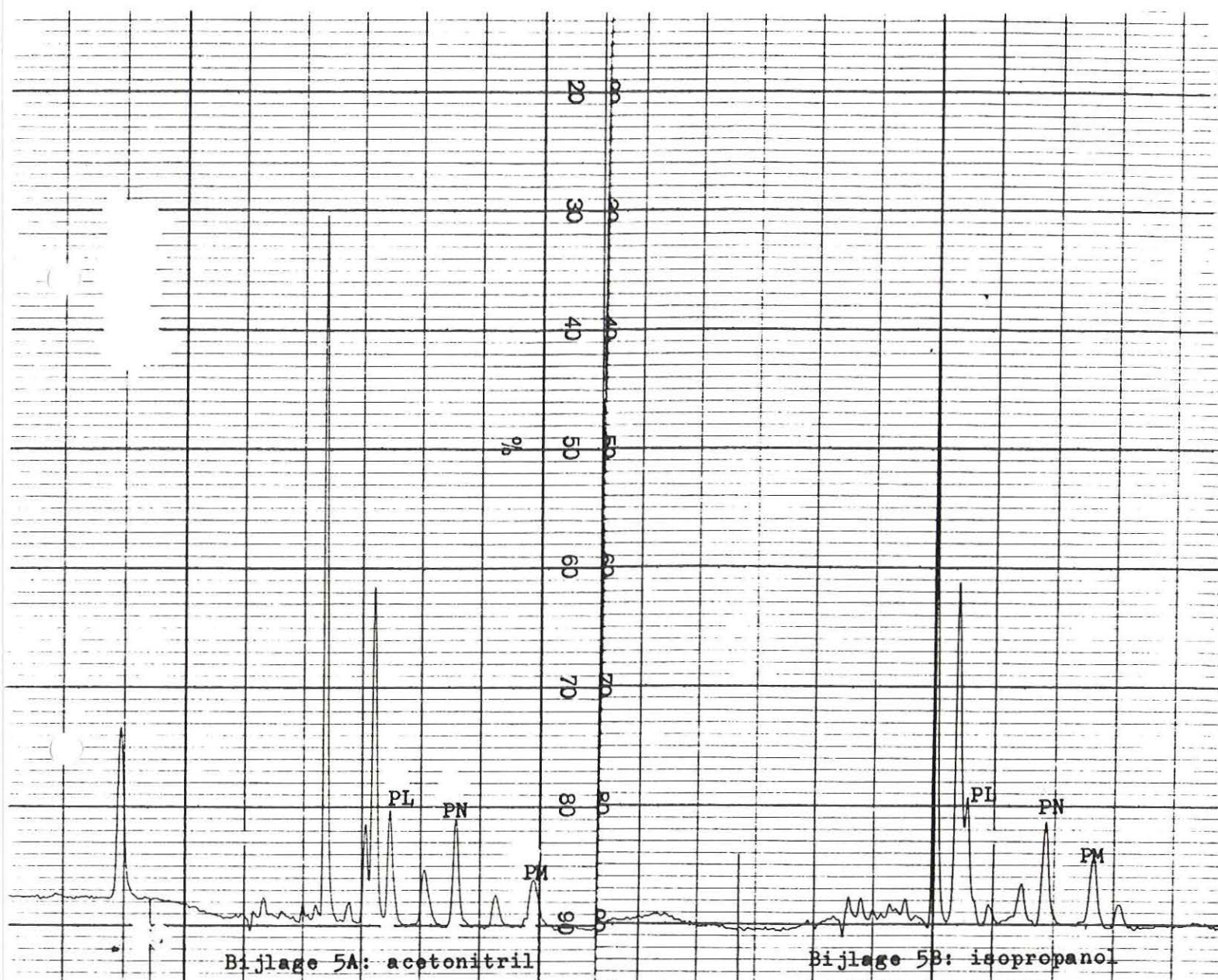
eluens $0.05 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, $0.0075 \text{ M NaC}_7\text{H}_{15}\text{O}_3\text{S}$, $0.0075 \text{ M (C}_2\text{H}_5)_4\text{NCl}$,
 $10 \% \text{ acetonitril}$.



