

Afdeling AM 1985-03-25

RAPPORT 85.34 Pr.nr. 505.0100

Onderwerp: Ontwikkeling methode voor het  
bepalen van vitamine B<sub>6</sub> in  
levensmiddelen

Bijlagen: 13.

Voorgaand verslag: 83.77.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afdeling AM  
(4x), medewerkers, projektbeheer, projektleider  
(Hollman), circulatie.



Projekt: Ontwikkeling methoden voor het bepalen van micronutriënten  
in levensmiddelen

Onderwerp: Ontwikkeling methode voor het bepalen van vitamine B<sub>6</sub> in  
levensmiddelen

Bijlagen: 13

Voorgaand verslag: 83.77

---

Doel:

Ontwikkeling van een methode voor het bepalen van vitamine B<sub>6</sub> in  
levensmiddelen.

Samenvatting:

Twee reversed phase HPLC-systemen voor de scheiding van pyridoxine (PN), pyridoxamine (PM) en pyridoxal (PL) werden onderzocht waarbij de invloed van een aantal variabelen in kaart gebracht werd. De voor de analyse van vitamine B<sub>6</sub> wenselijk geachte hydrolyse van de fosfaatesters werd onderzocht met behulp van standaardoplossingen van de B<sub>6</sub> vitaminen. Hierbij werd aandacht geschonken aan een enzymatische hydrolyse en aan een hydrolyse bij verhoogde druk en temperatuur (autoclaaf).

Conclusies:

- Ion-paar chromatografie met behulp van heptaansulfonaat blijkt het meest geschikt.
  - De enzymatische hydrolyse (Clara-Diastase) is volledig na 2 uur.
  - De hydrolyse met behulp van een autoclaaf (121°C) is pas volledig na 5 uur. Deze hydrolyse wordt geremd door hoge zuurconcentraties.
- 

Verantwoordelijk: ir P. Hollman *PH*

Medewerker/Samensteller: R. Binnendijk *RB*

Projectleider: ir P. Hollman

## 1. Inleiding

In het RIKILT-rapport 83.77 (1), wordt, gezien de specificiteit en het waarschijnlijk vervallen van een clean-up, voorgesteld een methode te ontwikkelen waarbij gebruik gemaakt wordt van reversed-phase HPLC in combinatie met fluorescentiedetectie, vooraf gegaan door ontsluiting bij verhoogde temperatuur.

Als uitgangspunten voor de chromatografie zijn twee publicaties genomen: een reversed phase chromatografiemethode (2) en een variant hierop gebaseerd op ion-paar chromatografie (3).

Voor de ontsluiting zijn zowel de ontsluiting bij verhoogde temperatuur, onder andere toegepast door de AOAC (4), als de enzymatische hydrolyse toegepast, deze laatste ontsluiting wordt ook onder andere gebruikt bij de bepaling van vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> (5,6).

## 2. Fluorescentie optima

Bepaald zijn de excitatie-emissiemaxima van de B<sub>6</sub> componenten, met behulp van de Perkin-Elmer LS 4 fluorescentiedetector, in:

- kaliumdiwaterstoffosfaat 0,0667 M/fosforzuur pH = 2,6  
4% methanol  
(zie bijlage 1 t/m 3).

component	excitatie (nm)	emissie (nm)
PL	285	377
PN	288	394
PM	292	395

- kaliumdiwaterstoffosfaat 0,0667 M/fosforzuur pH = 2,6  
natrium-1-heptaansulfonaat 0,012 M  
tetraethylammoniumchloride 0,0075 M  
isopropanol 3,75%  
(zie bijlage 4 t/m 6).

component	excitatie (nm)	emissie (nm)
PL	287	378
PN	288	395
PM	292	395

Er is dus geen invloed van het eluens op de ligging van de maxima.

### 3. Chromatografie

#### 3.1 Reversed phase

Nagegaan is in hoeverre de in de literatuur beschreven methoden geschikt zijn voor de scheiding en bepaling van de drie vitamine B<sub>6</sub> componenten (zie RIKILT-rapport 83.77). Als uitgangspunt dient het systeem beschreven door O'Reilly (2). Hij gebruikt een spherisorb 10 µm RP 18 25 x 0,4 cm kolom met als eluens een 0,067 M kaliumdiwaterstoffosfaatbuffer op pH 2,6 gebracht met fosforzuur (zie tabel 1 en bijlage 7). De analysetijd bedraagt dan circa 10 minuten. De analysetijd kan verkort worden door aan de buffer een minder polaire vloeistof toe te voegen (b.v. methanol). Na toevoegen van 4% methanol bedraagt de analysetijd circa 6 minuten. De flow bedraagt 1,6 ml/min.

