Afdeling AM Datum: 1983-09-26

RAPPORT 83.77 Pr.nr. 505.0100

Onderwerp: Literatuuroverzicht analyse-
methoden voor vitamine B-6 in
voedingsmiddelen

Verzendlijst: direkteur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling AM (4x),
Broex, afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer,
Sprenger-Instituut (drs M. van der Meer).

8377

Afdeling Levensm.additieven/Micronutriënten Datum: 1983-09-26

RAPPORT 83.77 Pr.nr. 505.0100

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het bepalen van nutriënten in levensmiddelen.

Onderwerp: Literatuuroverzicht analysemethoden voor vitamine B-6 in voedingsmiddelen.

Doel:

Inventarisatie van analysemethoden voor vitamine B-6 in levensmiddelen.

Samenvatting:

In dit literatuuronderzoek wordt een overzicht gegeven van recente ontwikkelingen (vanaf ± 1970) in de analytiek van vitamine B-6. Een aantal alternatieven voor de tot op heden meest gebruikte microbiologische methoden is beschreven in de literatuur. Selektieve methoden op basis van vloeistofchromatografie (HPLC) bieden het meeste perspektief.

Conclusie:

Het is zinvol een Reverse-Phase HPLC-methode met fluorescentiedetektie op te starten. Aandacht is nodig voor mogelijke verliezen van vitamine B-6 bij de extraktie t.g.v. hogere temperaturen.

Verantwoordelijk: ir P. Hollman

Samensteller: ir P. Hollman

Projektleider: ir P. Hollman

1. INLEIDING

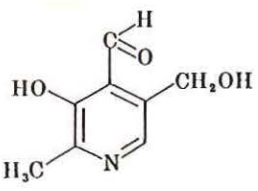
Gegevens over de samenstelling van levensmiddelen in de V.S. werden recent geïnventariseerd door Stewart (36). Hieruit blijkt o.a. dat er voor een groot aantal levensmiddelen leemtes zijn voor wat betreft vitamine B-6. Tevens wordt door Stewart opgemerkt dat de analysemethoden voor vitamine B-6 nader onderzoek en aanpassing behoeven, waarbij met name de extraktie genoemd wordt.

In het onlangs verschenen "Eerste deeladvies inzake de toevoeging van vitamines aan voedingsmiddelen" van de "Commissie Vitaminering van Levensmiddelen" van de Voedingsraad, wordt opgemerkt dat ...." ten aanzien van vitamine B-6 de methode van onderzoek met name naar het gehalte van dit vitamine in voedingsmiddelen ter discussie staat" (33). Er wordt hierin dan ook aanbevolen onderzoek te entameren naar "de methodiek van de bepalingsmethode van vitamine B-6 in voedingsmiddelen".

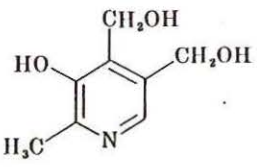
Bovenstaande vormde voor ons de aanleiding voor een literatuuronderzoek naar recente ontwikkelingen in de analysemethoden voor vitamine B-6 in levensmiddelen. Hiertoe werden via het PUDOC referenties opgespoord uit de computerbestanden: Food Science and Technology Abstracts (FSTA) en Chemical Abstracts. De door het PUDOC onderzochte periode liep van 1970 tot maart 1983, terwijl deze periode voor FSTA naderhand aangevuld werd tot en met september 1983. Uit de hieruit verkregen gegevens is dit rapport samengesteld.

1.1 Enige eigenschappen van vitamine B-6

Vitamine B-6 is de verzamelnaam voor de volgende verbindingen: pyridoxine (PN), pyridoxal (PL), pyridoxamine (PM) en de hiervan afgeleide 5'-gefosforyleerde verbindingen, resp. PNP, PLP en PMP. De strukturen zien er als volgt uit:



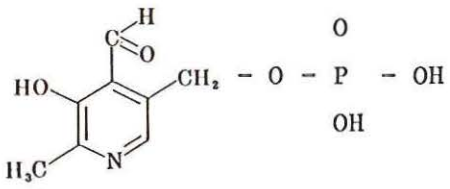
PL



PN



PM



PLP

De drie basisvormen PL, PN en PM zijn alle biologisch aktief en worden in het lichaam omgezet in PLP en PMP. In voedingsmiddelen komen alle vormen, behalve PNP voor. Belangrijke bronnen voor vitamine B-6 zijn aardappel (0,3 mg/100 g), spinazie (0,15 mg/100 g), bruinbrood (0,175 mg/100 g), vlees (0,22 mg/100 g) en lever (0,6 mg/100 g).
Vitamine B-6 is stabiel in zuur milieu ook bij verhitten. In alkalisch milieu is het eveneens stabiel, echter dan niet bij verhitten. Lucht-zuurstof heeft geen invloed op de stabiliteit. Onder invloed van licht wordt vitamine B-6 echter afgebroken. De invloed van licht onder laboratoriumomstandigheden op de stabiliteit werd onderzocht door Ang (18).

2. EXTRAKTIE en CLEAN-UP

De verschillende B-6 vitameren kunnen gebonden zijn aan bepaalde komponenten in het voedingsmiddel. Gregory (13) noemt binding van PLP aan eiwitten en PM aan suikers. Voor een kwantitatieve extraktie zal het daarom noodzakelijk zijn de vitameren vrij te maken uit deze verbindingen. Een groot aantal extraktieprocedures is beschreven (zie tabel 2 t/m 4). Hierin is een tweedeling aan te brengen:

- zure extrakties, meestal met HCl, bij verhoogde temperatuur
- milde extrakties, met b.v. perchloorzuur, metafosforzuur, bufferoplossingen, sulfosalicylzuur.

