

Project 404.0072

Analyse van "Food composites" uit de zeven landen studie

Projectleider: ir P.C.H. Hollman


Rapport 89.27

April 1989

Analyseresultaten Zevenlanden-
studie

J.H. Slangen

Medewerkers: B. Aalders-Neihof, H. Bannink, G.M. Binnendijk,
R.G. Coors, W. van Delft, W.D.M. Driessen-van Lankveld, L.E.
Hakemulder, P.J. Herben, M.G.L. Hertog, J.P.C. Hovens, H.J. van der
Kamp, H.C.H. Kleijnen, E.P.M. van Neer-Streutjens, H.M. van der
Struijs-van de Putte

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

Copyright 1989, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-
produkten

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermel-
ding

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

projectbeheer

circulatie

bibliotheek

ir H. Stegeman

J.F. Labrijn

W. van Delft

INHOUD	blz
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MONSTERMATERIAAL	6
2.1 Voorbereiding analysemonsters	7
2.2 Gebruik analysemonsters	8
2.2.1 Homogenaten (O.M.)	8
2.2.2 Homogenaten (gevriesdroogd)	8
2.2.3 Subsamples groente en fruit (O.M.)	9
2.2.4 Subsamples groente en fruit (gevriesdroogd)	9
2.2.5 Drinkwater	10
2.2.6 Controlemonster	10
3 ANALYSEMETHODEN	10
3.1 Homogenaten (O.M.)	11
3.2 Homogenaten (gevriesdroogd)	13
3.3 Subsamples groente en fruit (O.M.)	13
3.4 Subsamples groente en fruit (gevriesdroogd)	14
4 KWALITEITSBEWAKING ANALYSES	14
5 ANALYSERESULTATEN EN DISCUSSIE	16
6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	19

BIJLAGEN

- A LOGISTIEKE GEGEVENS HOMOGENATEN OORSPRONKELIJK MONSTER (O.M.)
- B LOGISTIEKE GEGEVENS HOMOGENATEN GEVRIESDROOGD MONSTER
- C LOGISTIEKE GEGEVENS SUBSAMPLES GROENTE EN FRUIT OORSPRONKELIJK MONSTER (O.M.)
- D LOGISTIEKE GEGEVENS SUBSAMPLES GEVRIESDROOGD MONSTER
- E LOGISTIEKE GEGEVENS DRINKWATER
- F ANALYSERESULTATEN HOMOGENATEN OORSPRONKELIJK MONSTER (O.M.)
- G ANALYSERESULTATEN HOMOGENATEN GEVRIESDROOGD MONSTER
- H ANALYSERESULTATEN SUBSAMPLES GROENTE EN FRUIT OORSPRONKELIJK MONSTER (O.M.)
- I ANALYSERESULTATEN GLUCOSINOLATEN SUBSAMPLES GROENTE EN FRUIT GEVRIESDROOGD MONSTER
- J ANALYSERESULTATEN FLAVONOÏDEN SUBSAMPLES GROENTE EN FRUIT GEVRIESDROOGD MONSTER
- K ANALYSERESULTATEN DRINKWATER
- L ANALYSERESULTATEN CONTROLEMONSTER
- M ANALYSERESULTATEN VOORONDERZOEK NITRAAT EN NITRIET

SAMENVATTING

In het kader van de Zevenlandenstudie, een epidemiologische studie naar de relatie tussen voeding en kanker, heeft het RIKILT de gemiddelde voedingspakketten van 16 cohorten onderzocht op het gehalte aan vitamines, sporelementen en non-nutritieve stoffen als glucosinolaten en flavonoiden. Het gemiddelde voedingspakket werd als mengmonster (food composite) aangeboden aan het RIKILT.

In dit verslag worden de analytisch-chemische aspecten van dit onderzoek nader toegelicht, waarbij aandacht wordt besteed aan de gebruikte analysemethoden, de monstervoorbehandeling, de monsterbewaring en de kwaliteitsbewaking van de analyses. Voor de interne controle van het analyseniveau van een aantal vitamines werd de toepasbaarheid van een gevriesdroogd food composite als controlemonster onderzocht. Dit controlemonster lijkt te voldoen voor de analyse van retinol, totaal caroteen en de tocoferolen; verder onderzoek naar homogeniteit van dit monstermateriaal en naar de dag tot dag variatie van de analysemethoden is op zijn plaats.

Uit het oogpunt van detectiegrens verdienen de analyses van glucosinolaten en flavonoiden aandacht.

()

()

1 INLEIDING

Vanaf medio 1987 tot medio 1988 heeft het RIKILT een bijdrage geleverd aan de Zevenlandenstudie. Deze studie is in de jaren 60 opgezet door prof. dr A. Keys met als doel onderzoek te doen naar de relatie tussen voeding en vooral voedingsvet enerzijds en het voorkomen van hart- en vaatziekten anderzijds. In totaal gaat het om 16 groepen (cohorten) van mannelijke vrijwilligers (totaal ca 16000 personen) in 7 verschillende landen te weten Verenigde Staten, Japan (2*), Griekenland (2*), Italië (3*), Joegoslavië (5*), Finland (2*) en Nederland. Van deze vrijwilligers zijn gegevens omtrent sterfte aan hart- en vaatziekte maar ook aan kanker bekend. Bovendien is van elk cohort de gemiddelde voedingsopname berekend aan de hand van de gegevens verkregen via de "zevende dagse opschrijfmethode".

Als vervolg hierop heeft prof. dr D. Kromhout van het Instituut voor Sociale Geneeskunde te Leiden een studie gestart met als doel onderzoek te doen naar de relatie voeding en kanker. Bij deze studie wordt gebruik gemaakt van de gegevens van de voorafgaande studie, waarbij chemische analyses werden verricht om een zo nauwkeurig mogelijk inzicht te krijgen in de opname van nutriënten en non-nutriënten per cohort. Daarvoor was het noodzakelijk om de gemiddelde dagelijkse opname van voedingsmiddelen, bekend uit de studie van Keys, zo goed mogelijk na te bootsen. Dit gebeurde door deze voedingsmiddelen ter plekke in te kopen en zo snel mogelijk naar Nederland te versturen. Hier werden deze voedingsmiddelen door de Vakgroep Humane Voeding van de Landbouw Universiteit te Wageningen verwerkt tot "food composites", overeenkomend met de gemiddelde opname.

Het RIKILT heeft een bijdrage geleverd door de analyses te verrichten van een aantal vitamines, mineralen en (spoor-)elementen. Bovendien is aan het RIKILT gevraagd onderzoek te doen naar analysemethoden voor non-nutritieve voedingscomponenten zoals glucosinolaten en flavonoiden. Deze verbindingen staan de laatste jaren in de belangstelling vanwege potentiële carcinogene of anti-carcinogene eigenschappen. Cijfermateriaal in dit soort monsters is tot nu toe nauwelijks bekend.

In dit rapport worden de chemisch analytische aspecten van dit onderzoek nader toegelicht. In hoofdstuk 2 zal nader ingegaan worden op de voorbereiding en de onderverdeling van de monsters. Hoofdstuk 3 geeft een overzicht van de gebruikte analysemethoden voor de verschillende types monstermateriaal.

Aangezien de food composites per cohort op verschillende tijdstippen (april-september 1987) werden samengesteld, was het noodzakelijk de analyse van de meest labiele verbindingen (vitamines) gespreid uit te voeren. Voor de bewaking van het niveau van de analysemethode werd de toepasbaarheid van een controlemonster onderzocht. In hoofdstuk 4 zal ingegaan worden op het gebruik van dit controlemonster en de kwaliteitsbewaking van de analyses. Hoofdstuk 5 geeft een overzicht van de gevonden analyseresultaten. Deze worden doorgegeven aan de Vakgroep Humane Voeding, die de verdere berekeningen naar intake per dag uit zal voeren. Deze cijfers op hun beurt zullen samen met de analysecijfers van de LUW naar het Instituut voor Sociale Geneeskunde worden doorgegeven, waar uiteindelijk de vergelijking met de sterftcijfers aan de verschillende kankersoorten zal plaatsvinden. Hoofdstuk 6 geeft de conclusies en aanbevelingen voor eventueel verder onderzoek.

2 MONSTERMATERIAAL

Aangezien het aantal en de aard van de analyses nogal groot was, werden verschillende types analysemonsters gemaakt. Ook was te verwachten dat het niveau voor een aantal componenten sterk verlaagd zou worden door de verdunning van het analysemonster met voedingsmiddelen waarin van nature deze componenten niet of zeer weinig voorkomen. Verder konden de voedingsmiddelen van de verschillende cohorten niet gelijktijdig worden aangevoerd, zodat afbraak of verandering van de te analyseren componenten niet alleen tijdens verwerking van de afzonderlijke voedingsmiddelen tot een analysemonster voorkomen moest worden, maar ook gedurende de bewaring van het analysemonster.

