

Lab. Akkerbouw

november 1980

VERSLAG 80.74

Pr.Nr.: 7.241

Project: Ontwikkeling methoden voor het
aantonen en bepalen van vitaminen

Onderwerp: Methode voor de bepaling van het
gehalte aan vitamine A in mar-
garineprodukten met behulp van
HPLC

Lab. Akkerbouw
VERSLAG 80.74

Datum : november 1980
Pr.nr.: 7.241

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van vitaminen

Onderwerp: Methode voor de bepaling van het gehalte aan vitamine A in
margarineprodukten met behulp van HPLC

Doel:

Ontwikkeling van een snelle en nauwkeurige methode voor het bepalen van vitamine-A in margarine, halvarine e.d. m.b.v. vloeistofchromatografie (HPLC).

Samenvatting:

Vitamine A wordt in dit onderzoek bepaald na verzeppen, aanzuren en oplossen in acetonitril. De vrije vetzuren slaan neer in acetonitril terwijl vitamine A in oplossing blijft. Door een "clean-up" toe te passen, is een voldoende zuivere oplossing van vitamine A te verkrijgen, welke geschikt is voor analyse met HPLC. Het is mogelijk om op deze wijze vitamine A kwantitatief en goed reproduceerbaar te bepalen.

Conclusie:

De ontwikkelde methode is een snelle en betrouwbare methode. Vergelijkend onderzoek met de Carr-Price methode leverde nagenoeg geen verschil (< 1 IE).

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse 
Samenstellers : H.J. v.d. Kamp, M.L. Essers 

1 Inleiding:

Door het RIKILT wordt vit. A bepaald met de Carr-Price (2) methode. Deze methode berust op het feit dat vit. A met antimoontrichloride in chloroform een blauwkleuring geeft welke spectrofotometrisch gemeten kan worden. Daar deze methode veel tijd vergt, is gezocht naar een bepaling die sneller uitgevoerd kan worden, met een even grote of grotere nauwkeurigheid en minder gevoelig voor storingen.

Uit de literatuur blijkt dat vitamine A met verschillende analysemethoden bepaald kan worden zoals spectrofotometrie (3,5), colorometrie (2,3), fluorometrie (3) en chromatografisch via gaschromatografie (3) of hoge druk vloeistof chromatografie (1, 3, 4, 6, 7).

Als uitgangspunt voor de bepaling is een publicatie (1) genomen waarin een eenvoudige HPLC methode wordt beschreven. Voor onze toepassing is het noodzakelijk een extra reiniging toe te passen, omdat anders storende componenten gevonden worden en vervuiling van de kolom optreedt.

2 Materiaal:

Margarine, halvarine en margarine bakkersbolk, die voor onderzoek naar het RIKILT worden gezonden door de AID.

3 Basismethode:

3,0 gram margarine of halvarine wordt op refluxtemperatuur verzeepd in 45 minuten met kaliumhydroxide in alcoholisch milieu onder af en toe zwenken. Er wordt vóór het verzeppen 50 mg hydrochinon toegevoegd om oxidatie tegen te gaan van de vitamine A. Na afkoeling wordt de overmaat kaliumhydroxide geneutraliseerd door toevoeging van azijnzuur in acetonitril. Met acetonitril wordt kwantitatief overgespoeld in een maatkolf van 100 ml en aangevuld. De zeep slaan daarbij neer. Na filtratie over een 0,45 µm filter zou het filtraat geschikt zijn voor injectie. Omdat echter bij de analyse van dit filtraat storende bijpieken optreden, is verder onderzoek gedaan naar een mogelijkheid om het monster te reinigen (zie experimenten).

Om het gehalte aan vitamine A in de monsters te bepalen wordt een ijklijn gemaakt met vitamine A acetaat, dat exact dezelfde bewerkingen ondergaat als het monster. In de grafiek is het piek oppervlak uitgezet tegen het vitamine A gehalte in internationale eenheden per ml van de standaardoplossing (zie bijlage 1).