Bij de eerstgenoemde groep worden behalve de vitamine-matrixbindingen ook de fosfaatvormen van de B-6 vitameren gehydrolyseerd. Bij de milde extrakties daarentegen blijven de fosfaatvormen intakt, terwijl geclaimd wordt dat de gebonden vitamines vrijgemaakt worden. Voor beide extraktieprincipes geldt dat, afhankelijk van de volgende stappen in de analyse het meestal noodzakelijk is het extrakt te zuiveren van storende komponenten, waarbij gebruik wordt gemaakt van een ionwisselingskolom.

2.1 Milde extrakties

Deze extraktiemethoden worden toegepast als het van belang is de gefosforyleerde B-6 vormen te bepalen. Gregory (16,21,23) beschrijft verschillende zure of neutrale buffers voor de extraktie van dierlijk weefsel, "fortified breakfast cereals" en vleesprodukten. Opvalt dat de recovery's sterk produktafhankelijk, maar wel konstant zijn, zodat hiervoor bij de berekening van het gehalte gecorrigeerd kan worden. Vanderslice (25) gebruikt sulfosalicylzuur (SSA) en rapporteert uitstekende (> 93%) en konstante recovery's in diverse produkten, nl. vlees, vis, melkpoeder en "fortified cereals".
De overige toepassingen hebben betrekking op analyses in lichaamsvloeistoffen en zullen hier verder niet besproken worden.

2.2 Zure extrakties bij verhoogde temperatuur

De AOAC methode 43.188 (1) maakt onderscheid tussen dierlijke en plantaardige produkten, zowel wat betreft zuursterkte (resp. 0,055 N HCl en 0,44 N HCl) als extraktieduur (5 h resp. 3 h) en er wordt geëxtraheerd in een autoclaaf bij 121°C. Deze procedure wordt ongewijzigd toegepast door Gregory (12), of met kleine wijzigingen van de extraktieduur door Söderhjelm (11), het zuur, nl. 0,44 N H_2SO_4 i.p.v. 0,44 N HCl door Fiedlerová (8,15). Wong (14) heeft een afwijkende procedure voor groenten en fruit, waarbij een slurry in alkohol op een kokend waterbad met HCl geëxtraheerd wordt, waarna nog een enzymatische hydrolyse noodzakelijk is. Vergelijkbaar hiermee is de extraktie die Lim (27) gebruikt. Lim onderzocht de autoclaafextraktie (0,1 N HCl 121°C) met alleen standaarden en komt tot lagere recovery's in vergelijking tot de in het onderzoek voorgestelde procedure (PM 86% resp. 97%, PL 87% resp. 99,5%, PN 83% resp. 95%). Navankasattusas (31) onderzocht de afbraak van PN, PL en PM standaarden bij verhitten in een neutrale fosfaatbuffer bij verschillende temperaturen en tijdsduur. De resultaten wijzen in dezelfde richting als hetgeen Lim vond.

2.3 Clean-up

Bij de fluorimetrische methoden (zie hfdst. 3.2) en bij de microbiologische AOAC-methode 43.188 (1) fungeert de clean-up tevens als scheidingstrap voor PL, PM en PN. Het ionwisselingshars hierbij is Dowex AG 50 W - X 8. Fiederová (8,15) beschrijft de elutie van PL, PM en PN en vindt goede (> 90%) recovery's (incl. zure extraktie) voor melkpoeder, soja en tarwebloem en moutextrakt.

Gregory (12) komt tot de conclusie dat Mailard reaktieprodukten, ontstaan bij de zure extraktie m.b.v. een autoclaaf, samen met PL elueren bij de bovengenoemde procedure en een te hoge waarde geven voor PL. Een wijziging van de kolomelutie werd daarom uitgewerkt. Het blijkt nodig al na drie tot vier scheidingen de kolom te regenereren. De recovery (incl. zure extraktie) is variabel, waarbij de recovery en de nauwkeurigheid afhangt van het voedingsmiddel (PL: 78-84%, PN: 80-120%, PM: 105-115%).
Clean-up blijkt eveneens noodzakelijk bij HPLC-methoden in kombinatie met UV-detektie (zie hfdst. 3.3.2). Ook hier wordt Dowex AG 50 W - X 8 gebruikt. Wong (14) geeft konsekwent lage recovery's (incl. zure extraktie) voor PL (60%) en PM (80%), terwijl PN voor 100% teruggevonden wordt. Als oorzaak wordt genoemd de onvolledige elutie van de clean-up kolom. Lim (27) bevestigt dit m.b.v. standaardoplossingen (zonder monstermatrix) en vindt de volgende recovery's: PL 77%, PM 75% en PN 91%. De overall recovery's, incl. zure extraktie, zijn voor melk, brood en erwten zeer variabel en vaak erg laag: PM 68-71%, PL 5-60%, PN 7-97%. Vanderslice (25) gebruikt SSA voor de extraktie, dat echter uit het extrakt verwijderd moet worden. SSA beinvloedt nl. de scheiding op de analytische ion exchange kolom, terwijl SSA bovendien zeer sterk fluoresceert, zodat bij de fluorescentie detektie die hij toepast, een te hoog achtergrondsignaal ontstaat. Dowex AG 2 - X 8 wordt hier toegepast als ionwisselingshars, waaraan SSA sterk gebonden wordt. Na 20-25 monsters blijkt de kolom verzadigd, zodat regenereren noodzakelijk is, hetgeen $\pm$ 3,5 h duurt. Er worden met deze methode uitstekende (overall) recovery's behaald (> 93%).