Tabel 1

% methanol	k'		
	PM	PL	PN
0	0,47	3,00	4,60
2	0,43	2,20	3,23
3	0,37	1,93	2,76
4	0,37	1,70	2,40
5	0,37	1,57	2,13
6	0,30	1,40	1,90

Tevens wordt door deze toevoeging een betere piekvorm verkregen

% methanol	As <sub>PM</sub>	As <sub>PL</sub>	As <sub>PN</sub>
0	1,3	1,7	2,1
4	1,1	1,2	1,6

Waarbij As de asymmetriefactor op 10% van de piekhoogte is.

De elutievolgorde is: PM, PL, PN.

Nadat de spherisorb kolom niet meer bruikbaar was, het schotelgetal liep terug van ± 12.000 tot ± 2.500, was het niet mogelijk eenzelfde kolom, met dezelfde eigenschappen, te verkrijgen.

Alternatieven zoals Hypersil 5 ODS (15 x 0,46 cm), Lichrosorb 5 RP 8 (15 x 0,46 cm) en het Chrompack cartridge systeem (spherisorb 7  $\mu$  C18, 20 x 0,3 cm) voldoen niet. Het probleem in deze is de piekasymmetrie. Door het toevoegen van tetraethylammoniumchloride kan de pieksymmetrie verbeterd worden. Het gevolg van deze toevoeging is ook dat PM nauwelijks meer wordt vertraagd waardoor deze in het vloeistoffront belandt, zelfs als geen methanol aan de buffer wordt toegevoegd.

### 3.2 Ion-paar reversed phase

Williams (3) beschrijft de scheiding van de drie B<sub>6</sub> componenten met behulp van ion-paar chromatografie; loopvloeistof: 0.0324 M azijnzuur (pH 2,6), 0,081 M heptaansulfonzuur, 10% isopropanol; kolom  $\mu$  Bondapack C18 (30 x 0,39 cm). Deze methode diende als uitgangspunt voor een alternatieve methode, nadat de methode beschreven in hoofdstuk 2.1 niet meer voldeed.

Diverse parameters zijn bekeken, als kolom wordt het cartridge systeem van Chrompack (Spherisorb C18 7  $\mu$ m 20 x 0,3 cm) gebruikt, als basis voor de loopvloeistof de kaliumdiwaterstoffosfaat/fosforzuur buffer pH = 2,6.

#### 3.2.1 Flow (bijlage 8)

Loopvloeistof: Kaliumdiwaterstoffosfaat 0,0667 M/fosforzuur pH 2,6  
 Natrium-1-heptaansulfonaat 0,008 M  
 Isopropanol 10%.

	flow (ml/min)	0,2	0,3	0,4	0,5
U	(cm/sec)	0,074	0,113	0,150	0,190
component					
PL	k'	0,86	0,85	0,86	0,85
	H ( $\mu$ m)	39,5	42,0	43,2	40,0
PN	k'	1,04	1,03	1,05	1,03
	H ( $\mu$ m)	33,6	38,8	40,8	46,2
PM	k'	1,73	1,69	1,73	1,70
	H ( $\mu$ m)	27,9	36,7	49,8	56,7

Gekozen is, om een redelijke analysetijd te verkrijgen, voor een flow van 0,4 ml/min, dit komt overeen met een flow van circa 1,0 ml/min bij een diameter van 0,46 cm.

### 3.2.2 Tegenionconcentratie (bijlage 9)

Loopvloeistof: Kaliumdiwaterstoffosfaat 0,0667 M/fosforzuur pH 2,6  
Isopropanol 10%.

Flow: 0,4 ml/min.

k'	concentratie natrium-1-heptaansulfonaat mol/l			
	0,003	0,005	0,008	0,012
PL	0,604	0,697	0,877	0,992
PN	0,724	0,841	1,06	1,21
PM	0,813	1,14	1,72	2,28

Het blijkt dat het veranderen van de tegenionconcentratie nauwelijks invloed heeft op de scheiding van PL en PN. Om de analysetijd kort te houden is gekozen voor een concentratie van 0,008 M aan natrium-1-heptaansulfonaat.

