

Afdeling Levensmiddelenadditieven/Micronutrienten


1986-12-19

RAPPORT 86.114

Pr.nr. 505.0100

Onderwerp: Literatuuronderzoek naar HPLC-  
methoden voor de bepaling van  
vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>.

Verantwoordelijk: ir P. Hollman

Samensteller : ir P. Hollman 

Projectleider : ir P. Hollman

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, directie DLO, bibliotheek  
(2x), afdeling Levensmiddelenadditieven/Micronutrienten  
(4x), projektbeheer, projektleider, circulatie,  
AGRALIN.



<u>Inhoud</u>	<u>blz.</u>
1 INLEIDING	1
2 BEPALING VAN VITAMINE B <sub>1</sub>	1
2.1 Voorkomen van vitamine B <sub>1</sub> in levensmiddelen	1
2.2 Extraktie	2
2.2.1 Zure hydrolyse gevolgd door enzymatische hydrolyse	2
2.2.2 Diverse methoden	3
2.3 HPLC parameters	4
2.3.1 Detektie	5
2.3.2 Chromatografie	6
3 BEPALING VAN VITAMINE B <sub>2</sub>	8
3.1 Voorkomen van vitamine B <sub>2</sub> in levensmiddelen	8
3.2 Extraktie	9
3.2.1 Zure hydrolyse	9
3.2.2 Zure hydrolyse gevolgd door enzymatische hydrolyse	11
3.2.3 Diverse methoden.	12
3.3 HPLC parameters	14
3.3.1 Detektie	14
3.3.2 Chromatografie	15
4 SIMULTANE BEPALING VAN VITAMINE B <sub>1</sub> en B <sub>2</sub>	15
4.1 Extraktie	15
4.2 Chromatografie	18
5 CONCLUSIES	20
Literatuur	
Bijlagen	

## 1 INLEIDING

Analyses van vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> worden door de afdeling Additieven/Micronutriënten veelvuldig uitgevoerd in zeer diverse produkten. Dit stelt hoge eisen aan de selektiviteit van de gebruikte methoden. Onlangs werd dan ook HPLC geïntroduceerd voor de analyse van vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>. Op basis van een literatuuronderzoek werd toen gekozen voor een simultane bepaling van vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>.

Inmiddels is echter gebleken dat de enzymen die gebruikt worden voor de hydrolyse van de fosfaatesters niet meer verkrijgbaar zijn. De destijds geraadpleegde literatuur over de HPLC-technieken werd derhalve opnieuw bekeken, waarbij vooral aandacht werd besteed aan de extractie. Dit onderzoek werd aangevuld met een aantal publikaties over methodieken die geen gebruik maken van HPLC. In dit literatuur-overzicht wordt ingegaan op HPLC-technieken voor vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>, het accent zal liggen op de extractie procedures.

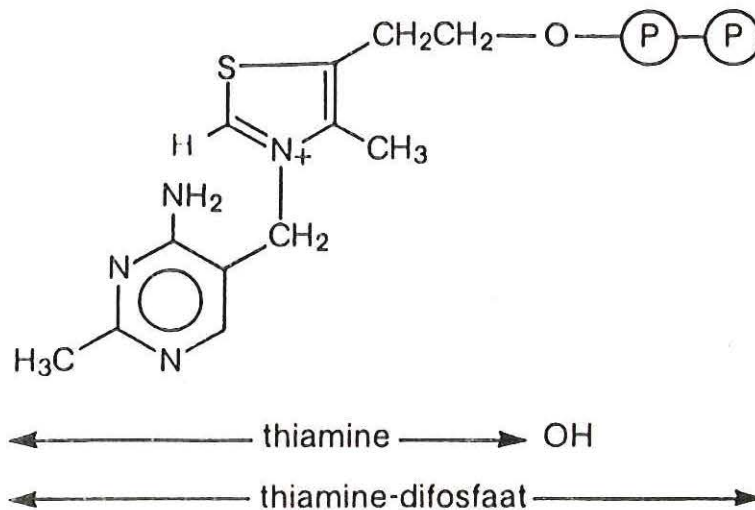
## 2 BEPALING VAN VITAMINE B<sub>1</sub>

### 2.1 Voorkomen vitamine B<sub>1</sub> in levensmiddelen

Vitamine B<sub>1</sub> bestaat uit een groep van verbindingen die opgebouwd zijn uit een pyrimidinering gekoppeld aan een gesubstitueerde thiazolring. Tot deze groep worden gerekend: thiamine (Th), thiaminemonofosfaat (TMP), thiaminedifosfaat (TDP) of thiaminepyrofosfaat en thiaminetri-fosfaat (TTP) (zie Fig. 1).

Belangrijke bronnen voor vitamine B<sub>1</sub> zijn granen, vlees en melkprodukten. In levensmiddelen komt vitamine B<sub>1</sub> voor als vrij thia-mine en in gefosforyleerde vorm. Daarnaast kan thiamine ook gebonden zijn aan eiwitten. Ayi (7) geeft voor koemelk de volgende cijfers: 50-70% vrij thiamine, 18-45% gefosforyleerd thiamine en 5-17% aan eiwit gebonden thiamine. Vanderslice (54) onderzocht brood, ham, varkensvlees en kip en vond de volgende verdeling, afhankelijk van het produkt: thiamine 80-100%; TMP 0%-4%, TDP 2%-16%.

Thiaminedisulfide kan ontstaan bij het drogen van produkten door een hittebehandeling (melkpoeder, aardappelmeel). Volgens the Assoc. of Vitamin Chem. (5) heeft thiaminedisulfide dezelfde vitamine-aktiviteit als thiamine.



Figuur 1. Structuur van thiamine en TDP

## 2.2 Extraktie

Voor de bepaling van het totale vitamine B<sub>1</sub> gehalte in levensmiddelen is het nodig de aan eiwitten gebonden vitameren d.m.v. een zure hydrolyse (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) vrij te maken. Voor een volledige hydrolyse van de fosfaatesters is vervolgens een enzymatische hydrolyse noodzakelijk. Als informatie nodig is over het voorkomen van de fosfaatesters dan blijft de enzymatische hydrolyse achterwege en wordt een aangepaste milde zure hydrolyse (TCA) uitgevoerd. Tabel 1 geeft een overzicht van de in de literatuur gebruikte extraktiemethoden.

### 2.2.1 Zure hydrolyse gevolgd door enzymatische hydrolyse

De Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (23) schrijft de volgende procedure voor. Het monster wordt gehydrolyseerd met 0,1 M HCl bij 95-100°C gedurende 30 minuten, of naar keuze gedurende 30 minuten in een autoclaaf bij 121-123°C. De fosfaatesters worden gedurende 3 uur bij 45-50°C en pH 4-4.5 gehydrolyseerd met een enzym dat diastatische en fosforylitische activiteit bezit (bijv. Clarase, Mylase P).



### Diverse levensmiddelen

Nobile (36) onderzoekt granen, vlees, vleesprodukten, melk en groenten en hydrolyseert in een autoclaaf bij 120°C gedurende 15 minuten met 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De pH van het extract moet < 1.2 omdat anders verliezen optreden. De enzymatische hydrolyse vindt plaats gedurende 20 minuten bij 45°C, met Clarase.

Rettenmaier (42) gebruikt dezelfde zure en enzymatische hydrolyse, echter met Clara-Diastase (Fluka) i.p.v. Clarase. Gekonstateerd wordt dat de hydrolysesnelheid van Clara-Diastase groter is, terwijl bovendien de blanco B<sub>1</sub> waarde lager is. Voor vlees, brood, aardappelen en melk wordt een gemiddelde recovery van 96.6% (84-102.7%) gevonden.

Edwin (17) hydrolyseert met 0.1 M HCl gedurende 15 minuten op een waterbad. De enzymatische hydrolyse wordt uitgevoerd met Clarase (Miles Lab.) bij kamertemperatuur gedurende 16 uur, of gedurende 3 uur bij 45°C. Voor lever (B<sub>1</sub>-gehalte 0.4 mg/100g) worden gemiddelde recoveries van 104% gevonden.

Soliman (48) past de AOAC extractie (23) toe en vergelijkt de AOAC handmethode (23) met een Auto Analyzer methode. Twintig verschillende producten, diverse graanprodukten, brood, melk, aardappel en vlees, (B<sub>1</sub>-gehalte 0.1-2 mg/100g) worden onderzocht. De gemiddelde recovery bedraagt 101.1 ± 10.5% (82-118%) voor de handmethode, 100.2 ± 5.3% (92.5-101%) voor de Auto Analyzer methode.

### 2.2.2 Diverse methoden

#### Levensmiddelen

Hilker (22) gebruikt voor de extractie van gevitamineerde graanprodukten (breakfast cereals, B<sub>1</sub>-gehalte 5mg/100g) alleen een autoclaaf extractie met 0.1 M HCl, bij 121°C gedurende 30 minuten. Het extract wordt vervolgens gecentrifugeerd en gezuiverd op een C18 kolommetje (Analytichem).

Voor een aantal soorten rijstebloem (B<sub>1</sub>-gehalte 0.2-1.1 mg/100g) gebruikt Ohta (37) alleen een enzymatische hydrolyse met Taka-Diastase (Sankyo) onder AOAC condities. Een vergelijking met de AOAC handmethode (23) geeft geen significante (P < 5%) verschillen. De recovery bedraagt 92-96%.

Ayi (7) extraheert zuigelingenvoeding ( $B_1$ -gehalte  $\pm 0.1$  mg/100g) met een vereenvoudigde procedure. Het poeder wordt opgelost in water, eiwitten worden verwijderd door een pH gradient ( $\rightarrow$  pH 1.7  $\rightarrow$  pH 4.6) en het extract wordt, na filtreren, gezuiverd en geconcentreerd ( $\times 10$ ) op een SCX-kolommetje (Analytichem). Een recovery van 100-102% wordt gerapporteerd. De methode wordt vergeleken met de AOAC-methode (23), waarbij vergelijkbare resultaten worden verkregen. Uit de getoonde chromatogrammen blijkt dat in dit soort produkten geen fosfaatesters voorkomen.

Vanderslice (54) bepaalt thiamine en de thiaminefosfaatesters in diverse levensmiddelen, zoals brood, varkens- en kippevlees en gevitaminede graanprodukten (totaal  $B_1$ -gehalte 0.04- 2 mg/100g).

Geëxtraheerd wordt met sulfosalicylzuur en hexaan. Het sulfosalicylzuur wordt vervolgens verwijderd met een anion-exchange kolom. Recovery's voor TDP, TMP en thiamine zijn resp. 61-111%, 81-120% en 82-108%.