2.1 Voorbereiding analysemonsters

Zoals in de inleiding reeds aangegeven is, werden de afzonderlijke voedingsmiddelen lokaal ingekocht en zo snel mogelijk gekoeld naar de LUW verstuurd. Daar werden de voedingsmiddelen verdeeld in groepen afhankelijk van de gemiddelde dagelijkse opname. De aldus verkregen groepen voedingsmiddelen werden vermalen tot mengmonsters (subsamples). Voor de bepaling van vitamine C werden aparte subsamples bereid, waaraan bovendien een bekende hoeveelheid van een geconcentreerde oplossing oxaalzuur in water werd toegevoegd, dusdanig dat de eindconcentratie aan oxaalzuur in het subsample ca 0,4% bedroeg. Dit ter voorkoming van oxidatie van vitamine C tijdens de voorbereidingen van het laboratoriummonster.

Aan de overige subsamples werd een bekende hoeveelheid van een geconcentreerde anti-oxydantoplossing toegevoegd, dusdanig dat de concentratie hiervan in het homogenaat ca 500 ppm bedroeg. Hiervoor werd gebutyleerde hydroxytolueen (BHT) of tert. butylhydrochinon (t-BHQ) gebruikt, opgelost in methanol. Doel hiervan was de bescherming van de vetoplosbare vitamines en de vetzuren tegen oxidatie gedurende de monster voorbereiding en de daarop volgende bewaring.

Al deze subsamples werden uiteindelijk naar rato vermalen met de hoofdcomponenten zoals brood, rijst en melk. Eventueel werd een bekende extra hoeveelheid gedemineraliseerd water toegevoegd wanneer het monstermateriaal te "dik" bleek te zijn bij het homogeniseren. Van de aldus verkregen homogenaten is precies bekend hoeveel gram methanol, anti-oxydant, oxaalzuur en water is toegevoegd gedurende de opwerking van de afzonderlijke voedingsmiddelen tot een homogeen analysemonster. Alle subsamples en homogenaten werden bewaard bij -20°C in goedsluitende, met stikstofgas gespoelde, kunststof monsterpotten. Een gedeelte van het homogenaat werd ook gevriesdroogd ten behoeve van een aantal analyses. Drinkwatermonsters van elk cohort werden gekoeld bij 4°C bewaard.

2.2 Gebruik analysemonsters

De analysemonsters die het RIKILT onderzocht heeft, werden door de LUW gekoeld op de afdeling AM bezorgd en aldaar voorzien van een RIKILT-nummer. Vervolgens werden de analysemonsters tot de analysedatum bewaard bij -20°C .

2.2.1 Homogenaten (O.M.)

Van elk cohort stonden 10 identieke monsterpotjes ter beschikking, elk ca 50 gram materiaal. Voor elke component werd één potje gereserveerd. Het analysemonster werd vóór de analyse ontdooid, eventueel in een waterbad met een temperatuur van maximaal 45°C, en opnieuw door middel van roeren gehomogeniseerd. Na inweeg werd het restant van het monster opnieuw diepgevroren (-20°C) voor het geval dat heronderzoek noodzakelijk was.

De volgende analyses werden uitgevoerd:

- retinol
- tocoferol (alpha-, bèta- en gamma- samen, delta-tocoferol en alpha-tocotrienol)
- caroteen (alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk en totaal caroteen)
- thiamine
- riboflavine
- vitamine B₆ (pyridoxal, pyridoxamine en pyridoxine samen)
- foliumzuur

De analyse van retinol, tocoferol en totaal caroteen werd binnen twee weken na ontvangst van het monster uitgevoerd, omdat niet bekend was hoelang deze componenten in dit soort monstermateriaal stabiel blijven, ondanks toevoeging van anti-oxydant.

In bijlage A (tabel 1) staan de LUW-nummers, de RIKILT-nummers, de datum van ontvangst van de monsters en de datum waarop de analyses van de bovengenoemde componenten zijn uitgevoerd, vermeld voor elk cohort. De analyse van foliumzuur en vitamine B₆ werd uitgevoerd in oktober 1987.

2.2.2 Homogenaten (gevriesdroogd)

Zoals eerder reeds vermeld werd een gedeelte van het homogenaat door de LUW gevriesdroogd. De gegevens wat betreft droge stof gehalte zijn op de LUW bekend. Van elk cohort was ca 25 gram gevriesdroogd materiaal beschikbaar. De monsters werden in de diepvries bewaard totdat alle cohorten door de LUW gevriesdroogd waren. Alle cohorten werden op één tijdstip (begin december 1987) geanalyseerd.

De volgende analyses werden uitgevoerd:

- seleen
- kwik
- nitraat
- nitriet
- vocht.

In verband met kans op vochtaantrekking van dit monstermateriaal werden de analyses hierin binnen een periode van 2 weken uitgevoerd. In bijlage B (tabel 2) staan de LUW-nummers, de RIKILT-nummers, de datum van ontvangst van de monsters vermeld voor elk cohort.

2.2.3 Subsamples groente en fruit (O.M.)

Van deze subsamples was 250-500 gram analysemateriaal beschikbaar. Hierin werd alleen het gehalte aan vitamine C (ascorbinezuur en dehydro-ascorbinezuur samen) bepaald. De analyses werden voor elk cohort binnen een week uitgevoerd. Vóór de analyse werd het monstermateriaal ontdooid eventueel met behulp van een waterbad, waarbij de temperatuur van het water niet hoger was dan 45°C. Na inweeg werd het monstermateriaal weer ingevroren bij -20°C voor het geval dat heranalyse noodzakelijk was. In bijlage C (tabel 3) staan voor elk cohort de RIKILT-nummers vermeld, het nummer van het subsample, de LUW-nummers, de datum van ontvangst van de monsters en de datum waarop de analyse van totaal vitamine C is uitgevoerd.

2.2.4 Subsamples groente en fruit (gevriesdroogd)

Voor de analyse van glucosinolaten en flavonoiden bleek het in verband met het lage gehalte niet mogelijk de analyses uit te voeren in de oorspronkelijke subsamples. Daarom werd dit monstermateriaal door het RIKILT gevriesdroogd. Daartoe werden alle subsamples in februari 1988 opnieuw ontdooid, eventueel met behulp van een waterbad met een watertemperatuur van maximaal 45°C. Vervolgens werd een bekende hoeveelheid monster afgewogen in een petrischaal met een diameter van 15 cm en bij -20°C ingevroren en gedurende 3 dagen bij een condensortemperatuur van ca -85°C en een druk tussen 0.1 en 0.01 mbar gevriesdroogd (Christ, Delta 2). Het gevriesdroogde materiaal werd opnieuw gewogen, gehomogeniseerd en voorzien van het RIKILTnummer tot de

analysedatum koel (4°C) en donker bewaard. In alle monsters werd het gehalte aan de flavonoïden quercetine en kaempferol bepaald. Voor het gehalte aan glucosinolaten werd eerst een screening toegepast aan de hand van de samenstelling van de subsamples. In bijlage D (tabel 4) staan van elk cohort de RIKILTnummers, het nummer van het subsample, het LUW-nummer, de gewichten vóór en na vriesdrogen en de droge stof-factor vermeld.

2.2.5 Drinkwatermonsters

Deze monsters werden gekoeld (4°C) bewaard tot de datum waarop de analyse van nitraat en nitriet werd uitgevoerd. In bijlage E (tabel 5) staan voor elk cohort de RIKILT-nummers, de LUW-nummers, de datum van ontvangst en de analysedata vermeld.

2.2.6 Controlemonster

Voordat aan de monsternamen begonnen werd, heeft de LUW proef gedraaid aan de hand van de gegevens van het cohort Zutphen. De hele voorgestelde procedure werd zodoende aan een praktijktest onderworpen. De verkregen homogenaten (O.M.) heeft de LUW gevriesdroogd. Dit gevriesdroogde homogenaat werd in goedsluitende kunststof monsterpotten overgebracht en gereserveerd voor gebruik als controlemonster. Opslag vond plaats in de diepvries (-20°C) tot het tijdstip van analyse. Voor elk cohort werd één monsterpot (ca 15 gram) gereserveerd voor de analyse van retinol, totaal caroteen en de verschillende tocoferolen. Tijdens de analyseperiode (maximaal 14 dagen) werd eveneens het vochtgehalte bepaald, zodat de analyseresultaten berekend konden worden op droge stof.

3 ANALYSEMETHODEN

De gebruikte analysemethoden zijn voor het merendeel gebaseerd op interne analysevoorschriften. Dit hoofdstuk geeft een overzicht hiervan en verwijst naar de literatuur waaruit de voorschriften of integraal zijn overgenomen of waarvan ze grotendeels afgeleid zijn. In de volgende paragrafen wordt ook ingegaan op de activiteiten die hieromtrent ontplooid zijn vóór de aanvang van of tijdens het onderzoek.

3.1 Homogenaten (O.M.)

Retinol

De bepaling van retinol is uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-521. De extractie hierbij is gebaseerd op: Grimm, Tiews, Über eine methodische Verbesserung des Vitamin -A-Bestimmung in Füttermitteln mit Hilfe des Dichloräthan Eingsz Verfahrens. Z. Landwirtsch. Forsch., 27, (1972) 42.