4 Berekening:

Middels de vit. A waarde afgelezen uit de ijkgrafiek wordt het vit. A gehalte van het monster berekend door de gevonden waarde te vermenigvuldigen met de verdunningsfaktor gedeeld door de inweeg van het monster in grammen. Het resultaat wordt uitgedrukt in IE vit A per gram.

5 Experimenten en resultaten:

Om het monster voldoende te reinigen voor de analyse zijn de volgende experimenten uitgevoerd:

5.1 Getest zijn de voorscheidingskolommen sep-pack silica en sep-pack RP18. Deze gaven geen bevredigende resultaten, daar de verontreiniging door deze kolommen niet volledig worden geadsorbeerd.

5.2 5 glaskolommen (10 mm) zijn gevuld met resp. 1, 2, 3, 4 en 5 gram geactiveerd aluminiumoxide. Op deze kolommen is 5 ml monster gepipeteerd en het eluaat wordt opgevangen in een maatkolf van 10 ml. Er is vastgesteld dat minstens 2 maal met 2,5 ml acetonitril nagespoeld moet worden om alle vit. A kwantitatief van de kolom te krijgen. Om alle verontreiniging kwijt te raken blijkt minimaal 2 g aluminiumoxide nodig te zijn. Daarom is besloten bij de volgende proeven 2,5 g te nemen. Voor resultaten zie kolom 1 en 2 van tabel 1 en 2.

5.3 10 ml monster wordt 10 min. geschud met 5 g aluminiumoxide en daarna gefiltreerd over een vouwfilter. Het filtraat is geschikt voor analyse met HPLC, maar er zijn nog kleine storende componenten. Voor resultaten zie kolom 3 en 4 van tabel 1 en 2.

5.4 De invloed van het neerslag van de zepen die ontstaan in de kolf is bekeken door het monster ongefiltreerd en gefiltreerd te reinigen volgens de experimenten 5.2 en 5.3. Resultaten: zie tabel 1 en 2.

5.5 In tabel 2 zijn de resultaten weergegeven van een monster dat op verschillende dagen is geanalyseerd volgens de hierboven beschreven experimenten. Aan dit monster is extra vitamine A toegevoegd in de vorm van vitamine A acetaat. De resultaten hiervan zijn in tabel 2 opgenomen na aftrek van de toevoeging.

Tabel 1

monsternr.	experiment 5.2		experiment 5.3	
	ongefiltreerd	gefiltreerd	ongefiltreerd	gefiltreerd
	kolom 1	kolom 2	kolom 3	kolom 4
1	31,3	31,0	25,2	28,0
2	23,0	23,3	22,7	23,7
3	25,0	25,3	22,0	22,0
4	21,3	21,3	20,3	21,2
5	25,0	24,7	23,7	26,2
6	26,0	25,0	22,3	
7	21,3	20,0	16,7	
8	21,5	21,0	19,7	

Tabel 2

monsternr.	experiment 5.2				experiment 5.3			
	ongefiltreerd		gefiltreerd		ongefiltreerd		gefiltreerd	
	kolom 1		kolom 2		kolom 3		kolom 4	
	zonder toev.	met toev.	zonder toev.	met toev.	zonder toev.	met toev.	zonder toev.	met toev.
9	32,0		32,5		25,2		30,4	
9	32,3		33,5		30,2		31,0	
9	33,5	33,5	34,3	35,0	29,7	27,0	30,7	30,0
9	33,8	34,6	34,1	33,8	27,7	27,1	28,2	30,0
9	32,3	34,6	31,0	34,2	28,8	28,2	31,1	30,3
9	32,4	34,4	32,4	33,8	28,5	28,0	31,5	29,9
9	32,0		32,8		28,7		31,5	
9	32,3		33,0		28,4		31,7	