### 3.2.3 Bufferconcentratie (bijlage 10)

Loopvloeistof: Natrium-1-heptaansulfonaat 0,008 M  
Isopropanol 10%.

Flow: 0,4 ml/min.

k'	concentratie kaliumdiwaterstoffosfaat/fosfor- zuur buffer pH = 2,6 mol/l			
	0,0335	0,0503	0,0667	0,0834
PL	1,10	0,915	0,815	0,762
PN	1,32	1,11	0,992	0,915
PM	2,61	2,03	1,61	1,35

Het veranderen van de bufferconcentratie heeft nauwelijks invloed op de scheiding van PL en PM. Om het eluens een redelijke buffer capaciteit te geven is gekozen voor een concentratie van 0,0667 molair.

### 3.2.4 Isopropanolconcentratie (bijlage 11)

Loopvloeistof: Kaliumdiwaterstoffosfaat 0,0667/fosforzuur pH 2,6

Natrium-1-heptaansulfonaat 0,008 M

Flow: 0,4 ml/min.

k'	isopropanolconcentratie mol/l					
	2,50	3,75	5,00	7,50	10,00	12,50
PL	3,39	2,14	1,61	1,07	0,811	0,685
PN	4,79	2,98	2,15	1,34	0,977	0,792
PM	6,64	4,19	3,32	2,25	1,58	1,23

Het blijkt dat de isopropanolconcentratie invloed heeft op de scheiding van PL en PN. Om deze twee componenten basislijn te scheiden moet de isopropanolconcentratie kleiner zijn dan circa 4%.

### 3.2.5 Kolomtemperatuur (bijlage 12)

Loopvloeistof: Kaliumdiwaterstoffosfaat 0,0667 M/fosforzuur pH 2,6

Natrium-1-heptaansulfonaat 0,008 M

Isopropanol 3,75%

k'	Temperatuur (°C)				
	25,0	29,8	34,0	39,0	44,0
PL	1,85	1,70	1,60	1,50	1,40
PN	2,60	2,30	2,20	2,00	1,80
PM	3,40	3,20	3,00	2,80	2,50

Door de temperatuur te verhogen van 25°C naar 44°C wordt de analyse-tijd verkort van 11 minuten naar 9 minuten.

### 3.2.6 Optimalisering loopvloeistof

Uit bovenstaande blijkt dat verhoging van de tegenionconcentratie de retentie van PM het sterkst beïnvloedt, het effect op PL en PN is kleiner en voor beide componenten gelijk. De bufferconcentratie heeft eveneens op PM het sterkste effect, terwijl PL en PN gelijk reageren. De isopropanolconcentratie heeft een gelijk effect op PM en PL en een iets sterker effect op PN. Bij een keuze van de bovengenoemde parameters zal de scheiding tussen PN en PL bepalend zijn, naast een minimale bufferconcentratie en een maximale analyseduur (+ 10 min).



De drie B<sub>6</sub>-componenten zijn basislijn gescheiden en elueren binnen 12 minuten van de kolom indien als loopvloeistof wordt gebruikt (zie bijlage 13A):

kaliumdiwaterstoffosfaat 0,0667 M/fosforzuur pH = 2,6

natrium-1-heptaansulfonaat 0,008 M

isopropanol 3,75%

De asymmetriefactoren en k' met bovenstaand systeem zijn:

	PL	PN	PM
As	3,0	1,8	1,2
k'	2,14	2,98	4,19

Om deze factoren te verlagen is tetraethylammoniumchloride (0,0075 M) toegevoegd.

Door deze toevoeging elueren de B<sub>6</sub> componenten sneller zodat de samenstelling van de loopvloeistof als volgt aangepast werd:

kaliumdiwaterstoffosfaat 0,100 M/fosforzuur pH = 2,6

natrium-1-heptaansulfonaat 0,012 M

isopropanol: 3,20%

tetraethylammoniumchloride 0,0075 M

De drie B<sub>6</sub> componenten zijn basislijn gescheiden en elueren binnen 8 minuten (zie bijlage 13B).

	PL	PN	PM
As	1,6	1,4	1,2
k'	1,12	1,41	2,02

Opmerking. Aan de injectievloeistof dient tegenion te worden toegevoegd, zelfde concentratie als in loopvloeistof, omdat anders A, uit  $y = A x + B$ , van de ijklijn van PN significant afwijkt van 0.