De chromatografie is gebaseerd op: Brubacher G., Müller-Mulot W., Southgate D.A.T., Methods for the determination of vitamins in foods (recommended by COST 91). London, Elsevier Appl. Sci. Publishers, 1985.

Tocoferol

De bepaling van de tocoferolen afzonderlijk (alpha-, bèta- en gamma-samen, delta-tocoferol en alpha-tocotriënol) is uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-522. De extractie hierbij is gebaseerd op: Grimm, Tiews, Über eine methodische Verbesserung des Vitamin -A-Bestimmung in Füttermitteln mit Hilfe des Dichloräthan Eingsz Verfahrens. Z. Landwirtsch. Forsch., 27, (1972) 42. De chromatografie is gebaseerd op: McMurray C.H., Blanchflower W.J., Rice D.A., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, (6) (1980) 1258. Bij deze analysemethode zijn de k'-waarden voor bèta- en gamma-tocoferol gelijk. Ook de molaire extinctiecoëfficiënten van deze 2 tocoferolen zijn nagenoeg gelijk. Verder zijn beide ijklijnen in het meetgebied lineair, zodat bij berekening van het gehalte op oppervlak optellen van beide vitaminen geoorloofd is.

Caroteen

De bepaling van caroteen (alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk) is gebaseerd op: Speek A.J. e.a., Food Chemistry 19, (1986) 65-74.

In eerste instantie werd alleen totaal caroteen bepaald volgens de methode van: Brubacher G., Müller-Mulot W., Southgate D.A.T., Methods for the determination of vitamins in foods (recommended by COST 91).

London, Elsevier Appl. Sci. Publishers, 1985. Deze analyses werden uitgevoerd binnen 2 weken na ontvangst van het monstermateriaal omdat van deze componenten niet bekend was hoelang ze stabiel zijn in dit soort monstermateriaal onder deze bewaarcondities.

Gaande het onderzoek bleek het echter mogelijk alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk te bepalen, zodat in dit kader een beter antwoord gegeven kon worden op de gestelde vraag dan de bepaling van totaal caroteen. Door een 3-tal monsters, die reeds langer bewaard waren, opnieuw te onderzoeken met de methode voor totaal caroteen, kon aangetoond worden dat het monstermateriaal redelijk stabiel bleek onder deze bewaarcondities (zie hoofdstuk 5). Derhalve was onderzoek naar het gehalte aan alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk ook na langere bewaring geoorloofd.

Vitamine B₁

De bepaling van vitamine B₁ werd uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-524. De extractie hierbij is gebaseerd op: Strohecker R., Henning H.M., Vitamin Bestimmungen. Weinheim Verlag Chemie G.m.b.H., 1963, 68-101. De chromatografie is gebaseerd op: Wielders J.P.M., Mink Chr.J.K., J. Chromatogr., 277, (1983), 145.

Vitamine B₂

De bepaling van vitamine B₂ werd uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-525. De extractie hierbij is eveneens gebaseerd op: Strohecker R., Henning H.M., Vitamin Bestimmungen. Weinheim Verlag Chemie G.m.b.H., 1963, 101-126. De chromatografie is gebaseerd op: Wielders J.P.M., Mink Chr.J.K., J. Chromatogr., 277, (1983), 145.

Vitamine B₆

De bepaling van vitamine B₆ (pyridoxal, pyridoxine en pyridoxamine samen) werd uitgevoerd volgens: The Association of Vitamin Chemists Inc., Methods of Vitamin Assay. 3th edition. New York etc., John Wiley and Sons, 1966, 212.

Foliumzuur

De bepaling van foliumzuur werd uitgevoerd volgens: The Association of Vitamin Chemists Inc., Methods of Vitamin Assay. 3th edition. New York etc., John Wiley and Sons, 1966, 227.

3.2 Homogenaten (gevriesdroogd)

Seleen

De bepaling van seleen werd uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-5. Deze methode is gebaseerd op: Welz, Melcher, Analyst, 109, (1984), 569.

Kwik

De bepaling van kwik werd uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-7. Deze methode is gebaseerd op:
Linstedt G., Analyst, 95, (1970), 264.

Nitraat en nitriet

De bepaling van nitraat en nitriet werd uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-120. Deze methode is gebaseerd op: Hendrikson, Selmer-Olsen, Analyst, 95, (1970), 514.

Vocht

De bepaling van vocht (80°C vacuüm) werd uitgevoerd volgens EEG-voorschrift L-279/8 (1971).

3.3 Subsamples groente en fruit (O.M.)

Vitamine C

De bepaling van totaal vitamine C, de som van ascorbinezuur en dehydroascorbinezuur, werd uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-119. Deze methode is gebaseerd op: Roy R.B., Conetta A., Salpeter J., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59, (1976), 1244.

3.4 Subsamples groente en fruit (gevroesdroogd)

Glucosinolaten

De bepaling van glucosinolaten werd uitgevoerd volgens intern analysevoorschrift A-466, 2e oplage. Deze methode is gebaseerd op: Spinks E.A., Sones K., Fenwick G.R., Fette, Seifen & Anstrichmittel, 6, (1983), 228.

Flavonoïden

De bepaling van flavonoïden werd uitgevoerd volgens een methode ontwikkeld door: Hertog M.G.L., Flavonoïden (biologische eigenschappen, analysemethode, relatie met kanker), afstudeerscriptie Rijksuniversiteit Limburg studierichting biologische gezondheidkunde, 1988. Met deze methode is het mogelijk de flavonoïden quercetine en kaempferol te kwantificeren.

4 KWALITEITSBEWAKING ANALYSES

Het was om organisatorische redenen niet mogelijk om de monsternamen en de voorbereiding van de laboratoriummonsters voor alle cohorten in een kort tijdsbestek te realiseren. Hierdoor werden de diverse cohorten gespreid over een periode van 6 maanden aan het RIKILT ter analyse aangeboden. Verder is van een aantal componenten (retinol, de tocoferolen en totaal caroteen cq alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk voor wat betreft de homogenaten O.M. en van totaal vitamine C voor wat betreft de subsamples groente en fruit O.M.) niet bekend wat hun stabiliteit is in dit type monstermateriaal, ondanks een aantal preventieve maatregelen zoals toevoegen van anti-oxydant en bewaren bij -20°C tot het tijdstip van analyse. Voor de bepaling van deze componenten is het dus niet mogelijk de monsters op te sparen en gelijktijdig te analyseren. Daarom is het van groot belang dat de eventueel gevonden verschillen in gehalten van een bepaalde component voor de 16 cohorten niet beïnvloed worden door eventuele fluctuaties in het niveau van de analyse. Om dit probleem het hoofd te bieden werd gekozen voor het gebruik van een controlemonster (zie 4.1). De analyse van deze componenten werd binnen een periode van 14 dagen na ontvangst van het monstermateriaal uitgevoerd.

Bij de analyse van totaal vitamine C werd geen gebruik gemaakt van een controlemonster, omdat de kansen op een stabiel vitamine C gehalte in een controlemonster gedurende 6 maanden niet hoog werden ingeschat. Gaande het onderzoek bleek het mogelijk alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk te bepalen. Door een drietal monsters, die reeds langer bewaard waren, opnieuw te analyseren met de methode voor totaal caroteen, werd de stabiliteit van deze componenten onder deze omstandigheden gecontroleerd.

Van de componenten thiamine, riboflavine, vitamine B₆ en foliumzuur werd aangenomen dat ze onder deze omstandigheden (zie 2.1) stabiel zijn.

Voor de componenten nitraat, nitriet, seleen en kwik mag worden aangenomen dat ze in gevriesdroogd monstermateriaal onder deze condities (zie 2.2) stabiel zijn. Wel dient rekening gehouden te worden met kans op vochtaantrekking gedurende bewaring. Om organisatorische redenen was het ondoenlijk om de analyses van nitraat en nitriet in de homogenaten (O.M.) gelijk na samenstelling, dus gespreid in de tijd, uit te voeren. Daarom werd de analyse uitgevoerd in gevriesdroogd monstermateriaal. Hiervan is bekend dat het gehalte aan nitraat en nitriet niet verandert gedurende een bewaarperiode van ca 6 maanden. De als eerste samengestelde homogenaten (Amerika en Italië 3*) waren echter niet kort na samenstelling gevriesdroogd, maar ca 6 weken bewaard in de diepvries. Gedacht werd dat er gedurende deze bewaring eventueel omzetting zou kunnen plaatsvinden van nitraat naar nitriet. Daartoe werden zowel de homogenaten als de subsamples groente en fruit van deze 4 cohorten na 6 weken opnieuw geanalyseerd.

Van de glucosinolaten en van de flavonoïden is niet bekend wat de stabiliteit is in dit soort monstermateriaal en ook niet of vriesdrogen geoorloofd is.

Om het absolute niveau van de analyse te bewaken neemt het RIKILT deel aan (inter-)nationale ringtesten of maakt gebruik van referentiemateriaal met een gecertificeerd gehalte of bepaalt de recovery van een toegevoegde standaard.