6 Bespreking van de resultaten:

- 6.1 Opvallend is dat het gehalte aan vit. A verkregen bij experiment 2 (kolom 1 en 2 van tabel 1 en 2) aanzienlijk hoger is dan het gehalte verkregen bij experiment 5.3 (kolom 3 en 4, tabel 1 en 2). Het vermoeden bestaat dat (bij 5.3) adsorptie optreedt van de vit. A aan de aluminiumoxide. Omdat er bij de reiniging volgens 5.2 nagespoeld wordt met acetonitril, treedt bij deze bepaling geen verlies op zodat 5.2. de voorkeur verdient.
- 6.2 Bij experiment 5.3 komt nog een kleine verontreiniging mee die stoort bij de HPLC analyse terwijl dit bij experiment 2 niet het geval is (zie bijlage 2). 5.2 verdient dus ook hier de voorkeur.
- 6.3 Het verschil in uitkomsten bij experiment 5.2 zijn zeer klein (verschil kolom 1 en 2 is gemiddeld kleiner dan 0,4 IE/g). Bij experiment 3 is het verschil (kolom 3 en 4) gemiddeld 2,5 IE/g wat aanzienlijk meer is.
- 6.4 De reproduceerbaarheid is goed (tabel 2) voor alle 4 methoden die gevolgd zijn. De recovery van de toevoegingen van vit. A aan het monster ligt tussen 95 en 104%.
Gezien de voordelen van experiment 2 t.o.v. experiment 3 is besloten 5.2 verder uit te werken en deze te vergelijken met de bestaande Carr-Price methode.

7 Vergelijking met de Carr-Price methode:

In tabel 3 zijn de resultaten weergegeven van deze vergelijking. Uit tabel 3 blijkt dat beide monsters nagenoeg geen verschil vertonen in uitkomst (< 1 IE/g) voor de 15 onderzochte monsters. De uitkomsten van experiment 2 liggen gemiddeld 0,17 IE/g hoger dan de uitkomsten van Carr-Price met een standaard deviatie van 0,55.

Tabel 3

		Carr-Price	HPLC	Vershil
Margarine	1	20,1	20,7	+0,6
	2	22,4	23,4	+1,0
	3	19,7	20,6	+0,9
	4	19,6	19,8	+0,2
	5	33,4	32,7	-0,7
	6	20,5	21,0	+0,5
	7	20,9	21,1	+0,2
	8	32,1	32,5	+0,4
	9	32,6	32,8	+0,2
Halvarine	1	19,7	19,8	+0,1
	2	21,7	22,0	+0,3
	3	22,4	21,6	-0,8
	4	28,3	27,5	-0,8
Bakkersbulk	1	20,8	21,0	+0,2
	2	21,2	21,4	+0,2

De overeenkomst van de HPLC methode met Carr-Price is van dien aard dat dit dit heeft geleid tot de in bijlage 3 opgenomen methode voor de bepaling van vit. A in produkten op basis van olie en water in geëmulgeerde vorm met een gehalte variërend van 5-100 IE vitamine A per gram materiaal.

8 Opmerkingen:

1 De monsters moeten zoveel mogelijk in het donker bewaard worden. Er kunnen na enkele uren daglicht verliezen ontstaan aan vit. A van meer dan 10%. Na 1 dag kan dit oplopen tot 50%.

Monsters geanalyseerd na 2 dagen in het donker gestaan te hebben, vertoonden nagenoeg geen verliezen. Er is bij 4 monsters tussen de 97 en 99% aan vit. A teruggevonden.