#### Bloed, weefsel

Schrijver (46) en Wielders (57) bepalen totaal thiamine in bloed. De eiwitten worden verwijderd met trichloorazijnzuur (TCA) of perchloorzuur. De thiaminfosfaatesters worden enzymatisch gehydrolyseerd met Taka-Diastase (Serva) of acid phosphatase (EC 3.1.3.2, Sigma).

Wielders vergelijkt beide methoden en geeft de voorkeur aan de combinatie perchloorzuur-acid phosphatase, vanwege een "schoner chromatogram" en het ontbreken van  $B_1$  in het enzym. Taka-Diastase bevat  $\pm 0.01$  mg  $B_1$ /100 g.

Kimura (29) bepaalt de fosfaatesters in bloed en Bontemps (12) in lichaamsweefsels. Beiden gebruiken TCA voor het verwijderen van de eiwitten.

#### 2.3 HPLC parameters

Een overzicht van de HPLC-systemen die gebruikt worden bij de bepaling van thiamine en zijn derivaten wordt gegeven in tabel 2.

### 2.3.1 Detektie

Thiamine kan in alkalisch milieu geoxideerd worden tot het sterk fluorescerende thiochroom (Thc). De meeste toepassingen maken van deze eigenschap gebruik. Als oxidator wordt meestal  $K_3Fe(CN)_6$  en soms BrCN gebruikt. De thiochroomreactie wordt zowel pre-column als post-column uitgevoerd. Behalve thiamine worden ook de fosfaatesters omgezet in een thiochroom fosfaatester. Ishii (25) bepaalde het fluorescentie-spektrum van Thc, ThcMP, ThcDP en ThcTP bij pH 8,4 en vond voor alle vier verbindingen hetzelfde excitatie- en emissiespektrum, nl maxima bij 375 nm en 435 nm. De fluorescentie-intensiteit verschilt echter, Thc: ThcMP: ThcDP: ThcTP = 100: 65: 80: 85, bij 430 nm. De fluorescentie-intensiteit neemt toe met de pH en is stabiel boven pH 8. De oxidatie van thiamine tot het fluorescerende thiochroom uitgevoerd als post-columnreactie heeft als voordeel dat de reproduceerbaarheid van de thiaminebepaling toeneemt. Bovendien neemt de kans op artefacten af, omdat op de HPLC-kolom al een scheiding heeft plaatsgevonden. Wielders (57) onderzoekt de invloed van methanol op de thiochroomreactie en vindt een toenemende fluorescentie-intensiteit bij toenemende methanol (of ethanol)-concentraties. Het maximum ligt bij 50% methanol. Methanol kan het beste via het eluens toegevoegd worden, aangezien methanol de stabiliteit van het  $K_3Fe(CN)_6$  reagens vermindert. Voor het optimaal verlopen van de thiochroomreactie is een pH > 11 noodzakelijk. Tot slot merkt Wielders op dat thiochroom onder invloed van licht afgebroken wordt. Wehling (56) constateert dat een overmaat  $K_3Fe(CN)_6$  in het reaktiemengsel aanleiding geeft tot quenching van de thiochroom emissie. Dit wordt veroorzaakt door het feit dat de emissieband van thiochroom (444 nm) samenvalt met de absorptieband van ferricyanide. Tabel 3 geeft een overzicht van de reactiecondities waaruit blijkt dat deze zeer uiteenlopen. Naast fluorescentiedetektie wordt soms ook UV-detektie toegepast. Deze techniek is echter minder gevoelig en minder specifiek, maar heeft het voordeel dat derivatisering niet nodig is. Volgens Strohecker (51) is de UV-absorptie van thiamine sterk pH-afhankelijk. Bij pH 7 zijn er twee absorptiemaxima, nl. 232-233 nm ( $E 1\%/1cm = 345$ ) en 266 nm ( $E 1\%/1cm = 255$ ). Bij pH 2 is er een maximum bij 246 nm ( $E 1\%/1cm = 425$ ). Hilker (22) bepaalde het spektrum van thiamine en de fosfaatesters bij pH 2.85 en vond voor thiamine maxima bij 245 nm en 265 nm en voor TMP, TDP en TTP bij 248 nm.



### 2.3.2 Chromatografie

Voor de bepaling van totaal thiamine in de monsterextracten worden verschillende kolomtypen gebruikt. Schrijver (46) past nog een straight phase scheiding toe. Ohta (37) gebruikt een normale C<sub>18</sub> reversed phase kolom. Ayi (7) laat zien dat thiamine en de zg. anti-vitaminen oxythiamine en pyrithiamine gescheiden kunnen worden op een CN reversed phase kolom.

De selectieve bepaling van de thiamine fosfaatesters is vooral van belang voor de analyse van bloed en lichaamsweefsels. Kimura (28,29) gebruikt een reversed phase C<sub>18</sub> kolom, waarbij isocratisch thiamine en de fosfaatesters in de verwachte volgorde TTP, TDP, TMP en thiamine, geëluëerd worden met een fosfaatbuffer. Wielders (57) gebruikt een tegenion, nl. octaansulfonzuur. De elutievolgorde verandert hierdoor niet, maar de retentie wordt aanzienlijk verhoogd, waardoor 45% methanol aan de buffer toegevoegd moet worden. Hierdoor wordt bovendien de fluorescentie van het thiochroom, dat post-column gevormd wordt, met een faktor drie verhoogd. Hemming (21) gebruikt tetrabutylammoniumhydroxide als tegenion, de piekvorm is echter bijzonder slecht. Vanderslice (54) bepaalt thiamine en de fosfaatesters in levensmiddelen en gebruikt een reversed phase C<sub>18</sub> kolom met gradiëntelutie (pH-gradient). Panijpan (38) bepaalt een aantal produkten die kunnen ontstaan bij de afbraak en oxidatie van thiamine. Deze toepassing lijkt vooral van belang voor farmaceutische produkten (Ebel (15)). Op een diol kolom kunnen de volgende produkten isocratisch gescheiden worden: thiaminedisulfide, 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine, 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine, 4-methyl-5-(β-hydroxyethyl)-thiazol en thiochroom. Hilker (22) en Hemming (21) passen anionwisselingschromatografie toe en gebruiken beiden gradiëntelutie. Het elutiepatroon is thiamine, TMP, TDP en TTP. Kimura (27) gebruikt een onbekend type kolom. Gezien de elutievolgorde is dit waarschijnlijk ook een ionwisselingskolom. Er wordt isocratisch geëluëerd.

Pre-column omzetting van thiamine in thiochroom betekent dat op de HPLC-kolom thiochroom (Thc) gescheiden moet worden. Door deze omzetting verliest het thiamine zijn ionogeen karakter, terwijl bovendien de elutievloeistof een hoge pH (> 8) moet hebben i.v.m. de fluorescentie detektie. Sanemori (45) en Bontemps (12) passen voor de scheiding

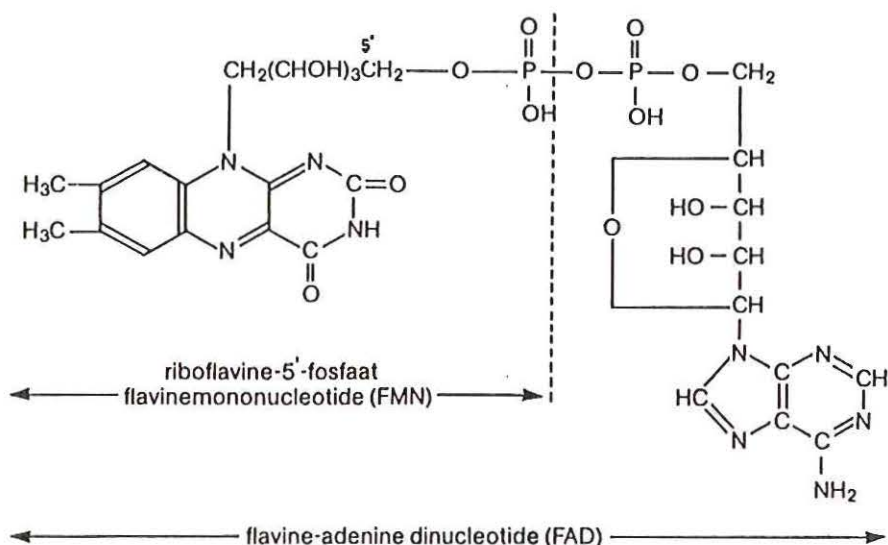
van ThcTP, ThcDP, ThMP en Thc (= elutievolgorde) een reversed phase C<sub>18</sub> kolom toe. Sanemori elueert met dimethylformamide/fosfaatbuffer. Voor de

elutie van thiochroom is echter een verhoging van de DMF concentratie nodig. Bontemps (12) gebruikt een gradiënt met een fosfaatbuffer en methanol. Ishii (25) gebruikt een reversed phase NH<sub>2</sub> kolom en elueert met fosfaatbuffer/acetonitril. Op deze meer polaire kolom is de elutievolgorde: Thc, ThcMP, ThcDP, ThcTP. Omdat de levensduur van de silicakolommen met gebonden fase ongunstig beïnvloed wordt door de hoge pH van het eluens, onderzocht Bontemps (11) de mogelijkheden van polystyreen kolommen. Scheiding van Thc, ThcMP en ThcDP blijkt goed mogelijk. Als probleem wordt genoemd dat de commercieel verkrijgbare polystyreen kolom (PRP-1) een laag en variabel schotelgetal heeft.

### 3 BEPALING VAN VITAMINE B<sub>2</sub>

#### 3.1 Voorkomen van vitamine B<sub>2</sub> in levensmiddelen

Vitamine B<sub>2</sub> is de verzamelnaam voor de volgende fluorescerende isoalloxazine derivaten: riboflavine (RF), flavinemononucleotide (FMN) en flavine-adenine-dinucleotide (FAD) (zie Fig 2).



Figuur 2 Riboflavine, FAD en FMN.

Belangrijke bronnen voor vitamine B<sub>2</sub> zijn: melk en zuivelprodukten, vlees, vis en bladgroenten. In levensmiddelen komt vitamine B<sub>2</sub> voornamelijk voor als FAD en FMN, die beide aan eiwitten gebonden zijn. Volgens Ichinose (24) en Speek (49) is FAD hierbij het meest voorkomende vitameer.

Onder invloed van licht wordt riboflavine makkelijk afgebroken. Afhankelijk van de pH ontstaat lumichroom (pH < 7) of lumiflavine (pH > 7) (Woodcock (60)). Tayosaki (53) vond dat in melk ± 25% van het oorspronkelijke riboflavine afgebroken kan zijn.