Voor de componenten thiamine en riboflavine werd in 1987 deelgenomen aan de IAG-ringtest voor mengvoeder. Voor thiamine werd in dit monster een gehalte gevonden van 3.6 mg/kg, terwijl het gemiddelde gehalte berekend over de 5 deelnemende laboratoria 5.2 mg/kg was met een standaardafwijking $s=1.8$ mg/kg. Voor riboflavine werd een gehalte gevonden van 14.6 mg/kg, terwijl het gemiddelde gehalte berekend over 9 deelnemende laboratoria 14.3 mg/kg bedroeg met een standaardafwijking $s=2.7$ mg/kg.

Voor de analyse van nitraat werd in 1987 tweemaandelijks deelgenomen aan de IPE-ringtest in gevriesdroogd spinazie. Het betrof 12 analyses waarbij een mediaan van 306 en een MAD-waarde (mediaan van de absolute deviaties) van 9.50 mmol/kg gevonden werd, terwijl voor de gehele ringtest bestaande uit 236 analyses een mediaan van 315 en een MAD-waarde van 12.00 mmol/kg werd vastgesteld.

Bij de analyse van kwik werd gebruik gemaakt van referentiemateriaal (LAC-scholreferentiemonster met een certificaatwaarde van 0.34-0.38 mg/kg, 95% betrouwbaarheid) en werd van een zestal monsters de recovery bepaald van een toegevoegde standaard.

Bij de analyse van seleen werd eveneens gebruik gemaakt van referentiemateriaal (LAC-scholreferentiemonster met een certificaatwaarde van 1.69-2.37 mg/kg, 95% betrouwbaarheid) en werd van een drietal monsters de recovery bepaald van een toegevoegde standaard.

5 ANALYSERESULTATEN EN DISCUSSIE

De analyseresultaten van alle onderzochte componenten zijn gemiddelde waarden van duplo-bepalingen en indien nodig berekend naar het produkt waarin het werd aangeleverd. Gemakshalve zijn bij alle tabellen de RIKILT-nummers en de LUW-nummers vermeld.

Bijlage F geeft een overzicht van de analyseresultaten van de componenten retinol, de tocoferolen, alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk en totaal caroteen, thiamine, riboflavine, foliumzuur en vitamine B₆ in de homogenaten oorspronkelijke monster (tabel 6). Opmerkelijk bij caroteen is dat de totaal caroteen bepaling lagere waarden geeft dan de som van de afzonderlijk bepaalde alpha- en bèta-caroteengehalten.

In eerste instantie werd het tegenovergestelde verwacht. Immers bij de bepaling van totaal caroteen wordt een aantal andere carotenen, zoals gamma-caroteen, bij de voorzuivering over een aluminiumoxidekolom niet verwijderd en dus in het gehalte inbegrepen. Bij de HPLC-methode werd echter in geen enkel monster een van deze carotenen aangetoond. De verklaring moet waarschijnlijk gezocht worden in de verschillen in extractieprocedures tussen de analysemethodes.

In bijlage G zijn de analyseresultaten weergegeven van de gevriesdroogde homogenaten (tabel 7) voor de componenten vocht, seleen, kwik, nitraat en nitriet. Deze resultaten zijn ook omgerekend naar de droge stof in verband met vochtaantrekking gedurende bewaring. Het in viervoud bepaalde gehalte aan kwik voor het referentiemateriaal bedroeg 0.37 mg/kg, voor seleen in duplo bepaald 1.71 mg/kg (certificaatwaarde 0.34-0.38 resp. 1.69-2.37 mg/kg). De in zesvoud bepaalde recovery van kwik bedroeg gemiddeld 104%, voor seleen in drievoud 100%.

De analyseresultaten van de bepaling van totaal vitamine C in de oorspronkelijke subsamples groente en fruit zijn vermeld in bijlage H (tabel 8).

De analyseresultaten in de gevriesdroogde subsamples groente en fruit van glucosinolaten resp. flavonoïden zijn weergegeven in bijlage I resp. J (tabel 9 resp. 10). Deze waarden zijn voor beide ook berekend op het oorspronkelijke subsample groente en fruit. Opgemerkt dient te worden dat de subsamples groente en fruit oorspronkelijk monster tot februari 1988 in de diepvries bewaard zijn en toen pas tegelijk gevriesdroogd zijn. Het gehalte aan glucosinolaten werd vervolgens binnen een periode van 2 weken vastgesteld, het gehalte aan flavonoïden werd pas na 10 weken vastgesteld.

Bijlage K geeft de analyseresultaten van de bepaling van nitraat en nitriet in de monsters drinkwater (tabel 11).

Doordat voor de bepaling van alpha- en bèta- caroteen afzonderlijk aan het eind van het onderzoek pas een analysemethode voorhanden was, werd een aantal monsters opnieuw onderzocht (zie 3.1 en 4) met de methode voor totaal caroteen.

RIKILTnummer	bewaartijd in weken	gehalte vóór bewaring in mg/100 g	gehalte na bewaring in mg/100 g
7/4/2583	50	1.57	1.52
7/4/3032	43	1.86	1.45
7/4/3035	42	1.22	1.12

Uit deze resultaten valt af te leiden dat gebruik van het analysemonster voor de bepaling van alpha- en bèta-caroteen afzonderlijk, na langere tijd bewaring onder deze condities, nog toegestaan is.

De analyseresultaten van het vooronderzoek naar nitraat en nitriet zijn weergegeven in bijlage M (tabel 13). Hieruit valt af te leiden dat zowel de homogenaten als de afzonderlijke subsamples groente en fruit gedurende 6 weken bewaren bij -20°C stabiel blijven voor deze componenten en dat er geen omzetting heeft plaatsgevonden naar nitriet.

De analyseresultaten van het controlemonster zijn weergegeven in bijlage L (tabel 12). De stabiliteit gedurende bewaring is voor totaal caroteen, retinol, alpha-tocoferol en voor de som van bèta- en gamma-tocoferol grafisch weergegeven in grafiek 1 t/m 4 (eveneens bijlage L). In deze bijlage is voor elke component de gemiddelde waarde uitgerekend, de gepoolde standaardafwijking van de duploverschillen (s_{duplo}) en de standaardafwijking van alle waarnemingen (s_{niveau}). Toepassing van de F-toets ($p=0,05$; kritieke waarde=4,77) geeft aan dat er significante verschillen zijn voor totaal caroteen, retinol en alpha-tocoferol. Dit betekent dat naast de analysespreiding ook nog andere variabelen een rol spelen, zoals heterogeniteit van het controlemonster en dag tot dag verschillen in de analysemethode. Er is geen reden om aan te nemen dat de gevonden verschillen tussen de cohorten voor het gehalte aan bèta- en gammatocoferol veroorzaakt worden door fluctuaties in het niveau van de analyses; voor totaal caroteen, retinol en alpha-tocoferol dient rekening te worden gehouden met een extra bijdrage, totaal plus of min resp. 4,7%, 8,5% en 11,9%.

Verder dient opgemerkt te worden dat het onderhavige controlemonster slechts 3 verschillende tocoferolen bevat, nl. alpha-, bèta- en gamma-tocopherol, terwijl een aantal cohorten ook delta-tocopherol en alpha-tocotriënol bevat.

Voor een aantal componenten zijn detectiegrenswaarden vermeld. Hiermee dient terdege rekening gehouden te worden bij verdere berekening van de intake per cohort. Het is immers mogelijk dat door de grote verschillen in droge stofgehalte bij een cohort waarbij geen detectiegrenswaarde werd bereikt, toch uiteindelijk een lagere intake per dag berekend wordt dan bij een cohort waarbij wél een detectiegrenswaarde werd bereikt. Dit zal waarschijnlijk optreden bij analyseresultaten van de subsamples groente en fruit en bij die van de homogenaten waarbij extra water is toegevoegd voor de bereiding van een handelbaar laboratoriummonster. Het komt verder voor dat in het ene subsample wel en in het andere subsample behorende bij hetzelfde cohort de detectiegrenswaarde niet werd bereikt. Indien met dit fenomeen geen rekening gehouden zou worden, zou dit afbreuk doen aan de inspanningen om een zo laag mogelijk gehalte te kunnen vaststellen in deze produkten, en bovendien een eventuele relatie voeding(-scomponenten) versus kanker kunnen vertroebelen cq. maskeren.

6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

In het algemeen kan gesteld worden dat het RIKILT er in geslaagd is voor dit project alleszins betrouwbare analyseresultaten te leveren. Een gevriesdroogd monster van het onderzoeksmateriaal (total diet) lijkt perspectieven te bieden als controlemonster voor de bewaking van het analyseiniveau binnen het laboratorium. Gedurende een periode van 6 maanden lijkt het gehalte aan retinol, totaal caroteen en de tocoferolen in dit controlemonster redelijk stabiel. De hierbij vastgestelde variatiecoëfficiënt kan oplopen tot 12%, hetgeen veroorzaakt kan worden door de dag tot dag variatie in het niveau van de analysemethode of de homogeniteit van dit soort monstermateriaal. Nader onderzoek is op zijn plaats.