2 Hydrochinon en β -caroteen storen niet bij de analyse.

9 Literatuur:

- 1 Determination of all- trans and 13- cis Vitamin A in food products by HPLC by D.C. Egberg, J.C. Heroff and R.H. Potter
J. Agric. Food Chem 25, 1127 1977
- 2 Colour reactions attributed to vitamin A by F.H. Carr and E.A. Price,
Biochem. J. 20, 497, (1926)
- 3 Determination of Vitamin A in food - A Review by D.B. Parrisch
CRC Critical reviews in food science and nutrition 9, 375 (1977)
- 4 Quantitative Analyses of the fat-soluble vitamins by high-speed liquid chromatography by R.C. Williams, J.A. Schmidt, R.A. Henry -
J. of Chrom. Science 10 , 494, (1972)
- 5 Zur Bestimmung von Vitamin A in Lebertran und Vitamin-Konzentraten mittels eines verbesserten spektrofotometrischen Verfahrens durch H. Thies und M. Steiniger in Deutsche Apotheker-Zeitung nr. 40
6-10-1966, blz. 1451.
- 6 Vitamins and other nutrients by W.O. Lande en R.R. Eitenmiller in J.A.O.A.C. 62, no. 816, (1979)
- 7 Fast determination of vitamin A palmitate in margarines by HPLC by K. Aitzetmüller, J. Pilz und R. Tasche in Fetten - Seifen - Anstrichmittel 1, 40, (1979)

10 Conclusie:

De ontwikkelde methode voor het bepalen van vitamine A is betrouwbaar en goed reproduceerbaar. De kans op storingen bij de bepaling is zeer klein, terwijl de bepaling veel sneller uitvoerbaar is dan de Carr-Price methode. Vergelijkend onderzoek met de Carr-Price methode leverde nage-
noeg geen verschil op (< 1 IE/g).

11 Aanbevelingen voor eventueel verder onderzoek:

- 1 Nagegaan moet worden wat de optimale hoeveelheid hydrochinon is die toegevoegd moet worden om oxydatie van de vitamine A te voorkomen.
- 2 Nagegaan kan worden in hoeverre de tijd die nodig is om het monster te verzepen kan worden verkort.

cc. directeur

adj. directeur

sektorhoofden (3x)

directie VKA

afd. Akkerbouw (5x)

leesportefeuille (5x)

Humme

Boelsma

Hollman

Bijlage 3 (bij verslag vit. A bepaling m.b.v. HPLC november 1980)
Analyse methode ontwerp.

1 Onderwerp:

Methode voor de bepaling van het vitamine A gehalte in margarine en halvarine m.b.v. hogedruk vloeistofchromatografie.

2 Toepassingsgebied:

Deze methode is van toepassing op produkten op basis van olie en water in geëmulgeerde vorm met een gehalte aan vitamine A variërend van 5-100 IE/g.

3 Beginsel:

Het gehalte aan vitamine A wordt bepaald na verzeping van een hoeveelheid vet en oplossen in aangezuurde acetonitril waarbij de vrije vetzuren neerslaan. Vitamine A wordt gezuiverd met aluminiumoxide en daarna geanalyseerd met behulp van hogedruk vloeistofchromatografie.

4 Reagentia:

Alle reagentia en oplosmiddelen zijn van analysekwaliteit tenzij anders vermeld.

4.1.1 Acetonitril (Baker).

4.1.2 Acetonitril aangezuurd met azijnzuur (100 g ijsazijn (4.2) per liter).

4.2 Ijsazijn (Analar of Merck).

4.3 Aceton (Merck).

4.4 Ethanol 96% (v/v).

4.5 Kaliumhydroxide oplossing in water (10 N).

4.6 Hydrochinon.

4.7 Aluminiumoxide (Merck). Aluminiumoxide gloeien bij 600°C gedurende 6 uur. Na afkoelen het watergehalte op 10% brengen en homogeniseren gedurende 2 uur.