3. OVERZICHT ANALYSEMETHODEN

3.1 Microbiologische methoden

Tot op heden worden voor de bepaling van vitamine B-6 microbiologische methoden het meest gebruikt, zie b.v. AOAC-methode 43.188 (1). Als belangrijkste nadelen van de microbiologische methoden noemt Gregory (39) echter:
- arbeidsintensief, waardoor een beperkte monsterkapaciteit
- moeilijk of niet te automatiseren

- storingsgevoelig, remming of stimulering groei micro-organisme door andere komponenten
- grote spreiding in analyseresultaten.

Voor vitamine B-6 geldt bovendien dat systematische fouten gemaakt kunnen worden als totaal vitamine B-6 rechtstreeks bepaald wordt. Deze fouten worden veroorzaakt door een verschillende groeirespons van het micro-organisme op de verschillende B-6 vitameren (39) (zie tabel 1). Aangezien het relatieve aandeel van de verschillende B-6 vitameren per voedingsmiddel verschilt, is deze fout alleen uit te sluiten als de vitameren vooraf door b.v. chromatografie gescheiden worden en vervolgens individueel microbiologisch bepaald worden tegen hun eigen ijklijn (3) (AOAC 43.188).
Gezien de hierboven opgesomde nadelen, zijn de microbiologische methoden niet verder in dit literatuuroverzicht betrokken.

Tabel 1. Groeirespons micro-organismes

	Relatieve aktiviteit t.o.v. PN		
Organisme	B-6 komponent	gemiddeld	range
Saccharomyces uvarum:	PL	0,92	0,78-1,01
	PM	0,76	0,53-0,99
Kloeckera brevis:	PL	1,03	0,79-1,17
	PM	0,60	0,36-0,83

3.2 Fluorimetrische methoden

3.2.1 Reaktiefluorimetrie

Het principe van deze methoden berust op de reaktie van PL (en PLP) met KCN in zwak alkalisch milieu, tot het lacton van 4-pyridoxinezuur, waardoor de fluorescentie-intensiteit sterk verhoogd wordt.
Polansky (2) toont aan dat PN m.b.v. MnO_2 geoxideerd kan worden tot PL, waarbij de omzetting volledig is in het concentratiegebied 0,005 µg-10 µg/ml.
Fiedlerová (8) beschrijft een toepassing voor de bepaling van PL in melkpoeder. Clean-up van het monsterextrakt is noodzakelijk, waarvoor een ionwisselingskolom gebruikt wordt. Bovendien wordt hierop een scheiding van PL, PN en PM uitgevoerd. PN kan dan op analoge wijze

bepaald worden na oxidatie met MnO_2 tot PL en PM na transamineren met glyoxylzuur tot PL. Deze aanpak werd toegepast op een aantal andere produkten waarbij zowel PL, PN als PM afzonderlijk bepaald werden, alsook totaal vitamine B-6, waardoor een aanzienlijke tijdsbesparing geboekt kon worden (15). De methode is vooral voor hogere gehalten (> 0,08 mg/100 g) geschikt. Gregory (12) automatiseert met een Auto Analyzer Systeem de vorming van het lacton en aansluitend de fluorimetrische bepaling.

3.2.2 Direkte fluorimetrie

Een methode gebaseerd op meting van de eigen fluorescentie van PN in gevitamineerde produkten wordt door Söderhjelm (11) beschreven. Rechtstreeks wordt in een extrakt, na clean-up op een ionwisselingskolom de fluorescentie gemeten. Een blanko fluorescentiewaarde wordt verkregen door een overmaat boraat toe te voegen, waardoor quenching optreedt van de fluorescentie van PN. Quenching van PL en PM door boraat is niet zo sterk. Bij gelijke hoeveelheden PN, PM en PL bedraagt de fout door PL en PM $\pm$ 11% van het gehalte aan PN. De methode is minder gevoelig dan de reaktiefluorimetrische en is geschikt voor bepaling van toegevoegd PN in tarwebloem (0,35 mg/100 g).
Tabel 2 geeft een overzicht van de verschillende fluorimetrische methoden.

3.3 Chromatografische methoden

3.3.1 Gaschromatografie

Aangezien de vitamine B-6 komponenten slechts een geringe dampspanning hebben is voor de gaschromatografische analyse omzetting in vluchtige verbindingen noodzakelijk.
Prosser (4) beschrijft een katalytische derivatisering met azijnzuuranhydride, waarbij PN, PM en PL omgezet worden in acetylderivaten, die op een gepakte kolom (neopentyl glycol succinaat/SE-30) in $\pm$ 18 min gescheiden worden. De vorming van de derivaten is bewerkelijk en langdurig. Detektie geschiedt met een ionisatiedetektor (vlam- of β-ionisatie).