Afhankelijk van de resultaten van dit onderzoek zou, bij een eventueel vervolgonderzoek, ook rekening gehouden moeten worden bij de samenstelling van de subsamples met de vraag welke componenten geanalyseerd moeten worden, zodat voorkomen kan worden dat detectiegrenswaarden bereikt worden. Wellicht kunnen dan ook nog andere interessante componenten geanalyseerd worden, die nu nog niet aantoonbaar zijn vanwege een verkeerd gekozen subsamplesamenstelling.

Dit geldt met name voor de flavonoïden, waarbij dan gedacht kan worden aan myricetine, robinetine, morine en (iso-)rhamnetine, en voor de glucosinolaten.

Daarnaast dient te worden onderzocht in hoeverre de analysemethoden voor de flavonoïden en glucosinolaten aangepast kunnen worden zodanig dat lagere detectiegrenzen haalbaar zijn. Effecten van monstervoorbewerking en -bewaring op de gehalten aan flavonoïden en glucosinolaten dienen nader onderzocht te worden.

Onderzoek naar de stabiliteit van totaal vitamine C tijdens bewaring onder deze condities gedurende langere tijd is gewenst. Nu kunnen de extracten gedurende maximaal één week bewaard worden, minimaal 4 weken zou wenselijk zijn.

Voor de tocoferolen valt te overwegen om aandacht te besteden aan de chromatografische scheiding van bèta- en gamma-tocopherol, ofschoon de gebruikte methode het sommeren van beide vitameren niet in de weg staat.

Er is behoefte aan gecertificeerde referentiematerialen voor de analyse van vitamines in levensmiddelen.

Biilage A Logistieke gegevens homogeen monster (O.M.)

Tabel 1:

Overzicht van de Rikiltnummers, de LUW-nummers, de datum van ontvangst van het analysemateriaal en de analysedata van de componenten retinol, tocoferol, totaal caroteen, thiamine en riboflavine voor de onderzochte cohorten.

Cohort	Rikilt-nummer	LUW-nummer	datum ontvangst	datum analyse retinol	datum analyse tocoferol	datum analyse totaal caroteen	datum analyse thiamine en riboflavine
amerika	7/4/2583	3612	09-04-87	21-04-87	04-05-87	15-09-87	07-09-87
crevalcore	7/4/3029	3653	21-05-87	25-05-87	22-06-87	26-05-87	09-09-87
montegiorgio	7/4/3032	3654	23-05-87	25-05-87	22-06-87	26-05-87	09-09-87
rome	7/4/3035	3655	27-05-87	05-06-87	22-06-87	10-06-87	09-09-87
dalmatie	7/4/3703	3656	30-06-87	15-07-87	01-07-87	02-07-87	07-09-87
slavonie	7/4/3706	3657	30-06-87	15-07-87	01-07-87	02-07-87	07-09-87
velika krsna	7/4/3708	3658	30-06-87	15-07-87	01-07-87	02-07-87	07-09-87
belgrado	7/4/3710	3659	30-06-87	15-07-87	01-07-87	02-07-87	07-09-87
zrenjanin	7/4/3713	3660	30-06-87	15-07-87	01-07-87	02-07-87	07-09-87
zutphen	7/4/4032	3669	08-07-87	15-07-87	16-07-87	14-07-87	07-09-87
finland oost	7/4/4798	3676	12-08-87	17-08-87	25-08-87	18-08-87	09-09-87
finland west	7/4/4946	3677	14-08-87	17-08-87	25-08-87	18-08-87	09-09-87
tanushimaru	7/4/5065	3678	21-08-87	31-08-87	10-09-87	27-08-87	09-09-87
ushibuka	7/4/5124	3679	26-08-87	31-08-87	10-09-87	27-08-87	09-09-87
kreta	7/4/5818	3705	24-09-87	12-10-87	07-10-87	08-10-87	21-10-87
korfu	7/4/5964	3706	29-09-87	12-10-87	07-10-87	08-10-87	21-10-87

Opmerking: foliumzuur en vitamine B6 (pyridoxal, pyridoxamine en pyridoxine samen) werden onderzocht in de maand oktober 1987.

Bijlage B Logistieke gegevens homogenaten gevriesdroogd monster

Tabel 2:

Overzicht van de Rikiltnummers, de LUW-nummers en de datum van ontvangst van het analysemateriaal voor de onderzochte cohorten.

Cohort	Rikilt- nummer	LUW- nummer	datum ontvangst
amerika	7/4/3205	3612	10-06-87
crevalcore	7/4/3206	3653	10-06-87
montegiorgio	7/4/3207	3654	10-06-87
rome	7/4/3208	3655	10-06-87
dalmatie	7/4/4035	3656	9-07-87
slavonie	7/4/4036	3657	9-07-87
velika krsna	7/4/4037	3658	9-07-87
belgrado	7/4/4038	3659	9-07-87
zrenjanin	7/4/4039	3660	9-07-87
zutphen	7/4/4949	3669	14-08-87
finland oost	7/4/5068	3676	21-08-87
finland west	7/4/5069	3677	21-08-87
tanushimaru	7/4/5962	3678	29-09-87
ushibuka	7/4/5963	3679	29-09-87
kreta	7/4/6065	3705	6-10-87
korfu	7/4/6066	3706	6-10-87

opmerking: de analyses werden uitgevoerd begin december 1987

Bijlage C Logistieke gegevens subsamples groente en fruit in het oorspronkelijk monster (O.M.).

Tabel 3:

Overzicht van de Rikiltnummers, de LUW-nummers, de datum van ontvangst van het analysemateriaal en de analysedatum van vitamine C voor de subsamples van de onderzochte cohorten.

cohort	Rikilt- nummer	subsample nummer	LUW- nummer	datum ontvangst	datum analyse
amerika	7/4/2584	2	3612	09-04-87	14-04-87
amerika	7/4/2585	3	3612	09-04-87	14-04-87
cream style	7/4/2586		3612	09-04-87	14-04-87
crevalcore	7/4/3030	2	3653	21-05-87	27-05-87
crevalcore	7/4/3031	3	3653	21-05-87	27-05-87
montegiorgio	7/4/3033	2	3654	23-05-87	27-05-87
montegiorgio	7/4/3034	3	3654	23-05-87	27-05-87
rome	7/4/3036	2	3655	27-05-87	2-06-87
rome	7/4/3037	3	3655	27-05-87	2-06-87
dalmatie	7/4/3704	2	3656	30-06-87	30-06-87
dalmatie	7/4/3705	3	3656	30-06-87	30-06-87
slavonie	7/4/3707	2	3657	30-06-87	30-06-87
velika krsna	7/4/3709	2	3658	30-06-87	30-06-87
belgrado	7/4/3711	2	3659	30-06-87	30-06-87
belgrado	7/4/3712	3	3659	30-06-87	30-06-87
zrenjanin	7/4/3714	2	3660	30-06-87	30-06-87
zrenjanin	7/4/3715	3	3660	30-06-87	30-06-87
zutphen	7/4/4033	2	3669	8-07-87	9-07-87
zutphen	7/4/4034	3	3669	8-07-87	9-07-87
finland oost	7/4/4799	2	3676	12-08-87	13-08-87
finland oost	7/4/4800	3	3676	12-08-87	13-08-87
finland west	7/4/4947	2	3677	14-08-87	18-08-87
finland west	7/4/4948	3	3677	14-08-87	18-08-87
tanushimaru	7/4/5066	2	3678	21-08-87	25-08-87
tanushimaru	7/4/5067	3	3678	21-08-87	25-08-87
ushibuka	7/4/5125	2	3679	26-08-87	27-08-87
ushibuka	7/4/5126	3	3679	26-08-87	27-08-87
kreta	7/4/5819	2	3705	24-09-87	30-09-87
kreta	7/4/5820	3	3705	24-09-87	30-09-87
korfu	7/4/5965	2	3706	29-09-87	30-09-87
korfu	7/4/5966	3	3706	29-09-87	30-09-87

Bijlage D Logistieke gegevens subsamples groente en fruit in het
gevriesdroogde monster

Tabel 4:

Overzicht van de Rikiltnummers, de subsample nummers, de LUW-nummers,
de massa in g voor en na vriesdrogen en de droge stoffactor voor
de subsamples van de onderzochte cohorten.