### 3.2 Extraktie

Voor een volledige extraktie van vitamine B<sub>2</sub> uit biologisch materiaal is het noodzakelijk dat FAD en FMN vrijgemaakt worden uit de eiwitten. Strohecker (51) geeft aan dat hiervoor een hydrolyse met verdund zuur (0.1 M HCl) voldoende is. Door deze zure hydrolyse wordt FAD geheel en FMN gedeeltelijk gehydrolyseerd. Door de zure hydrolyse wordt bovendien zetmeel geheel of gedeeltelijk afgebroken, wordt riboflavine gestabiliseerd en worden enzymen gedeactiveerd. Vaak volgt na deze stap een enzymatische hydrolyse waarbij FMN volledig omgezet wordt, terwijl bovendien nog ingesloten vitameren vrijgemaakt kunnen worden. Tabel 4 geeft een overzicht van de in de literatuur vermelde extraktiemethoden.

#### 3.2.1 Zure hydrolyse

Strohecker (51) beveelt in zijn handboek aan het monster te suspenderen in 0.1 M HCl en gedurende 1/2 - 1 uur te verhitten op een water- of stoombad. Voor eiwitrijke produkten als gist wordt aanbevolen de hydrolyseduur te verlengen tot max. 2 uur. Als alternatief voor het water- of stoombad wordt de autoclaaf aangegeven waarbij een hydrolyseduur van 1/2 uur voorgesteld wordt. De hoeveelheid 0.1 M HCl in ml moet hierbij ongeveer 10 maal zo groot zijn als het drogestofgewicht van het monster. De temperatuur of druk wordt niet vermeld. Door vervolgens de pH v.h. extrakt op 6.5 te brengen en vervolgens naar 4.5 worden storende bestanddelen (voornamelijk eiwitten) verwijderd. Voor zetmeelrijke produkten als meel en brood wordt een enzymatische hydrolyse met Diastase aanbevolen.

#### Diverse levensmiddelen

Door de Association of Official Analytical Chemists (AOAC) wordt een extraktieprocedure beschreven (23) die door vele onderzoekers als basis- of referentiemethode wordt beschouwd. De procedure is vergelijkbaar met de methode Strohecker (51), maar wordt nauwkeuriger omschreven. Zo wordt de temperatuur van de autoclaaf vastgelegd op 121-123°C en de hydrolysetijd op 30 minuten. De procedure voor het verwijderen van de eiwitten wordt eveneens gepreciseerd. Roy (44) voegt ureum toe bij de autoclaaf hydrolyse. Ureum zou effectief zijn



bij het afbreken en dispergeren van eiwitten. Bovendien wordt aan ureum een beschermende rol tegen de afbraak door UV-licht toegeschreven. De autoclaaf hydrolyse vindt plaats bij 121°C gedurende 30 minuten. Als zuur wordt 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gebruikt, met als uitzondering 1 M HCl voor een aantal vleesprodukten en 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> voor fruit. Hiervoor wordt geen verklaring gegeven. Recovery-studies worden gerapporteerd voor 24 produkten, nl. zuivelprodukten, vleesprodukten, granen, groenten, en fruit waarbij een gemiddelde recovery van 97.7% gevonden wordt (gemiddeld B<sub>2</sub> gehalte 0.27 mg/100g; range 0.02 - 1.7 mg/100 g; mediaan 0.08 mg/100g). Voor de 13 produkten hieruit met de laagste vitamine B<sub>2</sub> gehalten wordt een gemiddelde recovery van 93.8% gevonden (gemiddeld B<sub>2</sub> gehalte 0.04 mg/100 g, range 0.02-0.08 mg/100g; mediaan 0.05 mg/100g). Deze methode wordt vergeleken met de AOAC-methode (23), waaruit blijkt dat de AOAC-methode gemiddeld hogere gehalten (+ 10%) geeft. Opvalt dat bij fruitprodukten de toevoeging van ureum tot aanzienlijk hogere waarden leidt t.o.v. de AOAC-methode. Eenduidige conclusies kunnen niet getrokken worden omdat bij de vergelijking van de twee methodes behalve de extraktieprocedure ook de meetmethode verschilde. De invloed van specifieke fluorescentie kan hierdoor belangrijk geweest zijn.

Kirk (30) past de AOAC extraktieprocedure toe en vindt voor melk een gemiddelde recovery van 97%, voor granen vindt hij slechts 86% terug. Bij fruit en groenten gebruikt hij geen autoclaaf, maar verhit 30 minuten op een kokend waterbad waarbij recoveries < 85% worden gevonden. Voor gevitamineerde macaroni (gemiddeld B<sub>2</sub> gehalte: 0.6 mg/100g) past Woodcock (60) de AOAC autoclaaf extraktie toe. Na autoclaveren wordt echter gecentrifugeerd, waarna het residu nog tweemaal gewassen wordt met 0.1 M HCl. Recoveries van 99% met een variatie coëfficiënt (CV) van 2-4% worden gerapporteerd.

Rettenmaier (43) konstateert dat autoclaveren ongeschikt is voor de analyse van vitamine B<sub>2</sub> in moedermelk (B<sub>2</sub>-gehalte 0.02-0.09 mg/100 ml), omdat verliezen optreden. Gehydrolyseerd wordt met 15% TCA bij 80°C gedurende 90 minuten. De resultaten van deze methode zijn vergelijkbaar met een methode gebaseerd op enzymatische hydrolyse (zie hoofdstuk 3.2.3).

### 3.2.2 Zure hydrolyse gevolgd door enzymatische hydrolyse

Egberg (18) gebruikt de autoclaaf hydrolyse van de AOAC (23) en past vervolgens een enzymatische hydrolyse met Takadiastase toe. Een dertigtal verschillende produkten, waaronder veel graanprodukten (o.a. gevitamineerde ready-to-eat breakfast cereals) naast zuivel-, vleesprodukten en groenten werden onderzocht. Opvalt dat gekwantificeerd wordt aan de hand van standaarden die de hele procedure (autoclaaf + enzym. hydr.) hebben doorlopen. Een gemiddelde recovery van  $99.1\% \pm 5\%$  wordt gevonden (gemiddeld  $B_2$ -gehalte  $1.43 \text{ mg}/100\text{g}$ ; range  $0.11\text{--}4.7 \text{ mg}/100\text{g}$ ; mediaan  $0.86$ ). Voor 21 produkten met een laag  $B_2$ -gehalte vindt hij een gemiddelde recovery van  $101.1\% \pm 2.5\%$  (gemiddeld  $B_2$ -gehalte  $0.26 \text{ mg}/100\text{g}$ ; range  $0.05\text{--}0.57 \text{ mg}/100\text{g}$ ; mediaan  $0.26 \text{ mg}/100\text{g}$ ). De produkten werden ook onderzocht zonder enzymatische hydrolyse, waarbij significant ( $P < 1\%$ ) lagere gehalten werden gevonden. Egberg schrijft dit toe aan een efficiëntere extractie ten gevolge van de enzymatische hydrolyse. Waarschijnlijk speelt echter ook de omzetting van FMN naar RF een rol, waarbij de fluorescentie-intensiteit van RF ongeveer 20% hoger is dan van FMN (Speek (49)).

Lumley (33) past eveneens de autoclaaf extractie van de AOAC (23) toe en vervolgens een enzymatische hydrolyse met Takadiastase. Voor melk, ei, tarwebloem en een vleesprodukt ( $B_2$ -gehalte  $0.07\text{--}1.4 \text{ mg}/100\text{g}$ ) wordt een gemiddelde recovery van  $100 \pm 5\%$  gevonden. De methode wordt toegepast op 19 produkten (vleesprodukten, graanprodukten, zuivelprodukten en ei) en vergeleken met een microbiologische methode (*Streptococcus Zymogenes*). Er worden geen significante verschillen ( $P < 1\%$ ) aangetoond. Voor produkten met een hoog vetgehalte blijkt het noodzakelijk de enzymatische hydrolyseduur te verlengen. Aan de hand van de omzetting van FMN in RF, toegevoegd aan een vleesprodukt wordt de fosfatase-aktiviteit van verschillende merken Takadiastase onderzocht. Deze blijkt nogal te variëren. Tevens werd een ander enzym, "acid phosphatase" getest. Hiermee werden slechte resultaten verkregen. Watada (55) onderzocht de extractieprocedure voor een vijftal groenten met lage  $B_2$ -gehalten ( $0.04\text{--}0.16 \text{ mg}/100\text{g}$ ). De zure hydrolyse geschiedt met  $0.1 \text{ M HCl}$  op een waterbad ( $99^\circ\text{C}$ ) gedurende 30 minuten. Voor de enzymatische hydrolyse wordt Mylase gebruikt omdat Takadiastase niet meer verkrijgbaar was. De enzymatische hydrolyse vindt plaats bij



38°C, gedurende  $\pm$  14 uur. Nadere gegevens over het type Mylase ontbreken. Na de enzymatische hydrolyse worden eiwitten neergeslagen met TCA bij 60°C. Een gemiddelde recovery van 97.6% (95-100%) wordt gerapporteerd. Over de zure hydrolyse wordt opgemerkt dat de temperatuur van het waterbad kritisch is; bij een temperatuur van 80°C worden lagere B<sub>2</sub>-gehalten gevonden. Voor een volledige extractie van B<sub>2</sub> blijkt naast de zure hydrolyse de enzymatische hydrolyse noodzakelijk. De autoclaaf hydrolyse van de AOAC werd al minder geschikt beoordeeld, omdat bij monsters en standaarden een lagere detectorrespons (-16%) werd gevonden.

### 3.2.3 Diverse methoden

#### Zuivelprodukten

Rashid (40) onderzocht melk (halfvol, vol chocolademelk en melkpoeder) met een vereenvoudigde extractieprocedure, zonder autoclaaf. De melk wordt hierbij behandeld met aangezuurd loodacetaat, bij hogere vetgehalten wordt alcohol toegevoegd. Daarna wordt afgefiltreerd en kan direkt worden gemeten. Recoveries van 101%-108% worden gevonden, behalve voor melkpoeder waarbij slechts 91% wordt gevonden. Deze methode wordt voor halfvolle melk vergeleken met de AOAC-extractieprocedure, waarbij de AOAC-procedure lagere gehalten geeft.

Voor moedermelk (B<sub>2</sub>-gehalte 0.02-0.09 mg/100 ml) beschrijft Rettenmaier (43) een eenvoudige extractieprocedure, die alleen gebruik maakt van een enzymatische hydrolyse. Als enzym wordt Clara-Diastase (Fluka) gebruikt, de reactie wordt uitgevoerd bij 45°C, gedurende 90 minuten. Na centrifugeren kan gemeten worden. De recovery bepaald bij 29 monsters bedroeg gemiddeld 98.7% (95.8-100.8%).