### 3.3 Detectiegrenzen

Bepaald zijn de detectiegrenzen voor de twee systemen, gemeten bij een signaal-ruisverhouding van 3:1 op basis van piekhoogte.

- Reversed phase, kolom i.d. 0,46 cm.

Maximale excitatie- en emissiegolflengte (zie hoofdstuk 2), voor de chromatografische omstandigheden zie hoofdstuk 3.1.

Detectiegrens

	absoluut (ng)	in product (mg/100 g)*
PM	0,05	0,003
PL	0,20	0,01
PN	0,28	0,015

- Ion-pair reversed phase kolom i.d. 0,30 cm.

Excitatiegolflengte: 285 nm, emissiegolflengte: 385 nm.

Voor de chromatografische omstandigheden wordt verwezen naar hoofdstuk 3.2.6.

Detectiegrens

	absoluut (ng)	in product (mg/100 g)*
PL	0,03	0,002
PN	0,04	0,002
PM	0,02	0,001

#### 4. Ontsluiting

Voor de ontsluiting van B<sub>6</sub>, bepaald als PM, PL en PN, zijn een aantal procedures beschreven. Hierin is een tweedeling aan te brengen (zie RIKILT-rapport 83.77).

- Zure- en enzymatische hydrolyse; een kortere zure hydrolyse bij circa 100°C om de vitamine-matrixverbindingen te verbreken gevolgd door een enzymatische hydrolyse (o.a. fosfatase) om de fosfaatvormen van de B<sub>6</sub> vitameren te hydrolyseren.

- Zure hydrolyse bij verhoogde druk en temperatuur. Hierbij worden zowel de vitamine-matrix als de vitamine-fosfaatverbindingen verbroken. Hierbij wordt vaak een onderscheid gemaakt tussen dierlijke en plantaardige producten, zowel wat betreft de zuursterkte (resp. 0,055 N en 0,44 N) als de extractieduur (5 resp. 2 uur).

-----

\* Bij inweeg van 10 g in 100 ml en een injectievolume van 20 µl.

Zowel de enzymatische hydrolyse als de hydrolyse bij verhoogde druk en temperatuur werden onderzocht, waarbij van de B<sub>6</sub> standaard zowel de stabiliteit als het omzettingspercentage bepaald werden. Voor alle experimenten zijn standaarden van de firma Merck gebruikt (art.nrs. 7523, 7524, 7526, 7527, 7547).

De experimenten zijn meestel op twee niveau's uitgevoerd namelijk 0,05 mg/100 g en 0,10 mg/100 g. Hierbij is een zodanige hoeveelheid standaard in bewerking genomen dat deze hoeveelheid overeenkomt met een monster van dit gehalte bij een inweeg van 10 g in 100 ml.

#### 4.1 Zure- en enzymatische hydrolyse.

##### 4.1.1 Standaardstabiliteit na zure hydrolyse

Voor chromatografische condities zie hoofdstuk 3.2.6.

Het mengsel van standaarden werd opgelost in 50 ml 0,2 N zwavelzuur en verwarmd in een kokend waterbad gedurende een bepaalde tijd. Analyses werden in enkelvoud uitgevoerd.

niveau: 0,05 mg/100 g.

Hydrolysetijd (min)	Recovery (%)		
	PM	PL	PN
15	100	100	99
60	100	102	100
90	100	102	100

niveau: 0,10 mg/100 g, in enkelvoud

Hydrolysetijd (min)	Recovery (%)		
	PM	PL	PN
15	102	102	101
60	100	100	99
90	100	100	99

De zure hydrolyse bij circa 100°C, die voorafgaat aan de enzymatische hydrolyse, kan tenminste gedurende 90 minuten worden toegepast.

4.1.2 Omzetting na enzymatische hydrolyse

Nagegaan is welke hydrolysetijd en welke enzymconcentratie nodig zijn om PMP respectievelijk PLP om te zetten in PM respectievelijk PL bij een temperatuur van 45°C. Hierbij is gekeken naar de vorming van PM en PL. Meting van de afname van PMP was niet mogelijk vanwege een storende component in het chromatogram, meting van PLP was niet mogelijk gezien de geringe respons van PLP.