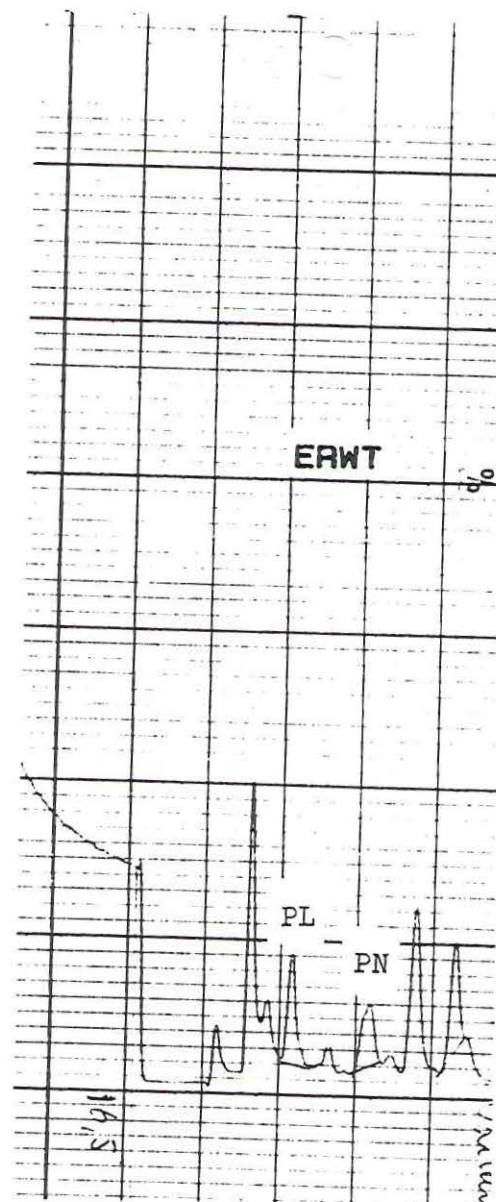
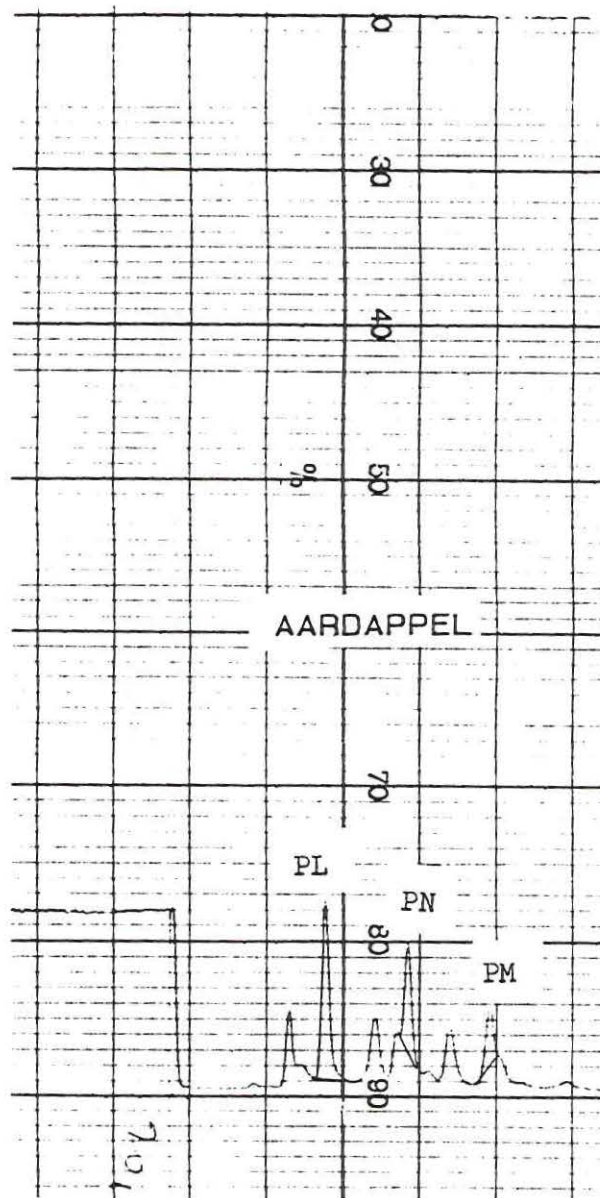
Bijlage 4A: aardappelextract $\frac{1}{2}$ uur bij 121 C
0.2 n H_2SO_4

Bijlage 4B: aardappelextract $\frac{1}{2}$ uur bij 121 C
0.2 n H_2SO_4 en $\frac{1}{4}$ uur bij 40 C
pH 4, Mylase 100.