Melk, yoghurt en kaas worden door Ashoor (3) waar nodig geëxtraheerd met 0.02 M acetaatbuffer en vervolgens gezuiverd en geconcentreerd (2-5x) op een Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge. De cartridge wordt geëluëerd met acetaatbuffer/methanol (1:1). Een gemiddelde recovery van 96.6% (94.1-100.7%) wordt gerapporteerd. De extraktiemethode wordt vergeleken met de AOAC-autoclaafextractie, waarbij dezelfde detektiemethode (HPLC-UV) wordt gebruikt. Geen significante verschillen (P < 1%) worden gevonden. Tot slot wordt de methode voor 8 verschillende zuivelprodukten vergeleken met de integrale AOAC-methode (23). Ook hier worden geen significante (P < 1%) verschillen gevonden. De conclusie

lijkt aldus gerechtvaardigd dat in deze zuivelprodukten FAD en FMN geen belangrijk aandeel hebben in het B<sub>2</sub> gehalte.

Stancher (50) onderzoekt 12 verschillende soorten italiaanse kaas (0.1-0.3 mg B<sub>2</sub>/100g) en gebruikt voor de extractie een mengsel van water, methanol en gec. azijnzuur (14:7:9). Recoveries van slechts 90% worden gevonden. Een vergelijking met meer gebruikelijke extractietechnieken werd niet uitgevoerd.

Een eenvoudige extractie met verdund azijnzuur (pH=3) voor melk wordt toegepast door Toyosaki (53) en Ashoor (2). Eiwitten worden verwijderd door centrifugeren. Ashoor gebruikt deze methode ook voor melkpoeder, kaas en yoghurt waarbij echter voorafgaande aan de extractie het monster gesuspenseerd wordt in water/methanol (2:1 of 1:1) (zie ook Stancher (50)). Ashoor rapporteert een gemiddelde recovery van 97.2% (range 91-109%). De recoveries voor melk komen overeen met hetgeen Toyosaki vindt (91-104%). Ashoor vergelijkt de voorgestelde methode met de AOAC-methode (23); de AOAC-methode geeft iets hogere resultaten. Ook hier verschilde de meetmethode, zodat geen conclusies voor de extraktietechniek te trekken zijn.

Ayi (8) bepaalt in gereconstitueerde zuigelingenvoeding rechtstreeks B<sub>2</sub>, na het verwijderen van eiwitten d.m.v. een pH-gradient en filteren. Recoveries > 97% worden gevonden.

#### Bloed en serum

Speek (49) beschrijft voor de specifieke bepaling van FAD in bloed (gemiddeld FAD gehalte 0.02 mg/100 ml) een methode waarbij alleen de eiwitten verwijderd worden door TCA en centrifugeren. Een gemiddelde recovery van 96% voor FAD werd gevonden.

Ichinose (24) beschrijft een extraktiemethode voor de specifieke bepaling van FAD, FMN en RF in serum van een drietal vissoorten (totaal B<sub>2</sub> gehalte  $\pm$  0.05 mg/100 ml). Geëxtraheerd wordt bij 0°C met TCA gedurende 30 minuten. Na toevoeging van een buffer en centrifugeren kan het extrakt geanalyseerd worden. Recovery-experimenten geven de volgende waarden: RF-96.9%; FMN-92.7%; FAD-91.8%. De TCA extractie wordt vergeleken met een autoclaaf extractie (0.1 M HCl, 121°C gedurende 1 uur), een enzymatische hydrolyse ( $\alpha$ -amylase + papaïne, pH 4-4.5, 42°-45°C, gedurende 4 uur) en de gecombineerde autoclaaf +



enzymatische hydrolyse. Bij een standaardmengsel FAD, FMN en RF blijkt dat bij alle extraktiesystemen FAD wordt omgezet in FMN of RF, bij de autoclaaf en de autoclaaf + enzymatische hydrolyse wordt FAD volledig omgezet, de enzymatische hydrolyse zet  $\pm$  30% FAD om, bij de TCA extractie wordt  $\pm$  10% gehydrolyseerd. Het enzymmengsel blijkt niet of nauwelijks in staat FMN te hydrolyseren. Bij de autoclaaf extractie wordt  $\pm$  25% FMN gehydrolyseerd.

### 3.3 HPLC parameters

Voor de scheiding van RF van de overige componenten in het monsterextract wordt algemeen reversed phase HPLC gebruikt. De keuze tussen UV- en fluorescentiedetectie is afhankelijk van de gewenste selectiviteit en detectiegrens. Tabel 5 geeft een overzicht van de in de literatuur vermelde HPLC-parameters.

#### 3.3.1 Detektie

Volgens Strohecker (51) heeft het spektrum van RF in neutraal tot zwak zuur milieu maxima bij de volgende golflengtes: 223, 267, 373 en 445 nm. Bij 267 nm is de extinktie het grootst ( $E\ 1\%/1\text{cm} = 850$ ), bij 445 nm bedraagt de specifieke extinktie  $E\ 1\%/1\text{cm} \pm 320$ . De fluorescentie-intensiteit blijkt afhankelijk van de pH en is maximaal tussen pH 6 en 7. Aangezien RF bij deze pH minder stabiel is, wordt meestal bij lagere pH gemeten. In het pH-traject van  $\pm 3-5$  is de fluorescentie-intensiteit onafhankelijk van de pH (Strohecker (51)). Speek (49) bepaalde het fluoroessentiespektrum van FAD, FMN en RF en vond voor alle vitameren een excitatiemaximum bij 470 nm en een emissie maximum bij 525 nm. Volgens Speek is de fluorescentie-intensiteit van RF en FMN konstant tussen pH 3.5 en pH 7.5, terwijl voor FAD de fluorescentie-intensiteit maximaal is tussen pH 2.7 en pH 3.1. Bij pH 2.9 is de verhouding van de fluorescentie-intensiteiten (470 nm/525 nm) als volgt RF: FMN: FAD = 100: 79: 56. Een indruk van het verschil in detectiegrens tussen UV-en fluorescentiedetectie bij HPLC-analyses geeft Rhys Williams (41): de detectiegrens bij fluorescentiedetectie (453 nm/520 nm) ligt een faktor 15 lager dan bij UV-detektie (266 nm).

### 3.3.2 Chromatografie

De scheiding blijkt weinig problemen te geven, C<sub>18</sub>-kolommen worden voornamelijk toegepast waarbij isocratische elutie met mengsels van buffers en methanol of acetonitril het gewenste resultaat geeft. Zelfs de scheiding tussen FMN, FAD en RF is met deze aanpak te realiseren (Speek (49)), Ashoor (2) voegt aan het eluens geconcentreerd azijnzuur toe, omdat hierdoor de detektorrespons toeneemt. Hij vindt hierin een aantal navolgers. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een verbeterd chromatografisch gedrag van RF.

Watada (55) verbetert de piekvorm van riboflavine door het ion-paar vormende heptaansulfonzuur aan het eluens toe te voegen.

Kondities voor de scheiding van afbraakprodukten van RF worden beschreven door Ayi (8), Toyosaki (53) en Woodcock (60).

## 4 SIMULTANE BEPALING VAN VITAMINE B<sub>1</sub> EN B<sub>2</sub>

De wettelijk geregelde voedingswaardedeklaratie voor levensmiddelen in de Verenigde Staten heeft het onderzoek naar efficiënte methoden voor de bepaling van vitamines versneld. Uit het voorgaande overzicht van extraktiemethoden voor vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>, blijkt dat beide vitamines op vergelijkbare wijze zijn te isoleren. Mede door de ontwikkeling van HPLC gedurende de afgelopen jaren is een simultane bepaling van beide vitamines nu mogelijk.

### 4.1 Extraktie

Een overzicht van de diverse extraktiemethoden wordt in tabel 6 gegeven.

#### Diverse levensmiddelen

Pelletier (39) onderzoek systematisch de optimale extraktie van B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> voor een groot aantal produkten. Zure hydrolyse met 0.1 M HCl gedurende 30 minuten in een autoclaaf bij 120°C voorafgaande aan de enzymatische hydrolyse, blijkt voor alle produkten, behalve fruit, noodzakelijk voor een volledige extraktie van zowel B<sub>1</sub> als B<sub>2</sub>. Voor vleesprodukten wordt 0.2 M HCl voorgeschreven. Bij graanprodukten blijkt dat hydrolyse met een hogere concentratie HCl dan 0.1 M verliezen geeft. De autoclaaf hydrolyse geeft bij fruitprodukten ver-

liezen aan B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> en kan dus beter achterwege blijven. De enzymatische hydrolyse wordt uitgevoerd met Clarase, gedurende 20 uur bij 40°C. De standaarden doorlopen de gehele procedure. Bij een aantal fruitprodukten (appel, banaan) treden verliezen op door adsorbtie

van B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> aan de onoplosbare bestanddelen na de enzymatische hydrolyse. Verhitten met ethyleenglycol monomethylether gedurende 10 minuten bij 95°C is hiervoor de oplossing. Bij produkten die door een hittebehandeling gedroogd zijn, zoals melkpoeder en aardappelmeel, blijkt toevoeging van cysteine voorafgaande aan de autoclaaf hydrolyse, hogere B<sub>1</sub> gehalten te geven. Waarschijnlijk wordt hierdoor het thiamine disulfide, ontstaan door het verhittingsproces, gereduceerd tot thiamine. Recovery-experimenten met TPP en FAD geven in de onderzochte produkten voor B<sub>1</sub> resp. B<sub>2</sub> de volgende waarden: vlees- en zuivelprodukten 93-103%, 91-107%; granen en graanprodukten 94-102%, 99-103%; groenten 93-102%, 96-105%; fruit 88-102%, 92-109%.

Edijala (16) onderzocht de extractie van B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> uit een peulvrucht (Cowpea: B<sub>1</sub> 0.8 mg/100g, B<sub>2</sub> 0.3 mg/100g) en komt tot de conclusie dat een enzymatische hydrolyse zonder meer voldoende is. Clarase en Diastase worden vergeleken, waarbij Clarase voor B<sub>2</sub> beter voldoet vanwege het lagere endogene B<sub>2</sub> gehalte.