4.8 Vitamine A acetaat (Merck). Na verzepen 1.000.000 vit.A IE/g.

4.9 Acetonitril Merck (Uvasol) HPLC.

4.10 Water milliporekwaliteit HPLC.

5 Toestellen en hulpmiddelen:

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

5.1 Hogedruk vloeistofchromatograaf (Varian LC 5000.)

5.1.1 Sample loop van 250 μ l.

5.1.2 Micropak Kolom: MCH-10, lengte 30 cm ID 4 mm.

5.2 Detektor 328 nm "Varichrom".

5.3 Thermostaat regelbaar op 0,01°C (colora).

5.4 Dataverwerkingssysteem SP 4000.

5.5 Recorder Kipp-8041.

6 Werkwijze:

NB De gehele bepaling moet verricht worden met uitsluiting van direct zonlicht. Bij bewaring moeten de monsters in het donker geplaatst worden.

6.1 Monsterbereiding:

Weeg in een platbodemkolf van 100 ml met wijde hals 3 g margarine of halvarine af tot op 10 mg nauwkeurig. Voeg daar aan toe: 30 ml ethanol, 50 mg hydrochinon en 1,5 ml kaliumhydroxide oplossing (10 N). Plaats de kolf met terugvloeikoeler op een waterbad van 80°C en verzeep het monster gedurende ca. 45 minuten onder af en toe zwenken. Laat afkoelen en voeg 15 ml aangezuurde acetonitril toe (4.1.2). Breng de oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml met acetonitril (4.1.1) en vul aan. Hierbij slaan de zepen neer.

Homogeniseer het monster en pipeteer direkt 5 ml op een kolom die 2,5 g aluminiumoxide bevat. Vang het eluaat op in een maatkolf van 10 ml en elueer nog tweemaal met 2,5 ml acetonitril. Vul aan tot de maatstreep met acetonitril.

Analyseer het monster onder omstandigheden genoemd in 6.3 en bepaal met behulp van de ijklijn (6.2) de vit. A concentratie.

6.2 Ijklijn:

Weeg af 100,0 mg vitamine A acetaat in een maatkolf van 100 ml en los dit op in ca 10 ml aceton en vul aan met ethanol (4.4). Pipeteer 10 ml van de oplossing in een maatkolf van 100 ml en vul aan met ethanol. Pipeteer vervolgens 5 ml in een platbodemkolf van 100 ml en voeg 25 ml ethanol toe. Handel verder volgens voorschrift monsterbereiding (6.1) beginnende bij het toevoegen van 50 mg hydrochinon en met dien verstande dat het eluaat van de kolom opgevangen dient te worden in een kolf van 25 ml.

Pipeteer uit het kolfje van 25 ml met 1 IE vit. A/ml, respectievelijk: 1, 2, 3, 4, 5 en 7 ml in maatkolf van 10 ml en vul aan met acetonitril (4.1.1), dit komt overeen met respectievelijk 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7 en 1 IE/ml. Analyseer deze standaardreeks met HPLC onder de omstandigheden genoemd in 6.3. Zet het gevonden piekoppervlak in een grafiek uit tegen de corresponderende vit. A concentratie en trek een rechte lijn door de meetpunten.

6.3 Analyseomstandigheden.

6.3.1 Injectie.

Vul de 250 µl in de sampleloop van de injectie met de te analyseren oplossing.

6.3.2 Kolom: Micropack MCH 10.

Eluent: acetonitril (4.9); water (4.10)/80:20.v/v

Flow: 2 ml/min (Druk $\pm$ 65 atm.).

Kolomtemperatuur 30°C.

6.3.3 Detektor: UV.

Golflengte 328 nm.

Absorbance Range 0,01.

6.3.4 Thermostaat 30°C.

7 Berekening:

Bereken het gehalte aan vit. A in IE/g als volgt:

$$A = \frac{200 \cdot C}{M}$$

waarin:

A is het aantal IE vitamine A per gram monster

C is IE vitamine A concentratie afgelezen op de ijklijn

M is de afgewogen hoeveelheid monster in grammen

Rond de uitkomst af op hele getallen.