cohort	Rikilt- nummer	subsample nummer	LUW- nummer	gewichten		droge stof factor
				voor vriesdrogen	na	
amerika	7/4/2584	2	3612	157.46	26.19	0.1663
amerika	7/4/2585	3	3612	154.49	23.23	0.1504
crevalcore	7/4/3030	2	3653	149.99	16.87	0.1125
crevalcore	7/4/3031	3	3653	154.11	26.12	0.1695
montegiorgio	7/4/3033	2	3654	149.16	16.83	0.1128
montegiorgio	7/4/3034	3	3654	150.80	42.39	0.2811
rome	7/4/3036	2	3655	151.81	13.30	0.0876
rome	7/4/3037	3	3655	155.08	18.82	0.1214
dalmatie	7/4/3704	2	3656	152.07	15.04	0.0989
dalmatie	7/4/3705	3	3656	153.36	11.85	0.0773
slavonie	7/4/3707	2	3657	152.88	30.45	0.1992
velika krsna	7/4/3709	2	3658	150.55	31.77	0.2110
belgrado	7/4/3711	2	3659	152.64	19.05	0.1248
belgrado	7/4/3712	3	3659	151.18	29.56	0.1955
zrenjanin	7/4/3714	2	3660	151.34	18.12	0.1197
zrenjanin	7/4/3715	3	3660	150.66	41.07	0.2726
zutphen	7/4/4033	2	3669	152.81	21.18	0.1386
zutphen	7/4/4034	3	3669	152.08	22.35	0.1470
finland oost	7/4/4799	2	3676	150.82	24.14	0.1601
finland oost	7/4/4800	3	3676	152.77	17.56	0.1149
finland west	7/4/4947	2	3677	149.89	20.31	0.1355
finland west	7/4/4948	3	3677	153.41	32.85	0.2141
tanushimaru	7/4/5066	2	3678	150.26	24.42	0.1625
tanushimaru	7/4/5067	3	3678	153.46	32.51	0.2118
ushibuka	7/4/5125	2	3679	151.11	13.29	0.0879
ushibuka	7/4/5126	3	3679	152.49	30.12	0.1975
kreta	7/4/5819	2	3705	152.82	18.92	0.1238
kreta	7/4/5820	3	3705	151.53	40.44	0.2669
korfu	7/4/5965	2	3706	131.10	13.53	0.1032
korfu	7/4/5966	3	3706	156.17	45.27	0.2899

Bijlage E Logistieke gegevens drinkwater

Tabel 5:

Overzicht van de Rikiltnummers en de LUW-nummers voor de onderzochte cohorten.

Cohort	Rikilt- nummer	LUW- nummer
amerika	8/4/1725	3612
crevalcore	8/4/1726	3653
montegiorgio	8/4/1727	3654
rome	8/4/1728	3655
dalmatie	8/4/1729	3656
slavonie	8/4/1730	3657
velika krsna	8/4/1731	3658
belgrado	8/4/1732	3659
zrenjanin	8/4/1733	3660
zutphen	8/4/1734	3669
finland oost	8/4/1735	3676
finland west	8/4/1736	3677
tanushimaru	8/4/1737	3678
ushibuka	8/4/1738	3679
kreta	8/4/1739	3705
korfu	8/4/1740	3706

opmerking: -datum ontvangst analysemonster: 13-4-1988
-datum analyse nitraat en nitriet: 15-4-1988

Bijlage F Analyseresultaten homogenaten oorspronkelijk monster (O.M.)

Tabel 6:

Overzicht van de analyseresultaten van de componenten retinol in IE/100g, alpha-tocoferol, beta- en gamma-tocoferol samen, delta-tocoferol, alpha-tocotrienol, thiamine, riboflavine, vitamine B6, foliumzuur, alpha-caroteen, beta-caroteen, de som van alpha- en beta-caroteen en totaal caroteen in µg/100g voor de onderzochte cohorten.

Cohort	Rikilt-nummer	LUM-nummer	retinol	alpha-tocoferol	beta+gamma tocoferol	delta tocoferol	alpha-tocotrienol	vitamine B1	vitamine B2	vitamine B6	foliumzuur	alpha-caroteen	beta-caroteen	alpha+beta-caroteen	totaal caroteen
amerika	7/4/2583	3612	209	0.429	1.179	0.333	0.050	0.104	0.130	0.111	0.044	0.029	0.162	0.191	0.157
crevalcore	7/4/3029	3653	193	0.670	0.129	-0.010	-0.010	0.056	0.082	0.071	0.038	-0.002	0.052	0.052	0.076
sontegiorgio	7/4/3032	3654	70	0.759	0.282	0.036	0.028	0.071	0.066	0.096	0.037	0.008	0.166	0.174	0.186
rome	7/4/3035	3655	71	0.696	0.117	-0.010	-0.010	0.042	0.074	0.099	0.044	-0.002	0.129	0.129	0.122
dalmatie	7/4/3703	3656	54	0.610	0.286	0.084	-0.010	0.048	0.087	0.063	0.037	-0.002	0.162	0.162	0.132
slavonie	7/4/3706	3657	86	0.433	0.257	0.032	0.034	0.049	0.080	0.059	0.038	0.005	0.132	0.137	0.098
velika krsna	7/4/3708	3658	54	0.304	0.236	0.038	0.025	0.078	0.088	0.054	0.040	-0.002	0.024	0.024	0.022
belgrado	7/4/3710	3659	186	1.172	0.660	0.104	-0.010	0.100	0.120	0.101	0.034	0.040	0.112	0.152	0.110
trenjanin	7/4/3713	3660	62	0.610	0.340	0.037	0.020	0.108	0.079	0.099	0.038	0.021	0.109	0.130	0.098
zutphen	7/4/4032	3669	245	0.482	0.668	0.140	-0.010	0.070	0.122	0.089	0.036	0.017	0.164	0.181	0.152
finland oost	7/4/4798	3676	274	0.373	0.151	-0.010	0.120	0.070	0.149	0.091	0.040	0.011	0.056	0.067	0.062
finland west	7/4/4946	3677	198	0.355	0.180	-0.010	0.090	0.087	0.128	0.071	0.041	0.028	0.084	0.112	0.087
tanushimaru	7/4/5065	3678	125	0.294	0.560	0.272	0.082	0.058	0.054	0.087	0.038	0.027	0.120	0.147	0.101
ushibuka	7/4/5124	3679	47	0.366	0.492	0.129	0.052	0.044	0.076	0.088	0.042	0.024	0.082	0.106	0.085
kreta	7/4/5818	3705	36	1.062	0.328	-0.010	0.056	0.101	0.070	0.091	0.044	-0.002	0.092	0.092	0.309
korfu	7/4/5964	3706	13	1.525	0.236	-0.010	0.069	0.074	0.056	0.113	0.048	-0.002	0.106	0.106	0.076

opmerking: gehalte kleiner dan detectiegrens is aangegeven met -

Bijlage 6 Analyseresultaten homogenaten gevriesdroogd monster

Tabel 7:

Overzicht van de analyseresultaten van de componenten vocht in %, nitraat, seleen en kwik in mg/kg van de onderzochte cohorten; de componenten nitraat, seleen en kwik zijn eveneens berekend op droge stof (ds).

Cohort	Rikilt- nummer	LUV- nummer	vocht	nitraat	seleen	kwik	factor ds	nitraat ds	seleen ds	kwik ds
amerika	7/4/3205	3612	3.72	242	0.346	-0.0050	0.9628	251	0.3594	-0.0052
crevalcore	7/4/3206	3653	6.06	112	0.081	0.0090	0.9394	119	0.0862	0.0096
montegiorgio	7/4/3207	3654	2.01	266	0.080	0.0320	0.9799	271	0.0816	0.0327
rome	7/4/3208	3655	2.80	254	0.148	0.0140	0.9720	261	0.1523	0.0144
dalmatie	7/4/4035	3656	4.49	792	0.122	0.0170	0.9551	829	0.1277	0.0178
slavonie	7/4/4036	3657	4.04	163	0.047	0.0130	0.9596	170	0.0490	0.0135
velika krsna	7/4/4037	3658	6.75	21	0.042	-0.0050	0.9325	23	0.0450	-0.0054
belgrado	7/4/4038	3659	3.80	82	0.068	0.0250	0.9620	85	0.0707	0.0260
zrenjanin	7/4/4039	3660	6.00	96	0.052	-0.0050	0.9400	102	0.0553	-0.0053
zutphen	7/4/4949	3669	3.39	512	0.076	-0.0050	0.9661	530	0.0787	-0.0052
finland oost	7/4/5068	3676	6.08	58	0.116	0.0100	0.9392	62	0.1235	0.0106
finland west	7/4/5069	3677	5.11	89	0.122	-0.0050	0.9489	94	0.1286	-0.0053
tanushimaru	7/4/5962	3678	5.88	542	0.106	0.0150	0.9412	576	0.1126	0.0159
ushibuka	7/4/5963	3679	5.14	288	0.173	0.0350	0.9486	304	0.1824	0.0369
kreta	7/4/6065	3705	1.95	34	0.096	0.0270	0.9805	35	0.0979	0.0275
korfu	7/4/6066	3706	1.76	102	0.053	0.0240	0.9824	104	0.0539	0.0244

opmerkingen: - gehalte kleiner dan detectiegrens is aangegeven met -

- gehalte nitriet in alle monsters kleiner dan 1 mg/kg.

Bijlage H Analyseresultaten subsamples groente en fruit in het oorspronkelijk monster (O.M.).

Tabel 8:

Overzicht van de analyseresultaten van de component totaal vitamine C in mg/100g van de verschillende subsamples van de onderzochte cohorten.