Mylase 100 (United States Biochemical Corp.), een alternatief voor Clarase Takadiastase en Mylase P die niet langer meer verkrijgbaar zijn, wordt door MacBride (34) onderzocht. Na autoclavieren (0.1 M HCl extract pH 1-1,2; 30 minuten 121°C) wordt de enzymatische hydrolyse bij 35-37°C gedurende 3-4 uur uitgevoerd. Voor een aantal vleesprodukten wordt de invloed van de enzymatische hydrolyse bekeken, waarbij blijkt dat na enzymatische hydrolyse voor zowel vitamine B<sub>1</sub> als B<sub>2</sub> hogere waarden worden gevonden.

Wimalasiri (59) past voor de bepaling van B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> in diverse produkten de AOAC extraktiemethode voor B<sub>1</sub> (23) toe. Hoewel bij de HPLC analyse fluorescentie wordt gebruikt, blijkt voor de volgende produkten clean-up van de monsterextrakten noodzakelijk: muesli, "breakfast cereals", verse groenten en fruit, fruityoghurt, salami, ham en leverworst. Clean-up wordt uitgevoerd met een C<sub>18</sub> Sep-Pak, waarbij tevens geconcentreerd (tot 10x) kan worden. Zonder clean-up worden geanalyseerd: zuivelprodukten en rauw vlees. De recoveries voor alle produkten zijn groter dan 97%.



Peulvruchten, magere melkpoeder, tarwebloem en gevitamineerde tarwebloem ( $B_1$  0.4-1.3 mg/100g;  $B_2$  0.2-7.4 mg/100g) worden door Fellman (20) na autoclaveren met 0.3 M HCl gedurende 15 minuten bij 121°C enzymatisch gehydrolyseerd met Taka-Diastase. De eiwitten worden vervolgens verwijderd door 15 minuten te koken met 50% TCA op een stoombad. In het extract wordt vervolgens thiamine geoxideerd tot thiochroom waarna geconcentreerd en gezuiverd wordt op Sep-Pak  $C_{18}$ . Recovery's bedragen voor  $B_1$  gemiddeld 100.4% (94.5-110.2%), voor  $B_2$  97.2% (85.6-104.0%). Vergelijken met de AOAC handmethode (23) worden voor  $B_1$  met de HPLC-methode significant ( $P < 1\%$ ) lagere ( $\pm 10\%$ ) waarden gevonden, voor  $B_2$  is er geen significant verschil.

De extractie procedure van Nobile (36), autoclaaf hydrolyse met 0.1 M  $H_2SO_4$  en enzymatische hydrolyse met Clarase, wordt door Skurray (47) toegepast voor de analyse van  $B_1$  en  $B_2$  in melk, yoghurt, spiervlees, brood en gevitamineerde cornflakes ( $B_1$  0,025-1,1 mg/100g;  $B_2$  0.11-2.4 mg/100g). Ten opzichte van de AOAC-handmethode (23) zijn de HPLC-cijfers enigszins lager, het verschil is echter niet significant ( $P < 5\%$ ).

Bognár (9) onderzocht diverse levensmiddelen ( $B_1$  0.05-0.8 mg/100g;  $B_2$  0.02-0.3 mg/100g) en gebruikt een autoclaaf extractie met 0.1 M  $H_2SO_4$  gedurende 15 minuten bij 120°C. Clara-Diastase (Fluka) wordt gebruikt voor de enzymatische hydrolyse. Gekwantificeerd wordt aan de hand van een standaardmengsel  $B_1$ ,  $B_2$  dat de gehele procedure heeft doorlopen. Het monsterextract wordt gesplitst voor de analyse van  $B_1$  en  $B_2$  afzonderlijk. Recovery's zijn voor  $B_1$  94-105%, voor  $B_2$  98-103%. Aardappel, rauw en gekookt, wordt door Finglas (19) geëxtraheerd met 0.1 M HCl door gedurende 30 minuten te refluxen. Takadiastase wordt voor de enzymatische hydrolyse gebruikt. Recovery's voor  $B_1$  en  $B_2$  zijn resp. 95.2% en 94.3%. De recovery-experimenten voor  $B_2$  werden uitgevoerd in het extract waarin de pre-column oxidatie van  $B_1$ ---> thiochroom uitgevoerd werd. Uit een vergelijking met de AOAC handmethode (23) blijkt dat de HPLC methode voor  $B_1$  enigszins hogere en voor  $B_2$  enigszins lagere waarden geeft. Vleesprodukten ( $B_1$  0.09-0.5 mg/100g,  $B_2$  0.1-0.2 mg/100g) worden door Ang (1) onderzocht. Een autoclaaf en enzymatische hydrolyse (Takadiastase en Papaïne) worden toegepast. Eiwitten worden vervolgens door verhitten met TCA verwijderd. Recoveries bedragen voor  $B_1$  84-94%, voor  $B_2$  88-100%.



#### Graanprodukten (gevitamineerd)

Dunbar (14) extraheert graanprodukten en zuigelingenvoeding ( $B_1$ -gehalte 0.07-0.8 mg/100g;  $B_2$ -gehalte 0.08-1.6 mg/100g) met 0.1 M HCl gedurende 30 minuten op een kokend waterbad. Een enzymatische hydrolyse (enzym onbekend) wordt vervolgens gedurende 15 uur bij 38°C uitgevoerd. Recovery's zijn voor  $B_1$  102-104%, voor  $B_2$  100-106%.

Kamman (26) bepaalt  $B_1$  en  $B_2$  in gevitamineerde graanprodukten ( $B_1$  0.7-20 mg/100g, mediaan  $\pm$  1 mg/100g;  $B_2$  0.2-20 mg/100g, mediaan  $\pm$  1 mg/100g). Er wordt alleen een autoclaaf hydrolyse toegepast. Vergelijking van deze methode met een geautomatiseerde methode (Egberg (18)) waarbij wel een enzymatische hydrolyse wordt toegepast geeft geen significante ( $P < 5\%$ ) verschillen.

Gevitamineerde graanprodukten ( $B_1$  0.8-7 mg/100g;  $B_2$  1-7 mg/100g) worden door Wehling (56) gedurende 30 minuten op een kokend waterbad met 0.05 M  $H_2SO_4$  geëxtraheerd, waarna enzymatisch gehydrolyseerd wordt gedurende 60 minuten bij 55°C met Clarase (Miles Lab.). De recovery's voor  $B_1$  en  $B_2$  bedragen resp. 92% en 91%. Om voor deze lage recovery's te corrigeren wordt het extract van een standaard monster, waaraan bekende hoeveelheden  $B_1$  en  $B_2$  zijn toegevoegd, als standaard gebruikt.

Mauro (35) extraheert gevitamineerde graanprodukten gedurende 10 minuten met 0.05 M  $H_2SO_4$  op een kokend waterbad. Voor de enzymatische hydrolyse wordt Mylase-P gebruikt.

Toma (52) beschrijft een methode voor rijst en rijstprodukten ( $B_1$  0.3-0.5 mg/100g;  $B_2$  0.1-0.25 mg/100g). De zure hydrolyse vindt plaats gedurende 30 minuten bij 121°C met 0.05 M  $H_2SO_4$ . Voor de enzymatische hydrolyse wordt Takadiastase en Papaïne gebruikt. Voor  $B_1$  wordt een recovery van 92% gevonden, voor  $B_2$  97%.

#### 4.2 Chromatografie

Bij de simultane bepaling van thiamine en riboflavine worden de diverse fosfaatesters vooraf gehydrolyseerd, hetgeen de chromatografie vereenvoudigt. Voor de bepaling van thiamine wordt zowel pre- als post-column het thiochroom gevormd. Een onderzoeker bepaalt riboflavine na omzetting in lumiflavine. Een overzicht van de toegepaste methodes wordt gegeven in tabel 7.

### Thiamine en riboflavine

De mogelijkheden van reversed phase  $C_{18}$  kolommen voor de scheiding van wateroplosbare vitamines werden voor het eerst door Wills (58) aangegeven. Gezien het grote verschil in ionogeen karakter tussen thiamine en riboflavine, ligt het gebruik van een tegenion voor de hand.

Isocratische elutie blijkt mogelijk met gebruik van heptaan-, hexaan-, of pentaansulfonzuur en een  $C_{18}$  kolom, Wimalasiri (59), Mauro (35), Lam (32), Wehling (56) en Toma (52). Lam en Toma gebruiken UV-detektie omdat de te bepalen gehalten in de produkten die zij onderzochten vrij hoog zijn. De overigen maken gebruik van fluorescentiedetektie, waarbij thiamine post-column gederivatiseerd wordt tot thiochroom.

Thiochroom en riboflavine worden met twee in serie geschakelde fluorescentiedetektoren bepaald. Voor meer details over de thiochroomreactie wordt verwezen naar hoofdstuk 2.3.1.

### Thiochroom en riboflavine

Van een echte simultane bepaling aan thiamine en riboflavine kan bij Ang (1) en Bognár (9) nog niet gesproken worden. Beiden gaan uit van één monsterextract dat vervolgens in tweeën wordt gesplitst voor de bepaling van de afzonderlijke vitamines. Bognár bepaalt riboflavine op een  $NH_2$  kolom, thiamine wordt pre-column gederivatiseerd en het thiochroom, geëxtraheerd in isobutanol, geïnjecteerd op een reversed phase  $C_8$  kolom. Ook Ang injecteert het isobutanol extract, maar nu op een straight phase silica kolom. Dezelfde kolom wordt met hetzelfde eluens gebruikt voor de bepaling van riboflavine dat pre-column omgezet wordt in lumiflavine en geëxtraheerd wordt in chloroform. Ook Finglas (19) moet twee afzonderlijke injecties doen. Hoewel een scheiding van thiochroom en riboflavine mogelijk blijkt op een reversed phase  $C_{18}$  kolom is de verhouding riboflavine/thiamine in de onderzochte monsters te ongunstig om bij één golflengtepaar te kunnen meten. Skurray (47) bepaalt thiochroom en riboflavine simultaan en gebruikt slechts één detector die optimaal ingesteld is voor thiochroom. Augustin (6) gebruikt twee detectoren voor de simultane bepaling. Tetrabutylammoniumfosfaat wordt hier gebruikt om bepaalde interferenties te scheiden van thiochroom en riboflavine.

## 5. CONCLUSIES

De meest algemeen toegepaste extraktiemethode voor vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> bestaat uit een zure hydrolyse gevolgd door een enzymatische hydrolyse van de fosfaatesters, waardoor bovendien nog ingesloten B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> vrijgemaakt wordt. Een aantal varianten op deze methode worden in de literatuur beschreven. Duidelijk is in ieder geval dat deze extraktiemethode niet voor alle produkten zonder meer geschikt is. Voor een aantal produkten zoals melk en gevitamineerde graanprodukten worden diverse vereenvoudigde extraktieprocedures beschreven. De in de literatuur gerapporteerde verliezen van riboflavine tijdens de extractie komen in een aantal gevallen niet met elkaar overeen. Er is bovendien nog weinig aandacht besteed aan de analyse van levensmiddelen met lage vitaminegehaltenes.