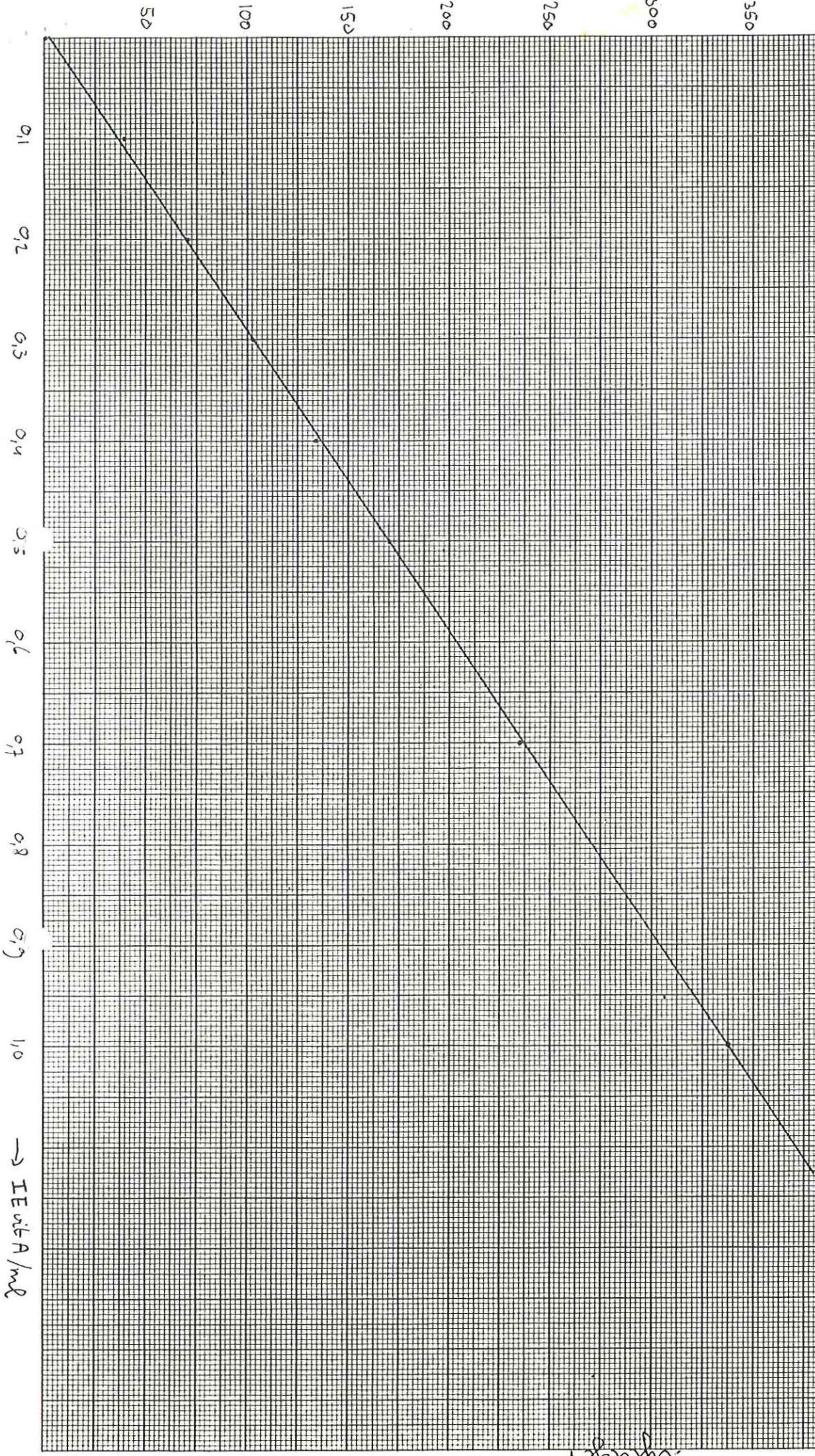
8 Herhaalbaarheid:

Het verschil tussen de uitkomsten van een bepaling in duplo, gelijktijdig of kort na elkaar door dezelfde persoon uitgevoerd, mag niet meer bedragen dan 1 IE/g.