Voor de chromatografische condities zie hoofdstuk 3.2.6. Aan standaard, opgelost in 50 ml 0,2 N zwavelzuur, wordt 10 ml 2,5 N natriumacetaat toegevoegd de pH is dan 4,5, hierbij wordt 2,5 respectievelijk 5 ml enzym, opgelost in water (20 g per 100 ml), gepipetteerd (enzym: Clara-Diastase Fluka 27540). De experimenten werden in enkelvoud uitgevoerd.

enzymconcentratie	Vorming (%)			
	PL		PM	
0,5 g/60 ml				
niveau mg/100 g	0,05	0,10	0,05	0,10
hydrolysetijd (min)				
20	85	83	47	47
40	85	88	68	65
60	91	86	76	67
120	90	89	84	84

enzymconcentratie	Vorming (%)			
	PL		PM	
1 g/60 ml				
niveau mg/100 g	0,05	0,10	0,05	0,10
hydrolysetijd (min)				
20	94	89	66	69
40	88	91	88	82
60	91	87	88	91
120	92	88	94	94

Het blijkt dat, voor wat PL betreft, na 120 minuten hydrolyseren circa 90% gevormd is, dit geldt voor beide enzymniveau's. Bij PM is na 120 minuten hydrolyseren, bij de hogere enzymconcentratie, circa 94% gevormd.

Deze niet volledige omzettingen kunnen verklaard worden door het feit dat zowel de PLP- als de PMP-standaard niet zuiver, dus geen 100%, zijn. Zo bevat de PLP-standaard volgens de declaratie, al 6 tot 9% water.

Er wordt geen noemenswaardig verschil gevonden tussen de twee niveau's respectievelijk 0,05 mg/100 g en 0,10 mg/100 g. Een hydrolysetijd van minimaal 120 min is vereist bij een enzymconcentratie van 1 g/60 ml. Na afronding van dit onderzoek bleek ons dat de fabrikant van Clara-Diastase (Fluka) onlangs gestopt is met de produktie van dit enzymmengsel. Als mogelijk alternatief kan dienen Mylase 100 (7).

#### 4.2 Zure hydrolyse bij verhoogde druk en temperatuur (autoclaaf).

##### 4.2.1 Standaardstabiliteit na autoclaaf

Een mengsel van PM, PL en PN, opgelost in zwavelzuur met wisselende normaliteit, werd gehydrolyseerd gedurende 2 uur en 5 uur, temperatuur 121°C. Voor chromatografie zie hoofdstuk 3.2.6. De experimenten werden in enkelvoud uitgevoerd.

Hydrolysetijd: 2 uur.

- niveau: 0,1 mg per 100 g, enkelvoud.

normaliteit zwavelzuur	Recovery (%)		
	PL	PN	PM
1,8	92	97	98
0,9	97	97	96
0,45	98	98	98
0,225	96	96	98
0,056	98	102	103

- niveau: 0,05 mg per 100 g, enkelvoud.

normaliteit zwavelzuur	Recovery (%)		
	PL	PN	PM
1,8	94	96	93
0,9	93	97	96
0,45	98	99	101
0,225	100	99	101
0,056	100	102	100

Hydrolysetijd: 5 uur.

- niveau: 0,1 mg per 100 g.

normaliteit	Recovery (%)		
	PL	PN	PM
zwavelzuur			
1,8	93	98	99
0,9	100	104	105
0,45	98	100	98
0,225	96	104	98
0,056	98	95	96

- niveau: 0,05 mg per 100 g.

normaliteit	Recovery (%)		
	PL	PN	PM
zwavelzuur			
1,8	97	94	93
0,9	90	93	91
0,45	94	95	91
0,225	94	100	96
0,056	93	90	90

Als conclusie kan getrokken worden dat de stabiliteit van de vitameren enigszins ongunstig beïnvloed wordt door hoge zuurconcentraties. Bij de onderzochte condities van tijd en temperatuur blijkt 0,45 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> een veilige grens.

#### 4.2.2 Omzetting na autoclaaf

Nagegaan is welke hydrolysetijd en welke zuurconcentratie nodig zijn om PMP respectievelijk PLP volledig om te zetten in PM respectievelijk PL; temperatuur 120°C, overdruk 1,05 atm.  
Voor chromatografie zie hoofdstuk 3.2.6.

Hydrolysetijd: 2 uur.

- niveau 0,1 mg per 100 g.

normaliteit zwavelzuur	Vorming (%)							piekhoogte	
	PL			PM				PMP	
				gem.				gem.	
1,8	82			82	48			48	
0,9	83	88	88	86,3	47	48	47	47,3	5,3
0,45	86	90	90	88,7	56	59	59	58,0	5,7
0,225	84	94	94	90,7	68	73	73	71,3	4,2
0,112		93	92	92,5		78	78	78,0	2,9
0,056	90			90	84			84	

- niveau 0,05 mg per 100 g, enkelvoud.