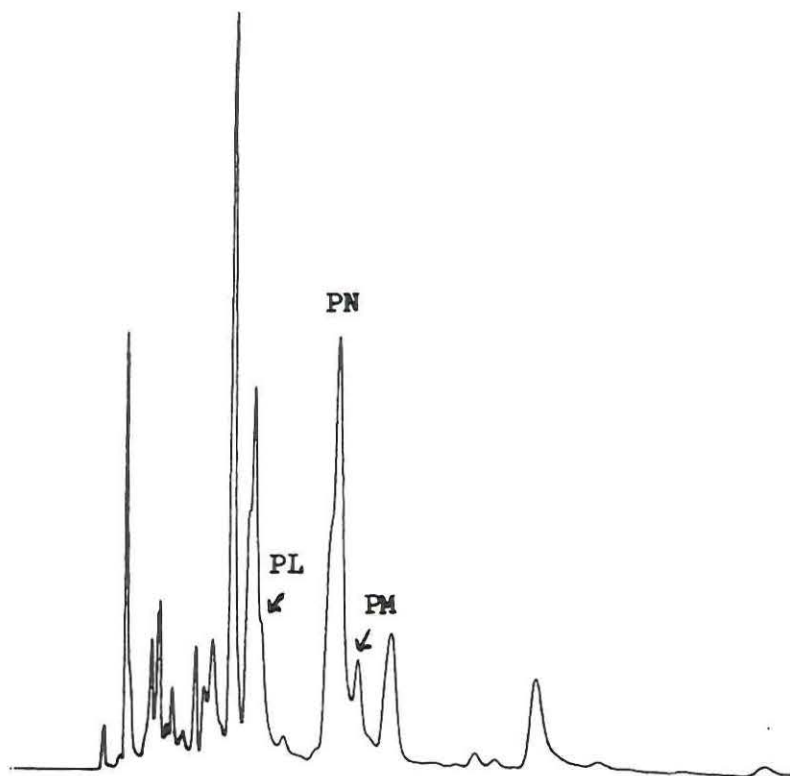
Bijlage 4: De invloed van de enzymatische hydrolise op het aantal interferenties.



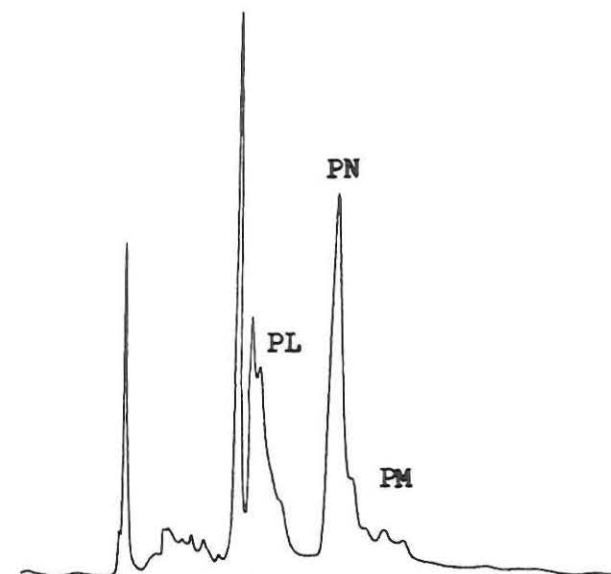
Bijlage 5: Verschil in selectiviteit tussen acetonitril en isopropanol.



Bijlage 6: representatieve voorbeelden van monsterextracten.