Een probleem is de verkrijgbaarheid van de geschikte enzymen. Een aantal van de beschreven procedures is hierdoor niet meer uitvoerbaar. Een definitieve oplossing is alleen mogelijk door af te zien van de hydrolyse van de fosfaatesters en deze selectief te bepalen. Chromatografisch gezien lijkt dit wel mogelijk, al zijn tot op heden alleen toepassingen beschreven voor bloed en lichaamsweefsel.

Simultane meting van thiamine en riboflavine in de monsterextrakten is met HPLC mogelijk. Hierbij is fluorescentiedetectie vanwege de selectiviteit en gevoeligheid te verkiezen. Voor thiamine verdient een post-column reactie de voorkeur. De in de literatuur gerapporteerde parameters voor deze reactie vertonen grote verschillen. Bij simultane bepaling van thiamine en riboflavine is het zeker bij niet-gevitamineerde produkten meestal noodzakelijk te beschikken over twee fluorescentiedetectoren in serie, omdat de optimale golflengtes voor thiochroom en riboflavine aanzienlijk verschillen. Bovendien wordt riboflavine snel afgebroken tijdens de oxidatie van thiamine. Het gebruik van een fluorescentiedetektor met tijdsafhankelijk programmeerbare excitatie- en emissiegolflengtes zal daarom voor de meeste toepassingen niet voldoen.



LITERATUUR

1. Ang, C.Y.W., Moseley, F.A. Determination of Thiamin and Riboflavin in Meat and Meat Products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 28 (3), 483 (1980).
2. Ashoor, S.H., Seperich, G.J., Monte, W.C., Welty, J. HPLC Determination of Riboflavin in Eggs and Dairy Products. *J. Food Sci.* 48, 92 (1983).
3. Ashoor, S.H., Knox, M.J., Olsen, J.R., Deger, D.A. Improved Liquid Chromatographic Determination of Riboflavin in Milk and Dairy Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (4), 963 (1985).
4. Assenza, S.P., Brown, P.R. Comparison of High-Performance Liquid Chromatographic Serum Profiles of Humans and Dogs. *J. Chromatogr.* 181, 169 (1980).
5. The Association of Vitamin Chemists, Inc. *Methods of Vitamin Assay*. Third edition. New York, etc., John Wiley and Sons 1966, blz. 123-168.
6. Augustin, J. Simultaneous Determination of Thiamine and Riboflavin in Foods by Liquid Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (5), 1012 (1984).
7. Ayi, B.K., Yuhas, D.A., Moffett, K.S., Joyce, D.M., Deangelis, N.J. Liquid Chromatographic Determination of Thiamine in Infant Formula Products by Using Ultraviolet Detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (6), 1087 (1985).
8. Ayi, B.K., Yuhas, D.A., Deangelis, N.J. Simultaneous Determination of Vitamins B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in Infant Formula Products by Reverse Phase Liquid Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69 (1), 56 (1986).
9. Bognár, A. Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 77, 431 (1981).
10. Bontemps, J., Bettendorff, L., Dandrifosse, G., Schoffeniels, E., Nevejans, F. Sensitization of Thiamin Analysis by the Peak Compression Technique. *J. High Res. Chromatogr.* 7, 490 (1984).
11. Bontemps, J., Bettendorff, L., Lombet, J., Dandrifosse, G., Schoffeniels, E., Nevejans, F. Determination of Thiamine and Thiamine Phosphates as Thiochrome Derivatives by Reversed-Phase Chromatography on Polystyrene Packing Materials. *Chromatographia* 18 (8), 424 (1984).

12. Bontemps, J., Philippe, P., Bettendorff, L. Lombet, J., Dandrifosse, G. Schoffeniels, E., Crommen, J. Determination of Thiamine and Thiamine Phosphates in Excitable Tissues as Thiochrome Derivatives by Reversed Phase HPLC. *J. Chromatogr.* 307, 283 (1984).
13. Dix Smith, M. Rapid Method for Determination of Riboflavin in Urine by HPLC. *J. Chromatogr.* 182, 285 (1980).
14. Dunbar, W.E., Stevenson, K.E. Automated Fluorometric Determination of Thiamine and Riboflavin in Infant Formulas. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62 (3), 642 (1979).
15. Ebel, S., Herboth, M., Werner-Busse, A. Stabilitätsanalytik von Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) mit Hilfe chromatografischer Methoden. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 320, 724 (1985).
16. Edijala, J.K. Modified Fluorimetric Procedure for the Simultaneous Determination of Thiamin and Riboflavin in Cowpea. *Analyst* 104, 637 (1979).
17. Edwin, E.E., Jackman, R., Hebert, N. An Improved Procedure for the Determination of Thiamine. *Analyst*, 100, 689 (1975).
18. Egberg, D.C., Potter R.H. An Improved Automated Determination of Riboflavin in Food Products. *J. Agric Food Chem.* 23 (4), 815 (1975).
19. Finglas, P.M., Faulks, R.M. The HPLC Analysis of Thiamin and Riboflavin in Potatoes. *Food Chem.* 15, 37 (1984).
20. Fellman, J.K., Artz, W.E., Tassinari, P.D., Cole, C.L., Augustin, J. Simultaneous Determination of Thiamin and Riboflavin in Selected Foods by HPLC. *J. Food Sci.* 47, 2048 (1982).
21. Hemming, B., Gubler, C.J. Separation of Thiamin, Thiamin Antagonists and their Phosphate Esters by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* 3 (11), 1697 (1980).
22. Hilker, D.M., Clifford, A.J. Thiamin Analysis and Separation of Thiamin Phosphate Esters by HPLC. *J. Chromatogr.* 231, 433 (1982).
23. Horwitz, W. (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th edition Washington, AOAC, 1980. bez. 740-743.
24. Ichinose, N. Adachi, K. Determination of B<sub>2</sub> Vitamers in Serum of Fish Using HPLC with fluorescence Detection. *Analyst* 110, 1505 (1985).

25. Ishii, K. Sarai, K. Sanemori, H. Kawasaki, T. Analysis of Thiamine and its Phosphate Esters by HPLC. *Anal. Biochem.* 97, 191 (1979).
26. Kamman, J.F. Labuza, T.P., Warthesen, J.J. Thiamin and riboflavin analysis by HPLC. *J. Food Sci.* 45, 1497 (1980).
27. Kimura, M., Fujita, T., Nishida, S., Itokawa, Y. Differential Fluorimetric Determination of Picogram Levels of Thiamine, Thiamine Monophosphate, Diphosphate and Triphosphate using HPLC. *J. Chromatogr.* 188, 417 (1980).
28. Kimura, M., Panijsan, B., Itokawa, Y. "Separation and Determination of Thiamin and its Phosphate Esters by Reversed-Phase HPLC. *J. Chromatogr.* 245, 141 (1982).
29. Kimura, M. Itokawa, Y. Determination of Thiamine and its Phosphate Esters in Human and Rat Blood by HPLC with Post-column Derivatization. *J. Chromatogr.* 332, 181 (1985).
30. Kirk, J.R. Automated Method for the Analysis of Riboflavin in Milk, with Application to Other Selected Foods. *J.A.O.A.C.* 57 (5), 1085 (1974).
31. Kothari. R.M., Taylor, M.W. Simultaneous separation of water-soluble vitamins and coenzymes by reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr.* 247, 187 (1982).
32. Lam, F.L., Holcomb, I.J., Fusari, S.A. Liquid Chromatograph Assay of Ascorbic acid, Niacinamide, Pyridoxine, Thiamine and Riboflavin in Multivitamin-Mineral Preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (5), 1007 (1984).
33. Lumley, I.D., Wiggins, R.A. Determination of Riboflavin and Flavin Mononucleotide in Foodstuffs Using HPLC and a Column-enrichment Technique. *Analyst.* 106, 1103 (1981).
34. MacBride, D.E., Wyatt, C.J. Evaluation of a Modified AOAC Determination for Thiamin and Riboflavin in Foods. *J. Food Sci.* 48, 748 (1983).
35. Mauro, D.J., Wetzal, D.L. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using selective detection. *J. Chromatogr.* 299, 281 (1984).
36. Nobile, S., Savage, V., Huber, U. A New Procedure for the Determination of Thiamine in Foods. *Intern. J. Vit. Nutr. Res.* 42, 444 (1972).



37. Ohta, H., Baba, T., Suzuki, Y., Okada, E. HPLC Analysis of Thiamine in Rice Flour with Fluorimetric Post-Column Derivatization. *J. Chromatogr.* 284, 281 (1984).
38. Panijpan, B., Kimura, M., Itokawa, Y. Separation of Thiamin and its Common Degradation and Oxidation Products by HPLC. *J. Chromatogr.* 245, 144 (1982).
39. Pelletier, O., Madère, R. Automated Determination of Thiamine and Riboflavin in Various Foods. *JAOAC.* 60 (1), 140 (1977).
40. Rashid, I., Potts, D. Riboflavin Determination in Milk. *J. Food Sci.* 45, 744 (1980).
41. Rhys Williams, A.T., Slavin, W. Determination of Riboflavin in Milk and Riboflavin Clearance into Urine Using HPLC with Fluorescence Detection. *Chromatogr. Newslett.* 5 (1), 9 (1977).
42. Rettenmaier, R., Vuilleumier, J.P., Müller-Mulot, W. Zur quantitativen Vitamin-B<sub>1</sub>-Bestimmung in Nahrungsmitteln und biologischem Material. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168, 120 (1979).
43. Rettenmaier, R., Vuilleumier, J.P. A Simple Method for the Determination of Riboflavin in Human Milk. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 53, 32 (1983).
44. Roy, R.B., Salpeter, J. Evaluation of Urea-Acid System as a Medium of Extraction for B-Group Vitamins. *J. Food Sci.* 41, 996 (1976).
45. Sanemori, H., Uekis H., Kawasaki, T. Reversed-Phase HPLC Analysis of Thiamine Phosphate Esters at Subpicomole Levels. *Anal. Biochem.* 107, 451 (1980).
46. Schrijver, J., Speek, A. Klosse, J.A., Van Rijn, H.J.M., Schreurs, W.H.P. A Reliable Semi Automated Method for the Determination of Total Thiamine in Whole Blood by the Thiochrome Method with HPLC. *Am. Clin. Biochem.* 19, 52 (1982).
47. Skurray, G.R. A Rapid Method for Selectively Determination Small Amounts of Niacin, Riboflavin and Thiamine in Foods. *Food Chem.* 7, 77 (1981).
48. Soliman, A. Comparison of Manual and Benzenesulfonyl Chloride-Semiautomated Thiochrome Methods for Determination of Thiamine in Foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64 (3), 616 (1981).
49. Speek, A.J., Van Schaik, F., Schrijver, J. Schreurs, W.H.P. Determination of the B<sub>2</sub> vitamer FAD in whole blood by HPLC with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* 228, 311 (1982).