Cohort	subsample- nummer	Rikilt- nummer	LUW- nummer	totaal vitamine C
amerika	2	7/4/2584	3612	21.55
amerika	3	7/4/2585	3612	24.56
cream style		7/4/2586	3612	1.15
crevalcore	2	7/4/3030	3653	8.76
crevalcore	3	7/4/3031	3653	19.26
montegiorgio	2	7/4/3033	3654	12.04
montegiorgio	3	7/4/3034	3654	12.64
rome	2	7/4/3036	3655	8.63
rome	3	7/4/3037	3655	15.80
dalmatie	2	7/4/3704	3656	6.26
dalmatie	3	7/4/3705	3656	12.34
slavonie	2	7/4/3707	3657	9.27
velika krsna	2	7/4/3709	3658	9.56
belgrado	2	7/4/3711	3659	12.07
belgrado	3	7/4/3712	3659	20.91
zrenjanin	2	7/4/3714	3660	19.20
zrenjanin	3	7/4/3715	3660	6.15
zutphen	2	7/4/4033	3669	16.92
zutphen	3	7/4/4034	3669	20.28
finland oost	2	7/4/4799	3676	16.68
finland oost	3	7/4/4800	3676	17.77
finland west	2	7/4/4947	3677	15.62
finland west	3	7/4/4948	3677	6.56
tanushimaru	2	7/4/5066	3678	4.48
tanushimaru	3	7/4/5067	3678	14.22
ushibuka	2	7/4/5125	3679	13.68
ushibuka	3	7/4/5126	3679	5.78
kreta	2	7/4/5819	3705	15.86
kreta	3	7/4/5820	3705	8.13
korfu	2	7/4/5965	3706	13.82
korfu	3	7/4/5966	3706	11.08

Bijslage I Analyseresultaten glucosinolaten subsamples groente en fruit gevriesdroogd monster

Tabel 9:

Overzicht van de analyseresultaten van de componenten alkenyl-glucosinolaat, aryl-glucosinolaat en indolyl-glucosinolaat in $\mu\text{mol/g}$ van de verschillende subsamples (vds) van de onderzochte cohorten; deze componenten zijn ook berekend op het oorspronkelijke monstermateriaal (O.M.) van de subsamples.

Cohort	subsample- nummer	Rikilt- nummer	LUW- nummer	alkenyl-GLS in vds	aryl-GLS in vds	indolyl-GLS in vds	alkenyl-GLS in O.M.	aryl-GLS in O.M.	indolyl-GLS in O.M.
amerika	2	7/4/2584	3612	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0083	-0.017	-0.0017
amerika	3	7/4/2585	3612	0.20	-0.10	0.80	0.0301	-0.015	0.1203
crevalcore	2	7/4/3030	3653	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
crevalcore	3	7/4/3031	3653	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0085	-0.017	-0.0017
montegiorgio	2	7/4/3033	3654	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
montegiorgio	3	7/4/3034	3654	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0141	-0.028	-0.0028
rome	2	7/4/3036	3655	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0044	-0.009	-0.0009
rome	3	7/4/3037	3655	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
dalmatie	2	7/4/3704	3656	-0.05	-0.10	0.53	-0.0049	-0.010	0.0524
dalmatie	3	7/4/3705	3656	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
slavonie	2	7/4/3707	3657	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
velika krsna	2	7/4/3709	3658	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0106	-0.021	-0.0021
belgrado	2	7/4/3711	3659	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0062	-0.012	-0.0012
belgrado	3	7/4/3712	3659	0.13	-0.10	0.10	0.0254	-0.020	0.0196
zrenjanin	2	7/4/3714	3660	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0060	-0.012	-0.0012
zrenjanin	3	7/4/3715	3660	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0136	-0.027	-0.0027
zutphen	2	7/4/4033	3669	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
zutphen	3	7/4/4034	3669	0.29	-0.10	0.57	0.0426	-0.015	0.0838
finland oost	2	7/4/4799	3676	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
finland oost	3	7/4/4800	3676	2.15	0.39	0.69	0.2471	0.045	0.0793
finland west	2	7/4/4947	3677	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0068	-0.014	-0.0014
finland west	3	7/4/4948	3677	0.41	0.22	0.10	0.0878	0.047	0.0214
tanushimaru	2	7/4/5066	3678	0.70	-0.10	0.06	0.1138	-0.016	0.0098
tanushimaru	3	7/4/5067	3678	0.18	-0.10	0.21	0.0381	-0.021	0.0445
ushibuka	2	7/4/5125	3679	1.44	-0.10	0.58	0.1266	-0.009	0.0510
ushibuka	3	7/4/5126	3679	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0099	-0.020	-0.0020
kreta	2	7/4/5819	3705	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.000	0.0000
kreta	3	7/4/5820	3705	0.18	-0.10	0.40	0.0480	-0.027	0.1068
korfu	2	7/4/5965	3706	-0.05	-0.10	-0.01	-0.0052	-0.010	-0.0010
korfu	3	7/4/5966	3706	0.10	-0.10	0.15	0.0290	-0.029	0.0435

opmerkingen: - nulwaarde betekent niet geanalyseerd

- gehalte kleiner dan detectiegrens is aangegeven met -

Bijlage J Analyseresultaten flavonoiden subsamples groente en fruit in het gevriesdroogd monster.

Tabel 10:

Overzicht van de analyseresultaten van de componenten quercetine en kaemferol in mg/100g van de verschillende subsamples van de onderzochte cohorten; deze componenten zijn ook berekend op het oorspronkelijke monstermateriaal (O.M.).

Cohort	subsample- nummer	Rikilt- nummer	LUW- nummer	quercetine in vds	kaemferol in vds	quercetine in O.M.	kaemferol in O.M.
amerika	2	7/4/2584	3612	3.68	-1.25	0.61	-0.21
amerika	3	7/4/2585	3612	19.61	-1.25	2.95	-0.19
crevalcore	2	7/4/3030	3653	18.47	-1.25	2.08	-0.14
crevalcore	3	7/4/3031	3653	15.10	2.38	2.56	0.40
montegiorgio	2	7/4/3033	3654	33.33	-1.25	3.76	-0.14
montegiorgio	3	7/4/3034	3654	10.14	1.98	2.85	0.56
rome	2	7/4/3036	3655	15.28	4.96	1.34	0.43
rome	3	7/4/3037	3655	24.52	-1.25	2.98	-0.15
dalmatie	2	7/4/3704	3656	39.58	27.38	3.91	2.71
dalmatie	3	7/4/3705	3656	-2.50	-1.25	-0.19	-0.10
slavonie	2	7/4/3707	3657	34.93	-1.25	6.96	-0.25
velika krsna	2	7/4/3709	3658	19.61	9.57	4.14	2.02
belgrado	2	7/4/3711	3659	4.08	-1.25	0.51	-0.16
belgrado	3	7/4/3712	3659	14.61	3.85	2.86	0.75
zrenjanin	2	7/4/3714	3660	13.16	-1.25	1.58	-0.15
zrenjanin	3	7/4/3715	3660	-3.45	-1.25	0.94	-0.34
zutphen	2	7/4/4033	3669	-2.50	10.43	-0.35	1.45
zutphen	3	7/4/4034	3669	5.89	2.26	0.87	0.33
finland oost	2	7/4/4799	3676	8.94	-1.25	1.43	-0.20
finland oost	3	7/4/4800	3676	28.03	3.38	3.22	0.39
finland west	2	7/4/4947	3677	-2.50	-1.25	-0.34	-0.17
finland west	3	7/4/4948	3677	8.73	-1.25	1.87	-0.27
tanushimaru	2	7/4/5066	3678	10.16	-1.25	1.65	-0.20
tanushimaru	3	7/4/5067	3678	6.09	6.77	1.29	1.43
ushibuka	2	7/4/5125	3679	45.71	-1.25	4.02	-0.11
ushibuka	3	7/4/5126	3679	3.05	3.38	0.60	0.67
kreta	2	7/4/5819	3705	3.66	-1.25	0.45	-0.15
kreta	3	7/4/5820	3705	19.91	9.02	5.31	2.41
korfu	2	7/4/5965	3706	4.06	-1.25	0.42	-0.13
korfu	3	7/4/5966	3706	15.64	2.54	4.53	0.74

opmerking:- gehalte kleiner dan detectiegrens is aangegeven met -

Bijlage K Analyseresultaten drinkwater

Tabel 11:

Overzicht van de analyseresultaten van de componenten nitraat en nitriet in mg/kg van de onderzochte cohorten.