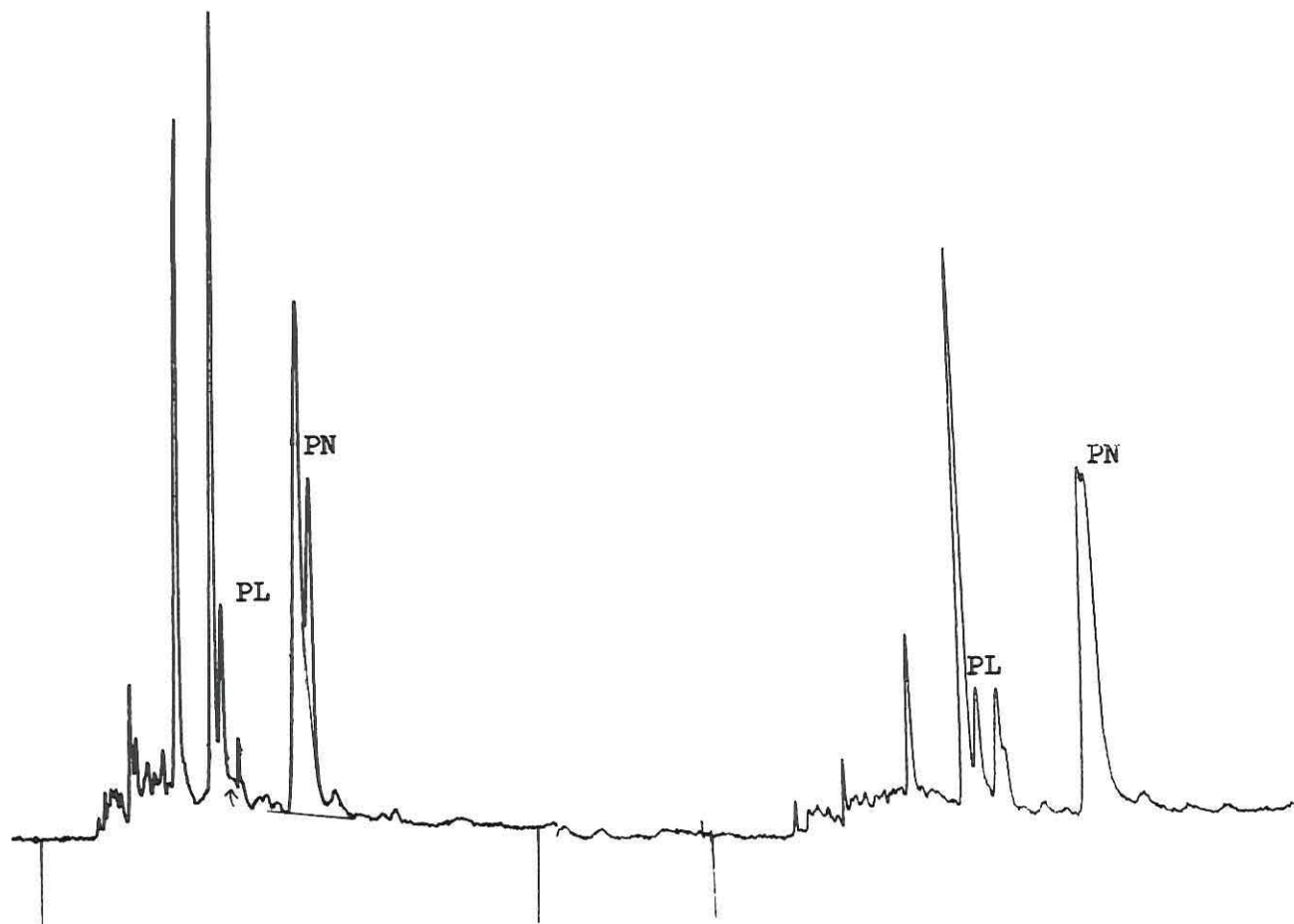


Bijlage 7A: extract niet voorgezuiverd.