50. Stancher, B., Zonta, F. HPLC Analysis of Riboflavin with Visible Absorbance Detection in Italian Cheese. *J. Food Sci* 51 (3), 857 (1986).
51. Strohecker, R., Henning, H.M. Vitamin-Bestimmungen. Weinheim, Verlag Chemie GmbH, 1963. Blz. 68-126.
52. Toma, R.B., Tabekhia, M.M. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of B-Vitamins in Rice and Rice Products. *J. Food. Sci* 44 (1), 263 (1979).
53. Toyosaki, T., Yamamoto, A., Mineshita, T. Simultaneous Analysis of Riboflavin and its Decomposition Products in various Milks by HPLC. *J. Micronutr. Anal.* 2, 117 (1986).
54. Vanderslice, J.T., Huang, M.A. Liquid Chromatographic Analyzis of Thiamin and its Phosphates in Food Products Using Amprolium as an Internal Standard. *J. Micronutr. Anal.* 2. 189 (1986).
55. Watada, A.E., Tran, T.T. A Sensitive HPLC Method for Analyzing Riboflavin in Fresh Fruits and Vegetables. *J. Liq. Chromatogr.* 8 (9), 1651 (1985).
56. Wehling, R.L., Wetzal, D.L. Simultaneous Determination of Pyridoxine, Riboflavin, and Thiamin in Fortified Cereal Products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1326 (1984).
57. Wielders, J.P.M., Mink, C.J.K. Quantitative Analysis of Total Thiamine in Human Blood, Milk and Cerebrospinal Fluid by Reversed-Phase-Ion-Pair HPLC. *J. Chromatogr.* 277, 145 (1983).
58. Wills, R.B.H., Shaw, C.G., Day W.R. Analysis of Water Soluble Vitamins by HPLC. *J. Chromatogr. Sci.* 15, 262 (1977).
59. Wimalasiri, P., Wills, R.B.H. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. *J. Chromatogr.* 318, 412 (1985).
60. Woodcock, E.A., Warthesen, J.J., Labuza, T.P. Riboflavin Photochemical Degradation in Pasta Measured by HPLC. *J. Food. Sci* 47, 545 (1982).

Tabel 1. Overzicht van extraktiemethoden voor vitamine B1

Produkt	Procedure	Meetmethode	Referentie
Diverse produkten	0.1 M HCl, 30 min. 121-123°C, of 30 min. 95°-100°C <u>Clarase</u> of <u>Mylase P</u> , 3 uur 45-50°C, pH 4-4.5	Fluorimetrisch	23
Granen, vlees, vleesprodukten, melk, groenten	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 15 min., 120°C (pH < 1,2) <u>Clarase</u> , 20 min. 45°C, pH 4.5 <u>opm.:</u> als pH > 1.2, dan verliezen B1	Fluorimetrisch	36
Vlees, brood, aard- appel en melk	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 15 min. 120°C <u>Clara-Diastase</u> , 20 min. 45°C, pH 4-4.5	Fluorimetrisch	42
Lever	0.1 M HCl, 15 min. 100°C <u>Clarase</u> , 3 uur 45°C, of 16 uur kamertemp., pH 4.5	Fluorimetrisch	17
Diverse graanprodukten, brood, melk, aardappel, vlees	0.1 M HCl, 30 min. 95°-100°C <u>Clarase</u> of <u>Mylase P</u> , 3 uur 45-50°C, pH 4-4.5	Fluorimetrisch	48
Gevitamineerde graan- produkten	0.1 M HCl, 30 min. 121°C <u>clean-up:</u> C <sub>18</sub> kolommetje (Analytichem)	HPLC/UV	22
Diverse soorten rijstbloem	<u>Takadiastase</u> , 3 uur 45-50°C, pH 4-4.5	HPLC/Fluoresc.	37



Vervolg tabel 1.

Produkt	Procedure	Meetmethode	Referentie
Zuigelingenvoeding	poeder oplossen in water <u>clean-up</u> : met SCX-kolommetje (Analyti- chem)	HPLC/UV	7
Gevitamineerde graan- produkten, brood, varkensvlees, kippe- vlees	extraktie met sulfosalicylzuur/hexaan <u>clean-up</u> : anion-exchange kolom	HPLC/Fluoresc.	54
Bloed	eiwitten precipiteren met TCA <u>Takadiastase</u> , 2 uur 45°C, pH 4,5	HPLC/Fluoresc.	46
Bloed, lichaamsweefsel	eiwitten precipiteren met HClO <sub>4</sub> 0°C <u>acid phosphatase (EC 3.1.3.2)</u> , 16 uur 37°C, pH 5.2	HPLC/Fluoresc.	57
Bloed	eiwitten precipiteren met TCA	HPLC/Fluoresc.	29
Lichaamsweefsel	eiwitten precipiteren met TCA 0°C <u>clean-up</u> : extraheren met diethylether	HPLC/Fluoresc.	12

Tabel 2. Overzicht van HPLC-parameters voor de bepaling van vitamine B1.  
(T=thiamine; TMP=thiaminemonofosfaat; TDP=thiaminedifosfaat;  
TTP=thiaminetrifosfaat; Thc=thiochroom; OT=oxythiamine)

Produkt	Komponenten	Kolom	Eluens	Dektektie	Referentie
Gevitamineerde graanprodukten	TDS, T, TMP TDP, TTP	Weak Anion Exchange, Micro-Pak AX-5	0.005 M NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2.85, temp. 30°C	UV: 245 nm	22
--	T, TMP, TDP, TTP	Shimadzu ISA-07/S2504	0.7 M NaAc temp. 35°C	Fluoresc.: 375/435 nm postcolumn	27
--	T, TMP, TDP, TTP OT, OTMP, OTDP, OTTP	Vydac Strong Anion Exchange	gradiënt: lineair 0% B → 70% B (5% B/min.) A=0.001 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH6) B=0.5 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH6)	Fluoresc.: 360/436 nm postcolumn	21
	T, OT	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/1% azijnzuur, 0.001 M heptaansulfonzuur(1:3)	UV 280 nm	
Bloed	Thiamine	Lichrosorb SI-100, 10 μm	ethanol/0.04 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.03 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.8 (13:87)	Fluoresc.: 367/430 nm postcolumn	46
Weefsel	Thc, ThcMP, ThcDP, ThcTP	Ultrasphere-ODS, 5 μm	gradiënt: methanol/ 0.025 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8.4)	Fluoresc.: 390/475 nm precolumn	12
Gevitamineerde graanprodukten, brood, varkens- en kippevlees	T, TMP, TDP	Perkin-Elmer C <sub>18</sub> , 3 μm	gradiënt: 0.1 M Na fosfaat pH 5.5/0.1 M Na fosfaat pH 2.9	Fluoresc.: 339/432 nm postcolumn	54

Vervolg tabel 2.

Produkt	Komponenten	Kolom	Eluens	Dektektie	Referentie
Bloed, serum	T, TMP, TDP	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/0.05 M Na Citraat, pH 4.0 + 0.01 M octaan-sulfonzuur (45:55)	Fluoresc.: 367/435 nm postcolumn	57
Bloed	T, TMP, TDP, TTP	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	acetonitril/0.2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.3:99.7)	Fluoresc.: 375/450 nm postcolumn	29
Rijstebloem	Thiamine	Nucleosil C <sub>18</sub> , 5 $\mu$ m	0.01 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0.15 M Na perchlooraat <u>temp.</u> 55°C	Fluoresc.: 375/435 nm postcolumn	37
--	T, TMP, TDP, TTP	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	0.2 M Na fosfaat, fosforzuur pH 4.3 <u>temp.</u> 35°C	Fluoresc.: 375/435 nm postcolumn	28
--	Thc, ThcMP, ThcDP	PRP-1	methanol/0.025 M Na fosfaat pH 8.5 (15:85)	Fluoresc. precolumn	11
Zuigelingenvoeding	Thiamine, oxien pyri-thiamine	Zorbax CN, 6 $\mu$ m	methanol/triethylamine 0.55%, pH 7 (10:90)	UV 245 nm	7
--	T, TMP, afbraakprodukten	Shadex OH pak M 614	0.05 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 3.75	UV 250 nm	38
Weefsel	Thc, ThcMP, ThcDP, ThcTP	Lichrosorb-NH <sub>2</sub>	acetonitril/0.09 M K-fosfaatbuffer, pH 8.4 (60:40)	Fluoresc.: 375/430 nm precolumn	25
Graan, brood, vlees, groenten	Thc	Lichrosorb RP8, 10 $\mu$ m	methanol, acetonitril, isobutanol (8:1:1)	Fluoresc.: 370/425 nm precolumn	9



Tabel 3. Parameters post-column thiochromreactie

Samenstelling reagens in reaktiespiraal	flow reagens ml/min	flow eluens ml/min	reaktietijd sec	referentie
0,012% $K_3Fe(CN)_6$ 0,6 % NaOH	1,0	1,5	12	59
0,006% $K_3Fe(CN)_6$ 3 % NaOH	0,25	1,0	30	35
0,001% $K_3Fe(CN)_6$ 8,3 % NaOH	0,23 0,16	1,0	60	56
0,05% $K_3Fe(CN)_6$ 6 % NaOH	0,6	0,6	7 temp. = 55°C	37
0,016% $K_3Fe(CN)_6$ 2,4 % NaOH	0,3	1,2	16	57
0,004% $K_3Fe(CN)_6$ 0,77 % NaOH	0,3	2,5	20	46

Tabel 4. Overzicht van extraktiemethoden voor vitamine B2

Produkt	Procedure	Meetmethode	Referentie
Diverse produkten	0.1 M HCl, 30 min. 121-123°C, eiwitten precipiteren door pH-gradiënt ( 6 4.5)	Fluorimetrisch	23
Zuivelprodukten, vlees- produkten, granen, groenten en fruit	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (of 1 M HCl of 0.05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) + ureum, 30 min. 121-123°C	Fluorimetrisch	44
Melk	15% TCA, 90 min. 80°C	Fluorimetrisch	43
Gevitamineerde macaroni	0.1 M HCl, 30 min. 121°-123°C	HPLC/Fluoresc.	60
Gevitamineerde graan- produkten, zuivel-, vleesprodukten, groenten	0.1 M HCl, 30 min. 121°-123°C <u>Takadiastase</u> , 16 uur 37°C, pH 4.3	Fluorimetrisch	18
Vlees-, graan-, zuivel- produkten, ei	0.1 M HCl, 30 min. 121°C <u>Takadiastase</u> , 2 of 4 uur 40°C, pH? (acetaatbuffer)	HPLC/Fluoresc.	33
Groenten	0.1 M HCl, 30 min. 99°C <u>Mylase</u> , 14 uur 38°C, pH 4.0 eiwitten precipiteren met TCA bij 60°C	HPLC/Fluoresc.	55
Diverse soorten melk	eiwitten precipiteren met loodacetaat	Fluorimetrisch	40
Melk	<u>Clara-Diastase</u> , 90 min. 45°C, pH	Fluorimetrisch	43

Vervolg tabel 4.