De methode werd alleen toegepast op farmaceutische preparaten. Sennello (35) gebruikt N,O-bis (trimethylsilyl) aceetamide (BSA) voor het derivatiseren van PN in vitaminepreparaten.
Heptafluorobutyrylimidazol blijkt te voldoen voor zowel PL, PM en PN, zodat detektie met electron capture mogelijk is, waardoor de detektiegrens aanzienlijk verlaagd kan worden. Williams (37) onderzocht de mogelijkheden van deze relatief eenvoudige derivatisering en beschrijft een scheiding (1-2 ng PL, PN, PM) op gepakte kolommen (SE-52, tijd voor scheiding ± 15 min), waarbij echter geen toepassingen vermeld worden.
Een eveneens sterk elektronegatief derivatiseringsreagens N-methyl-bis-trifluoroaceetamide (MBTFA) voor PN, PM en PL wordt beschreven door Patzer (38). De uitvoering van de derivatiseringsstap is vergelijkbaar met (37). Scheiding vindt plaats op een gepakte kolom (DC-550, tijd ± 15 min), waarbij echter electron capture detektie niet toegepast kon worden, vanwege overlapping met de reagenspiek. Een eerste toepassing van MBTFA bij de analyse van voedingsmiddelen geeft Lim (27). Voor de extraktie en clean-up van de monsters wordt dezelfde procedure gebruikt als bij de HPLC-methode (zie tabel 4). Op een gepakte kolom (SP 2100) worden de komponenten in ± 8 min. gescheiden, detektie m.b.v. electron capture.

3.3.2 Vloeistofchromatografie (HPLC)

3.3.2.1 Ion exchange HPLC

De mogelijkheden van ion exchange chromatografie voor de analyse van vitamine B-6 en pyridine isomeren werden verkend door (5,6,7,9). De analysetijden lopen zeer uiteen. Gebruikmakend van Zipax SCX, een sterke kationwisselaar gecoat op zgn. pelliculaire deeltjes, is een scheiding van PL, PN en PM in 12 min isocratisch te bereiken, R. Williams (6). Aanzienlijk meer tijd, nl. 95 min, heeft Yasumoto (9) nodig voor de scheiding van PL, PN, PM en DPN (interne standaard desoxypyridoxine) op een Aminex A-5 kolom, waarvoor 3 fosfaatbuffers met verschillende pH's noodzakelijk zijn, terwijl nà iedere analyse de kolom gedurende 30 min geregenereerd moet worden.

Isocratische elutie van PL, PN en PM van een Aminex A-5 kolom blijkt mogelijk in korte tijd (10 min) met een formaatbuffer, A. Williams (10,19). Een eerste toepassing op levensmiddelen (groente, fruit) van een Zipax SCX kolom toont aan dat de analysetijd (30 min) sterk bepaald wordt door het regenereren van de kolom, noodzakelijk tussen opeenvolgende analyses, zie Wong (14). Vanderslice (17) beschrijft een scheiding (± 80 min) van PL, PLP, PN, PNP, PM en PMP op een Aminex A-25 kolom. Door twee kolommen te gebruiken, beide gevuld met Aminex A-25, maar van verschillende lengte en temperatuur, brengt bij de analysetijd terug tot 63 min. (26). De detektie geschiedt m.b.v. fluorescentie, waarbij voor een optimale gevoeligheid tijdens de analyse gewisseld wordt van excitatie-emissiegolflengten. Vanderslice (29) beschrijft de automatisering van dit systeem. Toepassing hiervan wordt gegeven voor een aantal levensmiddelen, waarbij SSA als extraktiemiddel wordt gebruikt (25).
Een overzicht van de diverse ion exchange HPLC-methoden wordt in tabel 3 gegeven.

3.3.2.2 Reverse-phase HPLC

Met behulp van een reverse-phase kolom blijkt het mogelijk in korte tijd (± 10 min) de verschillende vitamine B-6 komponenten isocratisch te scheiden. Als eluens wordt algemeen een fosfaatbuffer, pH 2,2-2,9 gebruikt waaraan door sommige auteurs acetonitril (enige procenten) toegevoegd wordt. De lage pH van het eluens veroorzaakt bijna volledig protonering van de stikstof in de pyridinering van de B-6 vitameren, zodat de retentietijden kort zijn, Gregory (23). Alleen A. Williams (19) maakt gebruikt van een tegenion.
Voor de detektie wordt zowel van UV-absorptie als van fluorescentie gebruik gemaakt. Gregory (23) konstateerde bij de analyse van dierlijk weefsel vele UV-absorberende matrix komponenten, zodat UV-detektie niet mogelijk was. Lim (27) bevestigt dit bij de analyse van erwten, brood en melk, waar een clean-up van het monsterextrakt noodzakelijk blijkt. Bij fluorescentiedetektie wordt gebruik gemaakt van zowel de eigen fluorescentie van de B-6 komponenten, Gregory (16,21), als van de fluorescerende eigenschappen van het semicarbazon van PL en PLP, Gregory (23,28), Schrijver (32). Door de vorming van een semicarbazon

(alleen mogelijk bij PL of PLP) wordt de fluorescentie-intensiteit aanzienlijk verhoogd. Dit is vooral van belang bij de analyse van vitamine B-6 (PLP) in bloed.
In tabel 4 wordt een overzicht gegeven van de verschillende reverse-phase HPLC-methoden.