Bijlage 7B: clean up m.b.v.
ionenwisselingchromatografie

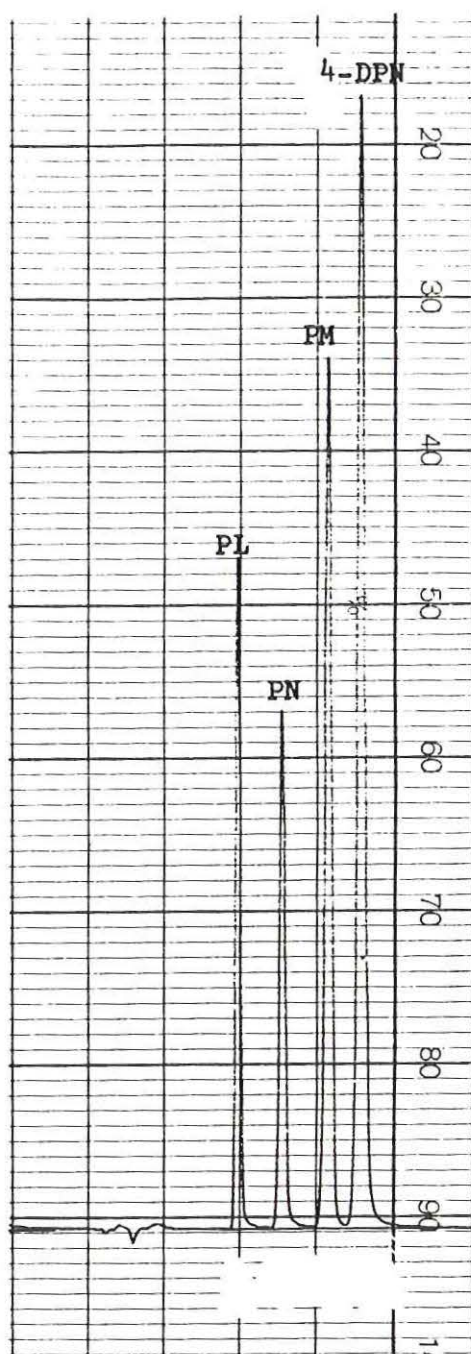
Bijlage 7: het effect van ionenwisselingschromatografie als clean up getest op een aardappelextract.
condities zie bijlage 3.



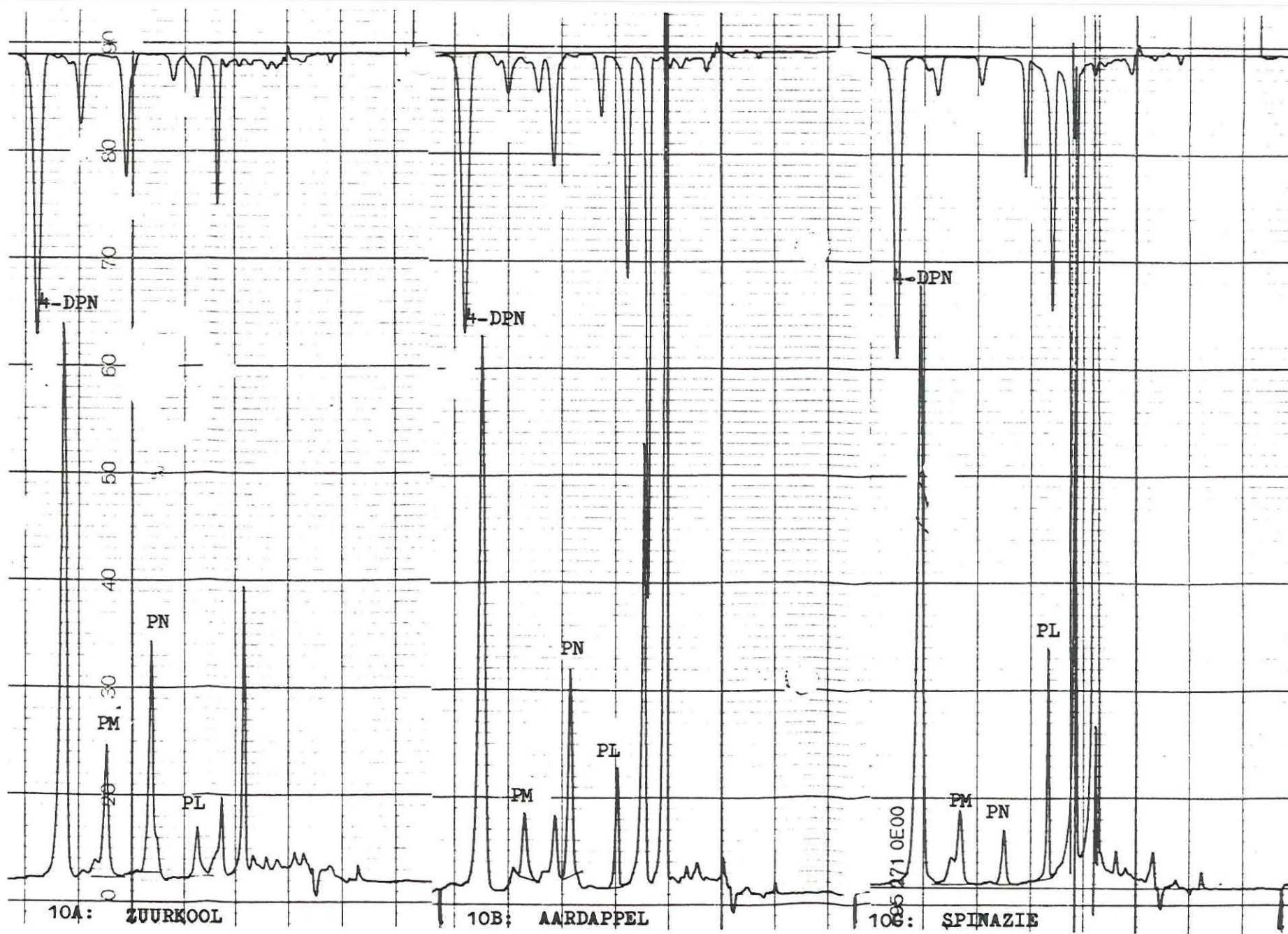
Bijlage 8a: niet voorgezuiverd
extract van een samengestelde
maaltijd (flow 1.5 ml/min)