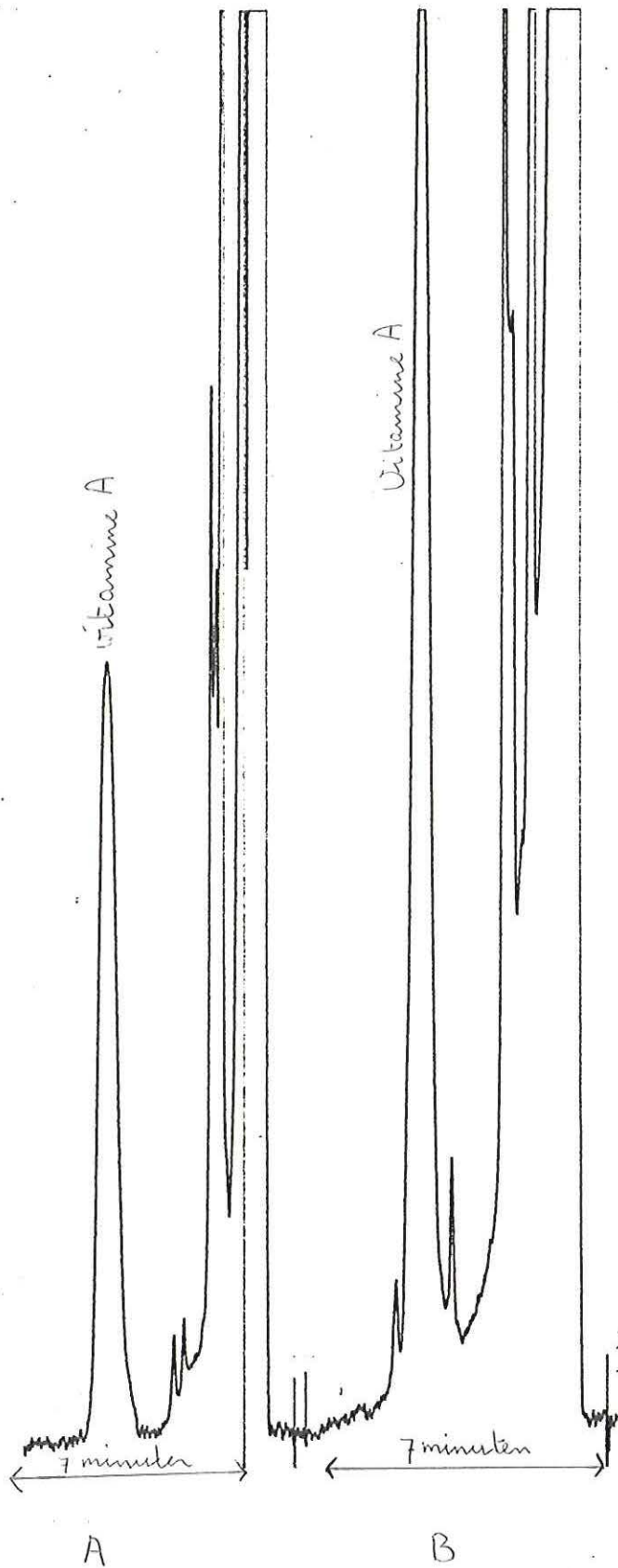
↑ $\text{absorbance}/0.01$

MD-17 Lamine A

by age 1



→ IEvitA/ml



A: vitamine A bepaalt volgens experiment 2

B

Vitamine A bepaling middels HPLC

Vergelijkingsoverzicht van de resultaten verkregen volgens de Carr-Price methode en de HPLC methode beschreven in verslag 80.74.

Statistische evaluatie van de resultaten gaf geen systematisch verschil te zien tussen beide methoden van onderzoek.