4. VERGELIJKING METHODEN

Fiederová (15) vergelijkt de vereenvoudigde fluorimetrische methode (zie hfdst. 3.2.1) met een gangbare microbiologische methode (Saccharomyces uvarum) voor melkpoeder, soja, tarwebloem en moutextrakt en vindt 80%-110% van de waarden t.o.v. de microbiologische methode.
Gregory (16) vergelijkt een fluorimetrische (zie hfdst. 3.2.1), een reverse-phase HPLC-methode (zie hfdst. 3.3.2.2) en een microbiologische methode (Saccharomyces uvarum). Hiervoor gebruikt hij een zgn. model voedingssysteem (vergelijkbaar met "breakfast cereals") dat gedurende lange tijd bij verschillende omstandigheden bewaard werd, zodat afbraakprodukten gevormd werden. De HPLCmethode en de microbiologische methode geven overeenkomstige resultaten, die bovendien goed overeenkomen met het biologisch aktieve vitamine B-6, bepaald via rat bioassay. De fluorimetrische methode geeft aanzienlijk hogere resultaten. In een latere studie (21) vergelijkt hij voor commercieel verkrijgbare "breakfast cereals" een reverse-phase HPLC-methode met een microbiologische methode (Saccharomyces uvarum) en konstateert groeiremming bij de microbiologische methode. De HPLC-methode geeft 96-124% van de waarden verkregen met de microbiologische.
Vanderslice (30) vergelijkt de microbiologische AOAC-methode 43.188 (1) met een ion exchange HPLCmethode (zie hfdst. 3.3.2.1). Laatstgenoemde methode geeft 74-160% van de waarden t.o.v. de microbiologische methode.
Lim (27) vergelijkt voor brood, melk en erwten drie methoden nl. reverse-phase HPLC (zie hfdst. 3.3.2.2), gaschromatografie met electron capture detektie (GC-EC) (zie hfdst. 3.3.1) en microbiologisch AOAC 43.188. Voor de HPLC en GC-EC vergelijking worden monsteroplossingen gebruikt die dezelfde extraktie en clean-up ondergaan hebben. Aanzienlijke verschillen worden gevonden, waarbij over het algemeen de microbiologische methode de laagste waarden geeft. Enkele voorbeelden uit dit onderzoek:

	Brood	Melk	Erwten
	PL (mg/100 g)	PN (mg/100 g)	PM (mg/100 g)
HPLC	1,790	0,400	5,700
GC-EC	0,230	5,350	6,850
microbiol.	0,070	0,015	0,015

5. CONCLUSIES

Gregory (16) toont aan dat fluorimetrische methoden voor vitamine B-6 door storingen uit de voedingsmiddelenmatrix onjuiste resultaten geven. Automatisering van een dergelijke methode met een Auto Analyser Systeem valt dan ook niet te overwegen. Een selektieve methode is daarom noodzakelijk.

Chromatografie is hiervoor de aangewezen techniek. Gaschromatografie (GC) heeft als nadeel dat derivatisering noodzakelijk is. Uit de voorliggende literatuur blijkt dat de hiervoor gebruikte procedures bewerkelijk en tijdrovend zijn. Toepassingen van GC zijn hoofdzakelijk beschreven voor vitamine preparaten. Uit het werk van Lim (27) blijkt niet dat GC voordelen heeft boven HPLC, zodat het argument van een snelle eenvoudige analyse in het voordeel van HPLC beslist.

Vloeistofchromatografische methoden zijn beschreven in twee varianten, nl. ion exchange HPLC en reverse-phase HPLC. Vanderslice geeft in een reeks artikelen een volledig analysesysteem, waarbij de scheiding berust op ion exchange HPLC en zowel de gefosforyleerde als niet-gefosforyleerde B-6 vormen in één run bepaald worden. Nadeel is echter dat de analysetijden zeer lang zijn, zodat de monsterkapaciteit beperkt is. Een snellere scheiding is mogelijk op een reverse-phase kolom. Toepassingen zijn beschreven voor zowel de bepaling van de gefosforyleerde als de niet-gefosforyleerde vormen.

Bij de milde extrakties wordt voornamelijk fluorescentiedetektie gebruikt. De zure extrakties bij verhoogde temperatuur worden alleen gekombineerd met UV-detektie. Hierdoor is een clean-up vereist, waarvoor ionwisselingskolommen gebruikt worden.

Voorgesteld wordt een methode te ontwikkelen die gebruik maakt van reverse-phase HPLC, waarbij fluorescentiedetektie toegepast wordt. Hierdoor vervalt waarschijnlijk de noodzaak tot het gebruik van een

clean-up op een ionwisselingskolom. Een aanzienlijke vereenvoudiging van de analyseprocedure is dan te bereiken, terwijl bovendien winst in betrouwbaarheid is te verwachten. Gegevens wijzen nl. op een onvolledige elutie van vitamine B-6 van de ionwisselingskolom. Door een juiste keuze van de fluorescentiedetektor lijkt het mogelijk zonder voorafgaande reaktie (b.v. semicarbazonvorming) vitamine B-6 in voedingsmiddelen te bepalen. Aangezien het niet van belang is in voedingsmiddelen de gefosforyleerde vormen afzonderlijk te bepalen, is een zure extraktie bij verhoogde temperatuur de aangewezen extraktiemethodiek. Aandacht zal hierbij echter gegeven moeten worden aan mogelijke verliezen van vitamine B-6 t.g.v. de verhoogde temperatuur.