Bijlage 8B: extract van een samengestelde
maaltijd gezuiverd m.b.v. een cyano-kolom.
(flow 1.0 ml/min)

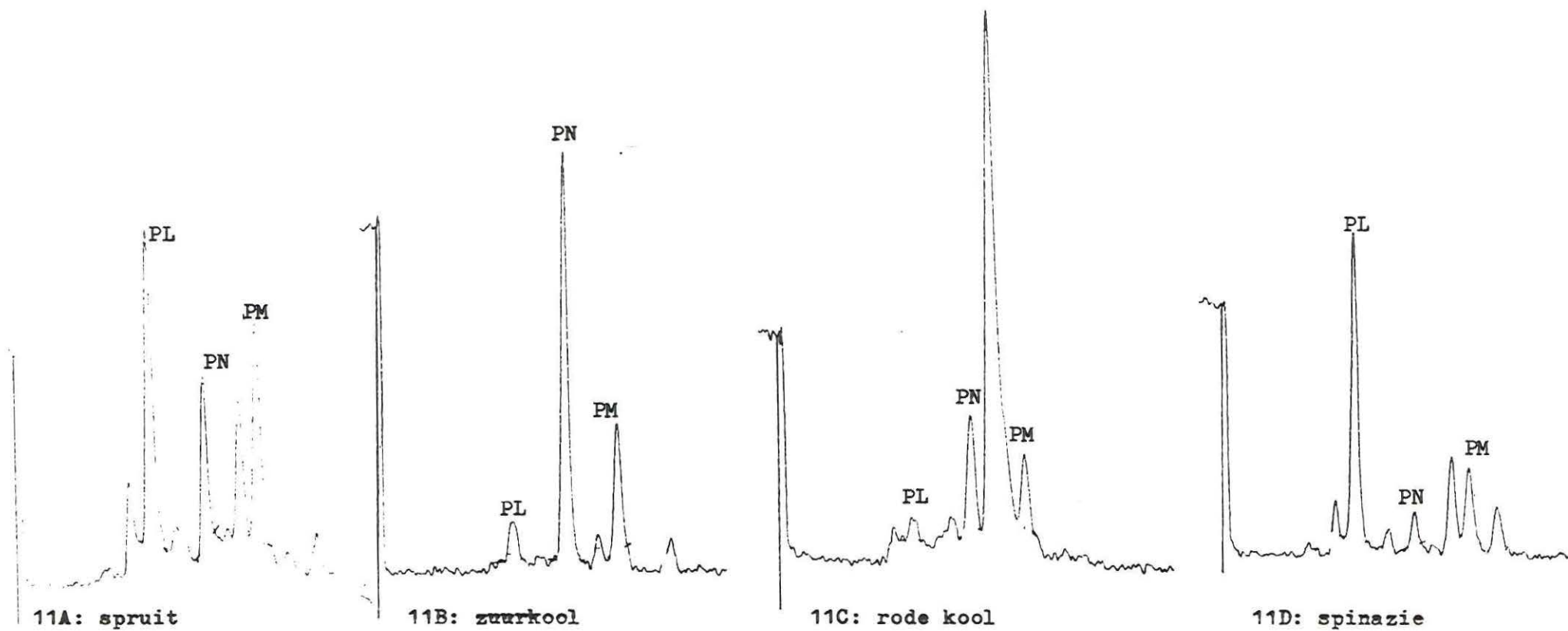
Bijlage 8: Het effect van een cyano-kolom als clean up.
condities zie bijlage 3.