Cohort	Rikilt- nummer	LUW- nummer	nitraat
amerika	8/4/1725	3612	2.4
crevalcore	8/4/1726	3653	7.4
montegiorgio	8/4/1727	3654	0.7
rome	8/4/1728	3655	2.3
dalmatie	8/4/1729	3656	0.8
slavonie	8/4/1730	3657	6.0
velika krsna	8/4/1731	3658	0.1
belgrado	8/4/1732	3659	151.8
zrenjanin	8/4/1733	3660	3.0
zutphen	8/4/1734	3669	3.7
finland oost	8/4/1735	3676	3.6
finland west	8/4/1736	3677	0.6
tanushimaru	8/4/1737	3678	1.0
ushibuka	8/4/1738	3679	0.6
kreta	8/4/1739	3705	10.4
korfu	8/4/1740	3706	0.6

opmerking: -gehalte aan nitriet in alle monsters kleiner dan 1 mg/kg

Bijlage L Analyseresultaten controlemonster

Tabel 12a:

Overzicht van de afzonderlijke analyseresultaten in mg/100g per tijdstip, het berekende gemiddelde en het verloop ($t_0=100$) bij de verschillende bewaartijden voor totaal caroteen.

bewaartijd in dagen	A	B	gemiddeld gehalte	verloop
0	0.387	0.381	0.384	100.0
11	0.388	0.388	0.388	101.0
15	0.437	0.427	0.432	112.5
55	0.415	0.393	0.404	105.2
97	0.410	0.405	0.408	106.3

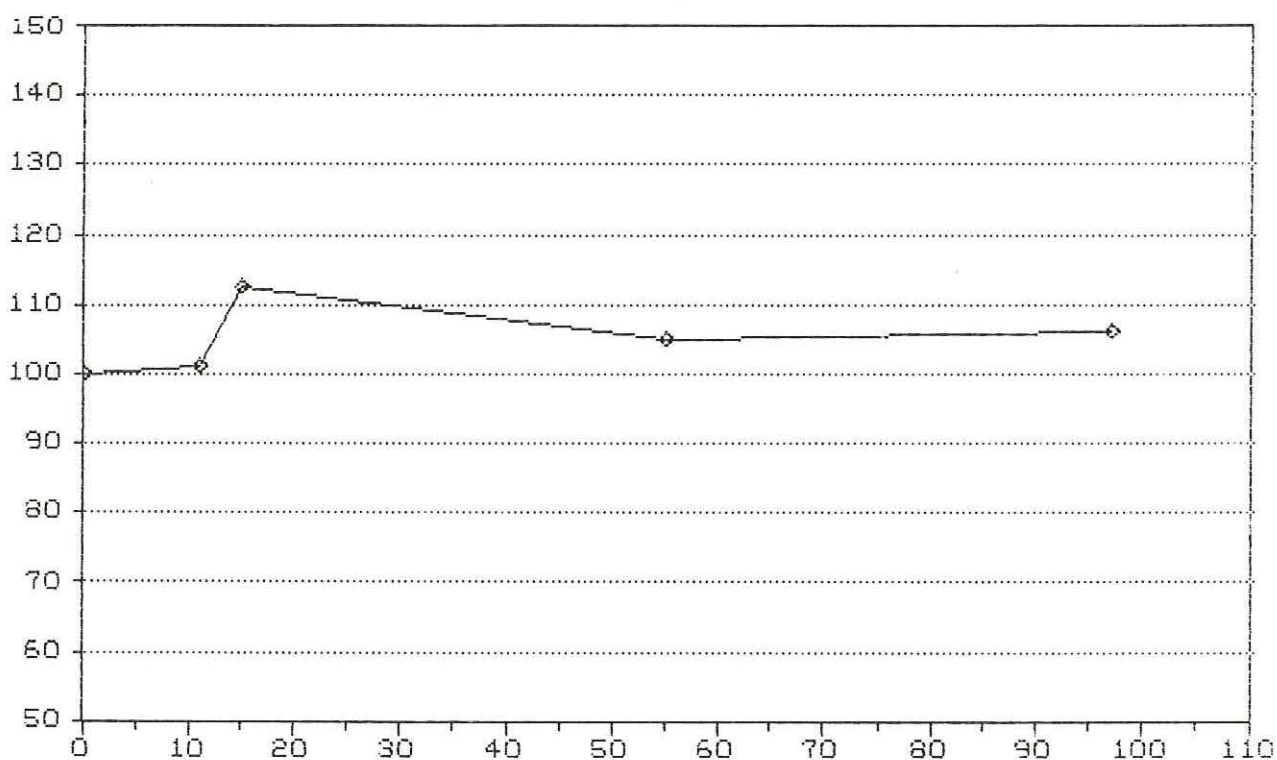
gemiddelde: 0.4031 mg/100g (n=10)

s(duplo) : 0.0080

s(niveau) : 0.0191

VC(duplo): 2.0%

VC(niveau): 4.7%



Grafiek 1:

Het verloop ($t_0=100$) van het gehalte aan totaal caroteen als functie van de bewaartijd in dagen

Bijlage L Analyseresultaten controlemonster (vervolg)

Tabel 12c:

Overzicht van de afzonderlijke analyseresultaten in mg/100g per tijdstip, het berekende gemiddelde en het verloop (t0=100) bij de verschillende bewaartijden voor alpha-tocoferol.

bewaartijd in dagen	A	B	gemiddeld gehalte	verloop
0	2.566	2.631	2.599	100.0
15	2.261	2.451	2.356	90.7
55	2.070	2.162	2.141	82.4
71	2.183	2.149	2.166	83.3
98	2.919	2.698	2.808	108.0

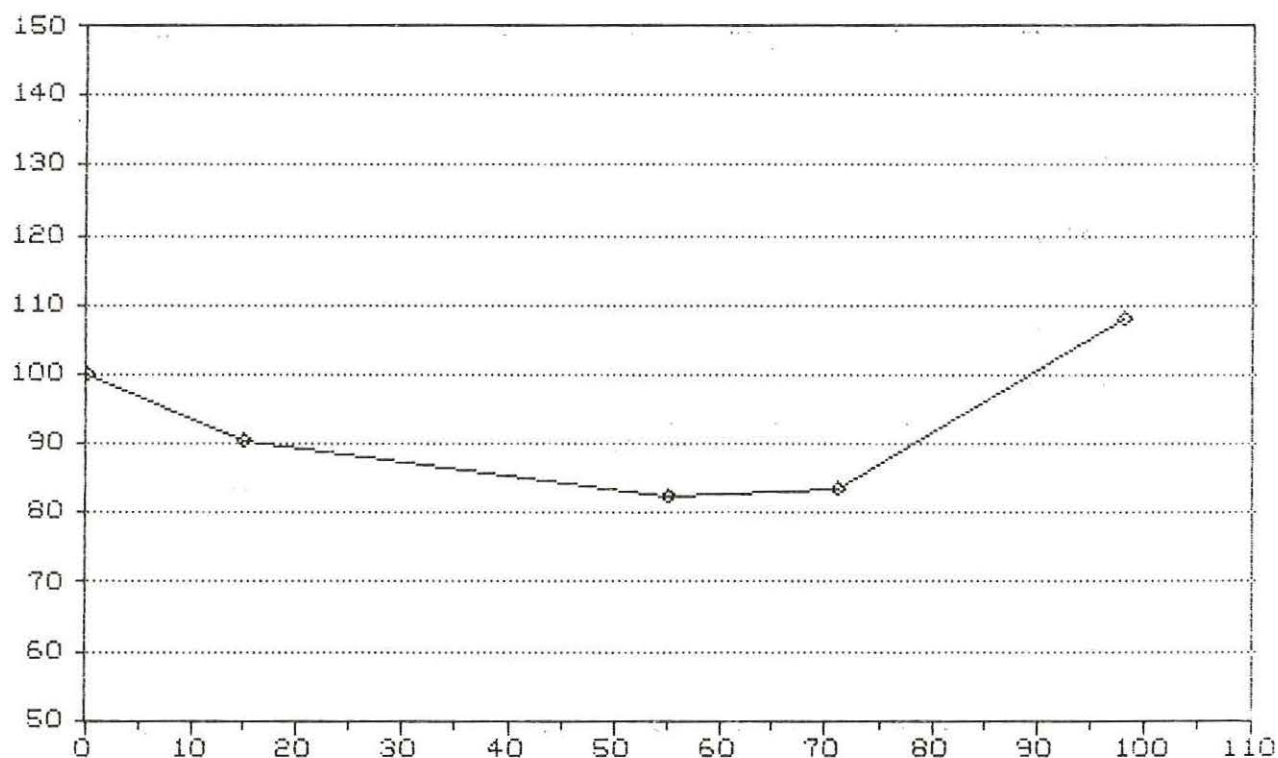
gemiddelde: 2.409 mg/100g

s(duplo) : 0.099

s(niveau) : 0.287

VC(duplo): 4.1%

VC(niveau): 11.9%



Grafiek 3:

Het verloop (t0=100) van het gehalte aan alpha-tocoferol als functie van de bewaartijd in dagen.

Bijlage M Analyseresultaten vooronderzoek nitraat en nitriet.

Tabel 13:

Overzicht van de analyseresultaten van nitraat in mg/kg voor en na bewaring in de homogenaten en subsamples van de onderzochte cohorten.

Cohort	Rikilt-nummer	type monster	gehalte voor bewaring	gehalte na bewaring
amerika	7/4/2583	homogenaat	75	75
	7/4/2584	subsample 2	93	94
	7/4/2585	subsample 3	384	382
crevalcore	7/4/3029	homogenaat	31	31
	7/4/3030	subsample 2	135	132
	7/4/3031	subsample 3	198	220
montegiorgio	7/4/3032	homogenaat	84	86
	7/4/3033	subsample 2	511	509
	7/4/3034	subsample 3	239	236
rome	7/4/3035	homogenaat	70	70
	7/4/3036	subsample 2	150	144
	7/4/3037	subsample 3	557	532

Opmerking: het gehalte aan nitriet is voor alle monsters zowel voor als na bewaring kleiner dan 1 mg/kg