Volgens de toets van Bartlett hoeven de standaardafwijkingen van de verschillen (1,27, 1,61 en 0,87) niet tot eenzelfde statistische verdeling te behoren.

		margarine	halvarine	BB/WFP	Totaal
Aantal monsters	n	37	18	22	77
gemiddeld verschil (HPLC-CP)	$\bar{\Delta}$	- 0,046	- 0,18	- 0,10	- 0,094
standaard deviatie v.h. verschil	$s(\Delta)$	1,27	1,61	0,87	1,25
standaard Error of the mean	$s(\bar{\Delta})$	0,21	0,38	0,19	0,14
$t = \bar{\Delta} / s(\bar{\Delta})$		- 0,22	- 0,48	- 0,54	- 0,66

Verschil HPLC-CP

<u>Margarine</u>	CP	HPLC	
1	26,5	27,5	+1,0
2	23,1	23,3	+0,2
3	34	33,7	-0,3
4	24,5	24,8	+0,3
5	60	62,2	+2,2
6	20,8	20,4	-0,4
7	19,7	19,6	-0,1
8	22,2	19,8	-2,4
9	21,3	20,6	-0,7
10	25,7	24,2	-1,5 *
11	21,5	21,1	-0,4
12	20,0	19,5	-0,5
13	29,4	29,2	-0,2
14	21,8	22,1	+0,3
15	21,1	21,1	0,0
16	11,0	11,0	0,0
17	18,7	18,7	0,0
18	17,3	18,8	+1,5 *
19	21,2	20,1	-1,1
20	18,4	22,2	+3,8 *
21	17,3	17,3	0,0
22	17,9	17,7	-0,2
23	18,7	18,9	+0,2
24	17,0	18,8	+1,8 *
25	19,1	18,9	-0,2
26	18,8	18,5	-0,3
27	20,1	19,4	-0,7
28	22,4	21,9	-0,5
29	27,4	25,6	-1,8
30	20,3	19,8	-0,5
31	20,1	19,9	-0,2
32	19,5	18,6	-0,9
33	20,1	19,7	-0,4
34	21,1	17,5	-2,6
35	27,1	28,6	+1,5
36	26,1	28,6	+2,5
37	21,8	20,7	-1,1

Verschil HPLC-CP

<u>Halvarine</u>	CP	HPLC	
1	23,1	19,6	-3,5 *
2	27,9	27,0	-0,9
3	20	20,3	+0,3
4	15	14,1	-0,9
5	18,3	18,4	+0,1
6	19,5	21,7	+2,2 *
7	22,6	24,1	+1,5 *
8	20,1	19,4	-0,7
9	18,1	19,3	+1,2
10	18,4	18,8	+0,4
11	21,4	24,1	+2,7 *
12	25,3	24,9	-0,4
13	22,4	19,0	-3,4
14	19,9	20,1	+0,2
15	20,1	19,5	-0,6
16	19,5	19,5	0,0
17	17,5	17,4	-0,1
18	19,6	18,2	-1,4

		Verschil HPLC-CP	
<u>BB+WFP *</u>	CP	HPLC	
1	9,6	9,1	-0,5
2	21,2	20,7	-0,5
3	21,2	20,2	-1,0
4	9,8	10,0	+0,2
5	20,1	21,7	+1,6 *
6	16,8	18,2	+1,4
7	17,0	18,0	+1,0
8	18,7	17,6	-1,1
9	7,6	7,0	-0,6
10	20,9	20,8	-0,1
11	18,2	18,7	+0,5
12	27,2	25,6	-1,6 *
13	21,6	20,4	-1,2
14	21,2	21,7	+0,5
15	20,4	21,0	+0,6
16	20,3	20,6	+0,3
17	20,1	19,9	-0,2
18	19,8	20,3	+0,5
19	24,1	24,2	+0,1
20	23,8	23,1	-0,7
21	23,8	23,7	-0,1
22	20,6	19,3	-1,3