1,8	-				-				
0,9	93	91	81	88,3	55	50	41	48,7	2,5
0,45	88	92	90	90,0	57	65	65	62,3	2,9
0,225	100	85	84	89,7	77	69	69	71,7	2,2
0,112		84	84	84,0		77	77	77,0	1,5
0,056	104			104	80			80	

-: kwantificeren niet mogelijk.

Hydrolysetijd: 5 uur.

- niveau 0,1 mg per 100 g.

normaliteit zwavelzuur	Vorming (%)							rest PMP	
	PL			PM				(%)	
				gem.				gem.	
1,8	-				-				
0,9	90	89	88	89,0	81	76	74	77,0	11
0,45	96	89	92	92,3	92	80	86	86,0	9
0,225	92	92	95	93,0	92	89	92	91,0	6
0,056	90	99	99	96,0	85	96	97	92,7	

- niveau 0,05 mg per 100 g.

normaliteit zwavelzuur	Vorming (%)								piekhoogte PMP
	PL			PM			gem.		
1,8	x				x				
0,9	x	89	87	88,0	x	80	76	78,0	7
0,45	x	94	93	93,5	x	95	99	97,0	7
0,225		92	95	97	94,7	86	93	95	91,3
0,056		90	96	96	94,0	84	94	95	91,0

-: kwantificeren niet mogelijk.

x: niet geanalyseerd.

Evenals bij de enzymatische hydrolyse blijkt dat PMP minder makkelijk wordt omgezet. Rekening houdend met de onzuiverheid van PMP en PLP wijzen percentages > 90% op een volledige omzetting. Een hydrolysetijd van 2 uur blijkt voor wat betreft de omzetting van PMP bij alle onderzochte zuurconcentraties te kort te zijn. Duidelijk is dat naarmate de zuurconcentratie toeneemt de omzetting afneemt. Meting van PMP (waar mogelijk) toont aan dat afbraak van de gefosforyleerde vitameren onwaarschijnlijk is. Afbraak van de vrije vitameren kon eveneens nauwelijks vastgesteld worden (zie 4.2.1), zodat de lage omzetting bij hoge zuurconcentraties niet verklaard kan worden door instabiliteit van de vitameren.

Voor een volledige hydrolyse van de gefosforyleerde vitameren is autoclaveren gedurende 5 h bij zuurconcentraties < 0.225 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> noodzakelijk.

## 5. Conclusies

### Chromatografie

- Reversed phase HPLC biedt goede mogelijkheden voor de scheiding van PL, PN en PM. Het gebruik van een fosfaatbuffer (pH = 2,6) als mobiele fase blijkt minder geschikt vanwege de geringe retentie van PM ( $k' < 0.5$ ) en de slechte piekvorm van de vitameren bij de meeste kolomtypes.



- Ion-pair chromatografie met behulp van heptaansulfonaat ondervangt bovengenoemde problemen. Door variëren van de bufferconcentratie, de concentratie tegenion en de volumefractie 2-propanol kan de retentie van PN, PM en PL beïnvloed worden, hetgeen resulteert in een flexibel chromatografisch systeem.

#### Extractie

- Bij gebruik van het enzymmengsel Clara-Diastase is de omzetting van PLP en PMP na 2 uur kwantitatief.
- De hydrolyse van PLP en PMP bij verhoogde temperatuur en druk (autoclaaf 121°C) is pas na 5 uur volledig bij zuurconcentraties < 0.225 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Onder deze condities zijn PL, PN en PM stabiel. De hydrolyse wordt geremd door toenemende zuurconcentraties.

#### Literatuur

1. RIKILT-rapport 83.77, literatuuroverzicht analysemethoden voor vitamine B<sub>6</sub> in voedingsmiddelen.
2. W.J. O'Reilly, P.J.M. Guelen, M.J.A. Moes, E. van der Kleijn: J. Chromatogr., 183 (1980) 492.
3. A.K. Williams, P.O. Cole: J. Agric. Food Chem., 23 (1975) 915.
4. Horwitz, W.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist 43.159 pag. 849, 12e ed., Washington 1975.
5. Intern analysevoorschrift nr. A 111.
6. Intern analysevoorschrift nr. A 112.
7. D.E. MacBride, J. Food Sci., 48 (1983) 748.