Tabel 2. Overzicht fluorimetrische methoden (hfdst. 3.2)

Auteur	Principe	Detektie	Toepassingsgebied	Extraktie
V. Fiedlerová (8,15) (1974/1978)	bepaling PL PM $\xrightarrow{\text{glyoxylzuur}}$ PL PN $\xrightarrow{MnO_2}$ PL	reaktiefluorimetrie spektrofluorimeter exc. 355 nm em. 432 nm detektiegrens: (op produkt) 0,05 mg/100 g	bepaling PL, PN, PM en totaal B-6 in melkpoeder, soja, tarwebloem, moutextrakt recovery: PL, PN, PM 92-103% niveau: PL: 0,06 mg/100 g PM: 0,09 mg/100 g PN: 0,09 mg/100 g	monster + 0,44 N H_2SO_4 autoclaaf (121°C)(1 h) pH → 4,5 filtreren clean-up ionwisselaar Dowex AG 50 W - X 8 elueren: PL-kokende buffer 0,04 M acetaat pH 6 PM-kokende buffer 0,04 M acetaat pH 7 PN-0,1 M fosfaatbuffer pH 8 of totaal B-6 kokende buffer 0,1 M fosfaat pH 8
J.F. Gregory (12) (1977)	zie (8,15)	reaktiefluorimetrie exc. 355 nm em. 436 nm detektiegrens: --	bepaling PN, PL, PM in cornflakes, melkpoeder, ham recovery: PL 78-84% PN 80-100% PM 105-115% niveau: PL 0,1-0,7 mg/100 g PN 0,06-2 mg/100 g PM 0,8-1 mg/100 g	monster (dierlijk) + 0,055 N HCl autoclaaf (121°C) (5 h) monster (plantaard) + 0,44 N HCl autoclaaf (121°C) (2 h) clean-up ionwisselingskolom Dowex AG 50 W - X 8 PL (korte kolom), elueren 0,15 M fosfaatbuffer pH 6,30 PN, PM (lange kolom), elueren 0,5 M fosfaatbuffer pH 8,00
P. Söderhjelm (11) (1975)	bepaling PN	eigen fluorescentie spektrofluorimeter exc. 332 nm em. 397 nm detektiegrens: (op produkt) 0,1 mg/100 g	bepaling PN in gevitamineerde tarwebloem, gevitamineerde melkpoeder recovery: PN 97 ± 6% niveau: PN 0,35 mg/100 g	monster + 0,055 N HCl autoclaaf (121°C)(2 h) filtreren clean-up ionwisselingskolom Dowex AG 50 W - X 8 elueren PN, PL, PM 0,2 M ammoniabuffer pH 9,2

Tabel 3. Overzicht ion exchange HPLC-methoden (hfdst. 3.3.2.1)

Auteur	Scheiding	Detektie	Toepassingsgebied	Extraktie
R. Williams (6) (1973)	PL, PN, PM (12 min) kolom: Zipax SCX 100 cm (2,1 mm ID) eluens: 0,1 M NaH_2PO_4 pH 4,4	UV absorptie 254 nm detektiegrens: --		
K. Yasumoto (9) (1975)	PL, PN, PM, DPN (95 min) kolom: Aminex A-5 15 cm (0,9 cm ID) T = 65°C eluens: drie buffers NaH_2PO_4 pH 4,3/5,15/5,80 + 2% propanol	VIS absorptie 440 nm post column diazo koppelingsreaktie detektie: 2 µg		
F. Wong (14) (1978)	PL, PN, PM (12 min) kolom: Zipax SCX 100 cm (0,023 mm ID) T = 40°C eluens: 0.1 M KH_2PO_4 pH 4.35	UV-absorptie 210 nm detektiegrens: 2 ng	bepaling PL, PN, PM in appel, spinazie recovery: PL 60 ± 2% PN 100 ± 2% PM 85 ± 2% niveau 6-60 mg/100 g	slurry in alkohol + 0,7 N HCl waterbad 97°C (1 h) enzymatische hydrolyse (papaine, diastase) 47°C (2 h) filtreren clean-up: ionwisselingskolom Dowex AG 50 W elueren: 0,05 N KOH

Vervolg tabel 3. Overzicht ion exchange HPLC-methoden (hfdst. 3.3.2.1)

Auteur	Scheiding	Detektie	Toepassingsgebied	Extraktie
J.T. Vanderslice (17) (1979)	PMP, PM, PNP, PN, PLP, PL (80 min) kolom: Aminex A-25 25 cm (6 mm ID) T = 55°C eluens: buffer 0,4 M NaCl 0,01 M glycine pH 10	eigen fluorescentie 2 filterfluorimeters detektor 1 (5°C) lamp G4T4 exc. Dell opt. A-4-3100 em. Corning 0-52 detektor 2 (25°C) voor PLP lamp: Hg fosforcoating exc. Corning 7-51 (365 nm) em. Wratten 2A flowcel 70 µl detektiegrens: PMP, PM, PNP, PN, PL 10 ng PLP 100 ng		
J.T. Vanderslice (25,26,29,30) (1980/1981)	PMP, PM, PNP, PN, PLP, PL (63 min) kolom: 2 kolommen in serie Aminex A-25 kolom 1: 20 cm (6 mm ID) T = 55°C kolom 2: 7 cm (6 mm ID) T = 18°C eluens: buffer 0,4 M NaCl 0,01 M glycine, 0,005 M semi-carbadine pH 10	eigen fluorescentie/ reaktiefluorimetrie (PL, PLP-semicarbazon) spektrofluorimeter PMP, PM, PNP, PN exc. 310 nm em. 380 nm PLP, PL-semicarbazon exc. 280 nm em. 487 nm flowcel 20 µl detektiegrens: PMP, PM, PNP, PN 0,05 ng PLP, PL 0,25 ng	bepaling PL, PLP, PN, PM, PMP in "fortified breakfast cereals" varkensvlees (gebraden), karper, hamburger, melkpoeder (25,30) recovery: PL, PLP, PN, PM, PMP 98,5 ± 4% niveau: 0,01 -0,4 mg/100 g	monster + sulfosalicylzuur homogeniseren (10 min), + CH_2Cl_2 homogeniseren (5 min), centrifugeren 7500 g 4°C (10 min), waterlaag filtreren milipore 0,22 µm clean-up: ionwisselingskolom AG 2 - X 8 elueren: 0,1 M HCl