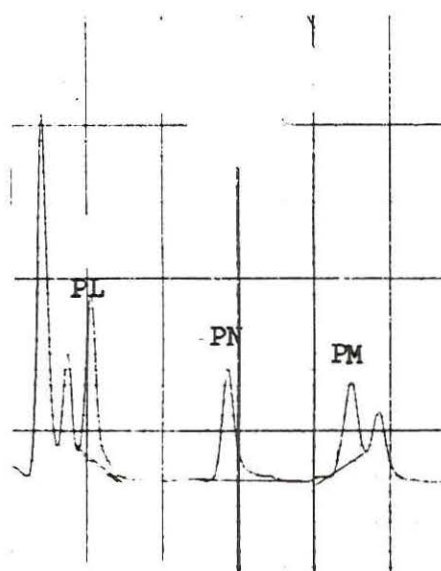
Bijlage 9: chromatogram met daarin afgebeeld: de drie B₆ vitameren en 4-deoxypyridoxine (4-DPN).
condities zie hoofdstuk 3.3.1



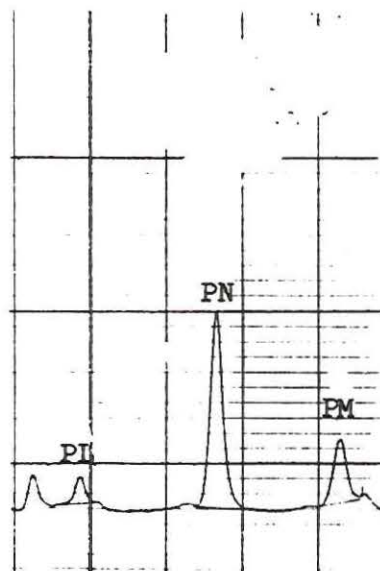
Bijlage 10: chromatogrammen van een aantal voedingsmiddelen (60 min. autoclaaf)
condities zie hoofdstuk 3.3.1



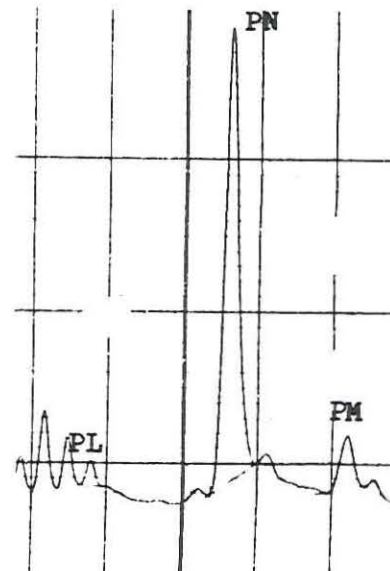
Bijlage 11: chromatogrammen van een aantal voedingsmiddelen (kolomschakeling, een dimensionaal)
condities zie hoofdstuk 3.3.2