Produkt	Procedure	Meetmethode	Referentie
Zuivelprodukten	evt. extraheren met acetaatbuffer pH 4 <u>clean-up: Sep-Pak C<sub>18</sub></u>	HPLC/UV	3
Kaas	extraheren met water/methanol/azijnzuur (14:7:9)	HPLC/UV	50
Melk, melkpoeder, kaas	op pH 3.0 brengen met azijnzuur filtreren	HPLC/UV	2,53
Zuigelingenvoeding	eiwitten precipiteren door pH-gradiënt ( 1.7 4.6)	HPLC/Fluoresc.	8
Bloed	eiwitten precipiteren met TCA	HPLC/Fluoresc.	49
Serum	vergelijking autoclaaf, autoclaaf + enzymatische hydrolyse, enzymatische hydrolyse	HPLC/Fluoresc.	24



Tabel 5. Overzicht van HPLC-parameters voor de bepaling van vitamine B2.  
(RF=riboflavine; FMN=flavinemononucleotide; FAD=flavine-adenine-dinucleotide)

Produkt	Komponenten	Kolom	Eluens	Dektektie	Referentie
Zuigelingsvoeding	RF, pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine, lumiflavine, lumichrome	Spherisorb ODS, 5 µm	acetonitril/methanol/triethylamine buffer pH 3.0, 0.007 M octaansulfonzuur (5:10:85)	Fluoresc.: 285/546 nm	8
Melk, melkpoeder, kaas	RF, 2 afbraakprodukten RF	Cosmosil 5 C <sub>18</sub>	methanol/water/azijnzuur (45:65:0.1)	UV: 254 nm	53
Kaas	RF	Lichrosorb RP18, 5 µm	acetonitril/water (20:80)	VIS: 446 nm	50
Zuivelprodukten	RF	Bio-Sil ODS-5S C <sub>18</sub>	methanol/water/azijnzuur (35:65:0.1)	UV: 270 nm	3
Groenten	RF	Altex-ultrasphere ODS, 5 µm	methanol/0.005 M heptaansulfonzuur pH 4.5, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (60:40)	Fluoresc.: 450/530 nm	55
Melk, melkpoeder, kaas	RF	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/water/azijnzuur (32:68:0.1)	UV: 270 nm	2
Gevitamineerde macaroni	RF	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/water/azijnzuur (43:56:1)	Fluoresc.: 450/510 nm	60
	lumichroom	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/water/azijnzuur (49:50:1)	Fluoresc.: 300-350/479 nm	

Vervolg tabel 5.

Produkt	Komponenten	Kolom	Eluens	Dektektie	Referentie
Bloed	RF, FMN, FAD	Hypersil ODS, 5 µm	methanol/0.3 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2.9 (17:83)	Fluoresc.: 470/525 nm	49
Urine	RF, FMN	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/0.01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5.0 (35:65)	Fluoresc.: 320-400/ 400-700 nm	13
Melk	RF, FMN	ODS Sil-x-1	acetonitril/water (8:92)	Fluoresc.: 453/520 nm	41
Vlees-, graan-, zuivel- produkten, ei	RF, FMN	Magnusil C <sub>22</sub>	methanol/0.1 M Na <sub>3</sub> citraat (4:6)	Fluoresc.: 449/520 nm	33
Graan, brood, vlees groenten	RF	Lichrosorb NH <sub>2</sub> , 10 µm	methanol/0.06 M Na-acetaat pH 4.5 (50:50)	Fluoresc.: 467/525 nm	9

Tabel 6. Overzicht van methoden voor de simultane extractie van vitamine B1 en B2.

Produkt	Procedure	Meetmethode	Referentie
Graanprodukten, groenten, vleesprodukten, fruit	0.1 M HCl (vleesprod. 0.2 M HCl), 30 min. 120°C, <u>clarase</u> , 20 uur 40°C, pH ?  geen zure hydrolyse <u>Clarase</u> , 20 uur 40°C, pH ? ethyleen glycol monomethylether, 10 min 95°C thiamine disulfide omzetten met cysteïne	Fluorimetrisch	39
Peulvrucht (Cowpea)	<u>Clarase</u> , 20 uur 45°C, pH 4.5	Fluorimetrisch	16
Vleesprodukten	0.1 M HCl (pH suspensie < 1-1.2), 30 min 121°C <u>Mylase</u> 100, 3-4 uur 37°C, pH 3.5 eiwitten precipiteren door pH gradiënt ( 6.5 4)	Fluorimetrisch	34
Vlees, graanprodukten, groenten, fruit, zuivelprodukten	0.1 M HCl, 30 min. 120°C <u>Clarase</u> , 3 uur 45°C, pH 4-4,5 <u>Clean-up</u> : Sep-Pak C <sub>18</sub> voor sommige produkten	HPLC/Fluoresc.	59
peulvruchten, magere melkpoeder, tarwebloem	0.3 M HCl, 15 min. 121°C <u>Takadiastase</u> , 3 uur 48°C, pH 4-4.5 eiwitten precipiteren met TCA bij 100°C na oxideren thiamine thiochroom <u>clean-up</u> : Sep-Pak C <sub>18</sub>	HPLC/Fluoresc.	20



Vervolg tabel 6.

Produkt	Procedure	Meetmethode	Referentie
Gevitamineerde graan- produkten, brood, vlees, melk, yoghurt	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 15 min. 120°C (pH < 1.2) <u>Clarase</u> , 20 min. 45°C, pH 4.5	HPLC/Fluoresc.	47
Graan, brood, vlees groenten	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 15 min. 120°C <u>Claradiastase</u> , 15 uur 37°C, pH 4.5 of 2 uur 45°C	HPLC/Fluoresc.	9
Aardappel	0.1 M HCl, 30 min. 100°C <u>Takadiastase</u> , 2 uur 45°C-50°C, pH 4.5	HPLC/Fluoresc.	19
Vleesprodukten	0.1 M HCl, 30 min. 121°C <u>Takadiastase/Papaïne</u> , 2.5-3 uur 45°C, pH 4-4.5	HPLC/Fluoresc.	1
Graanprodukten	0.1 M HCl, 30 min. 100°C <u>Enzym (?)</u> , 15 uur 38°C	Fluorimetrisch	14
Gevitamineerde graan- produkten	0.1 M HCl, 30 min. 100°C	HPLC/UV	26
Gevitamineerde graan- produkten	0.05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 30 min. 100°C <u>Clarase</u> , 60 min. 55°C	HPLC/Fluoresc.	56
Rijst, rijstprodukten	0.05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 30 min. 121°C <u>Takadiastase/Papaïne</u> , 16 uur 35°C, pH 4.5	HPLC/UV	52
Gevitamineerde graan- produkten	0.05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 min. 100°C <u>Mylase P</u> , 1 uur 56°C, 2.5 M acetaat- buffer	HPLC/Fluoresc.	35

Tabel 7. Overzicht van HPLC-parameters voor de (simultane)bepaling van vitamine B1 en B2.

Produkt	Komponenten	Kolom	Eluens	Detektie	Referentie
Vleesprodukten	lumiflavine, thiochroom, <u>twee</u> afzonderlijke injekties	Spherisorb Silica 20 µm	methanol/chloroform (10:90)	thiochroom: Fluoresc.: 367/... precolumn Lumiflavine: Fluoresc.: 270/...	1
Diverse produkten	thiochroom, riboflavine	Radial-Pak C <sub>8</sub> , 10 µm	methanol/0.005 M TBAP, pH 7.5 (20:80)	thiochroom: Fluoresc. 360/425 nm precolumn riboflavine Fluoresc.: 450/530 nm	6
Aardappel	thiochroom, riboflavine <u>twee</u> afzonder- lijke injekties	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/water (30:70)	thiochroom: Fluoresc.: 365/435 nm precolumn riboflavine: Fluoresc.: 450/510 nm	19
Gevitamineerde graan- produkten, brood, vlees, melk, yoghurt	thiochroom, riboflavine, niacine	µ-Bondapak C <sub>18</sub>	0.2 M acetaatbuffer + 0.005 M heptaansulfonzuur	thiochroom, ribo- flavine: Fluoresc.: 390/475 nm	47
Vlees, graanprodukten, groenten, fruit, zuivelprodukten	thiamine, ribo- flavine	µ-Bondapak C <sub>18</sub> , Radial Pak	methanol/0.005 M Pic B6 (40:60)	thiamine: Fluoresc.: 360/425 nm postcolumn riboflavine Fluoresc.: 360/500 nm	59

Vervolg tabel 7.

Produkt	Komponenten	Kolom	Eluens	Detektie	Referentie
Gevitamineerde graan- produkten	thiamine, ribo- flavine	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/0.005 M hexaansulfonzuur/azijnzuur (36:63:1)	thiamine: Fluoresc.: filters postcolumn riboflavine Fluoresc.: filters	35
Gevitamineerde graan- produkten	thiamine, ribo- flavine, pyri- doxine	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/0.005 M hexaansulfonzuur/azijnzuur (30:69:1)	Fluoresc.:288/418 postcolumn thiochroom	56
Rijst, rijstprodukten	thiamine, ribo- flavine, niacine	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	methanol/Pic 5 + Pic 7/ azijnzuur (39:60:1)	UV: 254 nm	52
Multivitamine preparaten	thiamine, ribo- flavine, niacine, pyridoxine, ascorbinezuur	Radial Pak C <sub>18</sub>	methanol/0.007 M heptaansulfonzuur, triethylamine, pH 3.6/ azijnzuur (30:165:5)	UV: 280 nm	32