Tabel 4. Overzicht Reverse-Phase HPLC-methoden (hfdst. 3.3.2.2)

Auteur	Scheiding	Detektie	Toepassingsgebied	Extraktie
J.F. Gregory III (16) (1978)	PM, PL, PN kolom: 10 µm RP C18 30 cm (4 mm ID) eluens: 0,033 M KH_2PO_4 pH 2,2	eigen fluorescentie filterfluorimeter lamp: Hg exc. 295 nm (interf.) em. 370 nm (band) flowcell 18 µl detektiegrens: --	bepaling PL, PM, PN en PLP in modelsysteem recovery: PM, PLP: 75% PN : 95% niveau: 0,5-1,5 mg/100 g	droog produkt (poeder) + 0,2 M KAc pH 4,5 ultrasoonbad (30 min), centrifugeren 4000 g (15 min), enzymhydrolyse (fosfatase) 37°C (1 h), eiwit neerslaan TCA 50°C (15 min), centrifugeren 4000 g (15 min)
J.F. Gregory III (23) (1980)	PLP en PL kolom: 10 µm RP C18 25 cm (4,6 mm ID) eluens: 0,033 M KH_2PO_4 pH 2,2 acetonitril (97,5:2,5)	fluorescentie PL- en PLP-semicarbazon, pre-column reaktie filterfluorimeter lamp: F4T4-BL(Gen.El.) exc. 365 nm (band) em. >400 nm (cut-off) flowcell 70 µl detektiegrens: 2ng PLP	bepaling PLP in dierlijk weefsel recovery: lever (rat) PLP 71% (±5) lever (konijn) PLP 81% (±3) hersenen (konijn) PLP 106% (±1) spier (rat) PLP 78% (±3) niveau: 0,1-1,0 mg/100 g	weefsel homogeniseren met 0,1 M KH_2PO_4 pH 7,0 (1°C) eiwit neerslaan $HClO_4$ centrifugeren 1500 g (20 min) →pH 6-7 $KClO_4$↓(30 min)
J.F. Gregory III (21) (1980)	zie (16)	eigen fluorescentie filterfluorimeter lamp: C4T41 (Gen. El.) exc. 295 nm (interf.) em. 405 nm (band) flowcell 70µl detektiegrens: 0,5-2,5 ng (PL, PM)	bepaling PN in vitamin fortified breakfast cereals recovery: PN 76-109% varieert van soort tot soort, binnen soort konstant (CV 7%) niveau: 5 mg/100 g	produkt + 0,5 M KAc pH 4,5 ultrasoonbad (15 min) centrifugeren 4000 g (20 min) eiwit neerslaan TCA 50°C (15 min) centrifugeren 10000 g (20 min)

Vervolg table 4. Overzicht Reverse-Phase HPLC-methoden (hfdst. 3.3.2.2)

Auteur	Scheiding	Detektie	Toepassingsgebied	Extraktie
J.F. Gregory III (28) (1981)	PLP en PL PMP en PM omzetten (pre-column) in PLP en PL kolom: 5 µm RP C18 25 cm (4,6 mm ID) eluens: 0,033 M KH_2PO_4 pH 2,2 acetonitril (97,5:2,5)	zie (23)	bepaling PLP, PL, PM, PMP in lever (rauw, gekookt), melk, rundergehakt (rauw, gekookt) recovery: PL 105% (± 4) PLP 82% (± 6) PM 102% (± 6) PMP 91% (± 6) PL en PM recovery te hoog vanwege foutieve uitvoering exp. niveau: 0,01-3 mg/100 g	zie (23)
A.K. Williams (19) (1979)	PL, PN, PM kolom: 10 µm RP C18 30 cm (3,9 mm ID) eluens: water (tegenion Na-1-heptaansulfonaat)/ isopropanol (90:10)	UV-sbsorptie 280 nm		
W.J. O'Reilly (22) (1980)	PM, PMP, PL, PLP, PN, 4-PA kolom: 10 µm RP C18 25 cm (4,6 mm ID) eluens: 0,067 M KH_2PO_4 pH 2,6	UV-absorptie 291 nm detektiegrens: 1 ng (urine), 12 ng (plasma) PN, PL, 4-PA	bepaling PN, PL, 4-PA in plasma en urine recovery: PN 100% (± 5) niveau: 1-30 µg/ml reprod. analyse: 100 ± 2%	urine, plasma + $HClO_4$ mixen centrifugeren 2500 g (5 min)

Vervolg table 4. Overzicht Reverse-Phase HPLC-methoden (hfdst. 3.3.2.2)