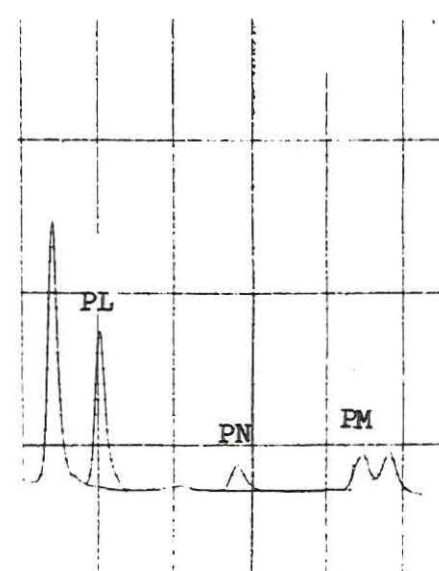
12 A: spruit



12 B: zuurkool

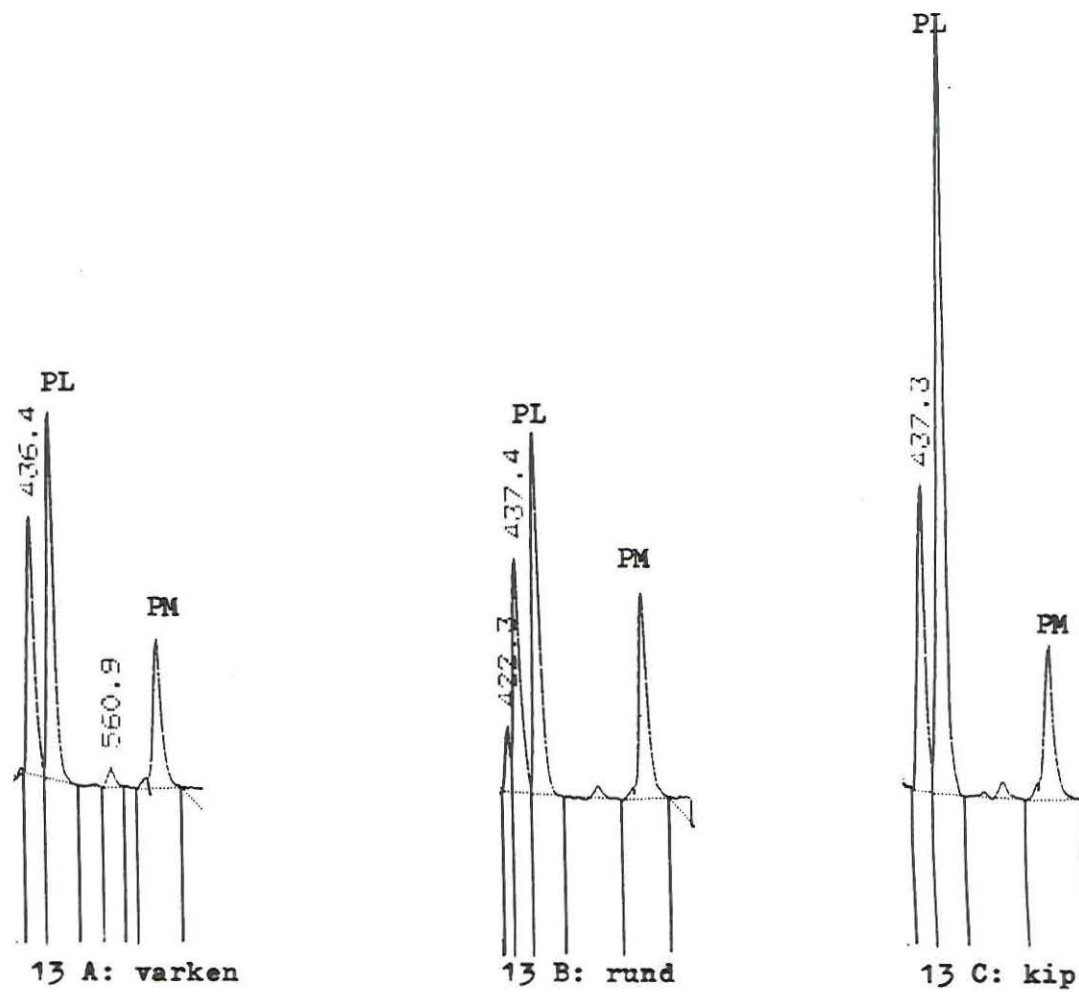


12 C: rode kool



12 D: spinazie

Bijlage 12: chromatogrammen van een aantal voedingsmiddelen (twee dimensionale chromatografie)
condities zie hoofdstuk 3.3.2



Bijlage 13: chromatogrammen van een aantal soorten vlees
condities zie hoofdstuk 3.4