Auteur	Scheiding	Detektie	Toepassingsgebied	Extraktie
K.L. Lim (24)(27) (1980-1981)	PM, PL, PN, DPN kolom: 10 µm RP C18 25 cm (4,6 mm ID) eluens: 0,033 M KH_2PO_4 pH 2,2/ acetonitril (99:1)	UV-absorptie 280 nm detektiegrens: ± 5 ng	bepaling PN, PL, PM in brood, erwten, melk recovery: PL 5-60% PM 68-77% PN 7-97% niveau: 0,5-70 µg/g reprod. analyse 100 ± 20%	slurry in water (1:1) hydrolyse 0,1 N HCl 100°C (1 h), enzym.hydrolyse (papaine pepsine α-amylase) 37°C (16 h) filtreren clean-up ionwisselaar (Bio Rad AG 50 W X 8), elueren 0,05N KOH
J. Schrijver (32) (1982)	PLP, PL kolom: 5 µm RP C18 25 cm (4,6 mm ID) eluens: 0,05 M KH_2PO_4 pH 2,9	fluorescentie PL- en PLP-semicarbazon post-columnreaktie filterfluorimeter exc. 367 nm em. 478 nm flowcell 18 µl detektiegrens: 0,03 ng	bepaling PL, PLP in bloed recovery: PLP 100% (± 7) niveau: 0,0125 µg/ml precisie analyse: CV 6%	bloed + TCA centrifugeren?

6. LITERATUUR

1. Official Methods of Analysis of the Assoc. of Off. Anal. Chem., 13th ed., 1980.
2. M.M. Polansky, R.T. Canara, E.W. Toepfer: J. Assoc. Off. Agric. Chem. 47 (5), (1964), 827.
3. M.M. Polansky, E.W. Murphy, E.W. Toepfer: J. Assoc. Off. Agric. Chem. 47 (4), (1964), 750.
4. A.R. Prosser, A.J. Sheppard, D.A. Libby: J. Assoc. Off. Agric. Chem. 50 (6), (1967), 1348.
5. C.P. Talley: Anal. Chem., 43 (11), (1971), 1512.
6. R.C. Williams, D.R. Baker, J.A. Schmit: J. Chromatogr. Sci., 11, (1973), 618.
7. K. Callmer, L. Davies: Chromatographia, 7 (11), (1974), 644.
8. V. Fiedlerová, J. Davídek: Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 155, (1974), 277.
9. K. Yasumoto, K. Tadera, H. Tsuji, H. Mitsuda; J. Nutr. Sci. Vitaminol., 21, (1975), 117.
10. A.K. Williams, P.D. Cole: J. Agric. Food Chem., 23 (5), (1975), 915.
11. P. Söderhjelm: Sci. Fd Agric., 26 (1975), 1469.
12. J.F. Gregory, J.R. Kirk: J. Food Sci., 42 (4), (1977), 1073.
13. J.F. Gregory, J.R. Kirk: J. food Sci., 43 (5), (1978), 1585.
14. F. Wong: J. Agric. Food Chem., 26 (6), (1978), 1444.
15. V. Fiedlerová, J. Davídek: Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 166, (1978), 93.
16. J.F. Gregory, J.R. Kirk: J. Food Sci., 43, (1978), 1801.
17. J.T. Vanderslice, K.K. Stewart, M.M. Yarmas: J. Chromatogr., 176, (1979), 280.
18. C.Y.W. Ang: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62 (5), (1979), 1170.
19. A.K. Williams: Methods Enzymol., 62D, (1979), 415.
20. J.F. Gregory, J.R. Kirk: Am. J. Clin. Nutr., 32 (1979), 879.
21. J.F. Gregory: J. Agric. Food Chem, 28 (1980), 486.
22. W.J. O'Reilly, P.J.M. Guelen, M.J.A. Hoes, E. van der Kleijn: J. Chromatogr., 183, (1980), 492.
23. J.F. Gregory: Anal. Biochem., 102, (1980), 374.

24. K.L. Lim, R.W. Young, J.A. Driskell: J. Chromatogr., 188, (1980). 285.
25. J.T. Vanderslice, C.E. Maire, R.F. Doherty, G.R. Brecher: J. Agric. Food Chem., 28, (1980), 1145.
26. J.T. Vanderslice, C.E. Maire: J. Chromatogr., 196, (1980), 176.
27. K.L. Lim: Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, aug. 1981.
28. J.F. Gregory, D.B. Manley, J.R. Kirk: J. Agric. Food Chem., 29, (1981), 921.
29. J.T. Vanderslice, J.F. Brown, G.R. Brecher, C.E. Maire, S.G. Brownlee: J. Chromatogr., 216, (1981), 338.
30. J.T. Vanderslice, C.E. Maire, J. Yakupkovic; J. Food Sci., 46, (1981), 943.
31. S. Navankasattusas, D.B. Lund: J. Food Sci., 47, (1982), 1512.
32. J. Schrijver, A. J. Speek, W.H.P. Schreurs: Tijdschr. v.d. Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie, 7 (6), (1982), 240.
33. Voedingsraad: Voeding, 44 (2), (1983), 62.
34. E. Toepfer, M. Polansky: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53, (1970), 546.
35. L.T. Sennello, C.J. Argoudelis: Anal. Chem., 41 (1), (1969), 171.
36. K.K. Stewart: Working Paper for Infoods Planning Conference, jan./febr. '83, Italy.
37. A.K. Williams: J. Agric. Food Chem., 22 (1), (1974), 107.
38. E.M. Patzer, D.M. Hilker: J. Chromatogr., 135 (1977), 489.
39. J.F. Gregory: Food Technology, jan. 1983, 75.