Prüfung: 1

50 mg PL - 100  
0.2 - 50

PL in:

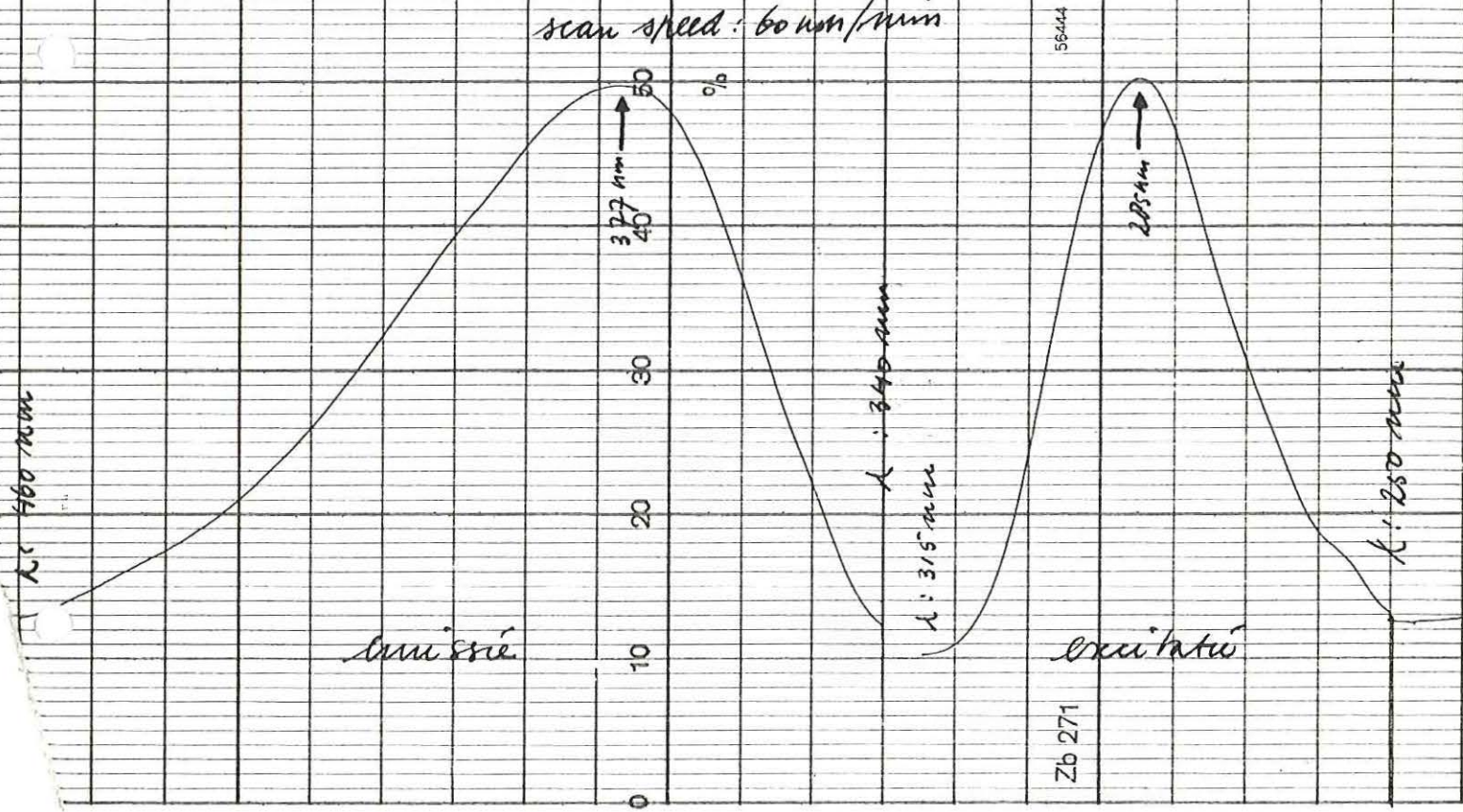
Kalium diwaserstoffphosphat 0.0667 M / fosforzäure pH = 2.6  
4% Methanol

LS-4: slots  $\approx$  5 mm  
    mm 2.5 mm

fix scale: 0.7

response: 4

scan speed: 60 nm/min



Bijlage: 2

50 mg PN-100  
9.2-50

PN in:

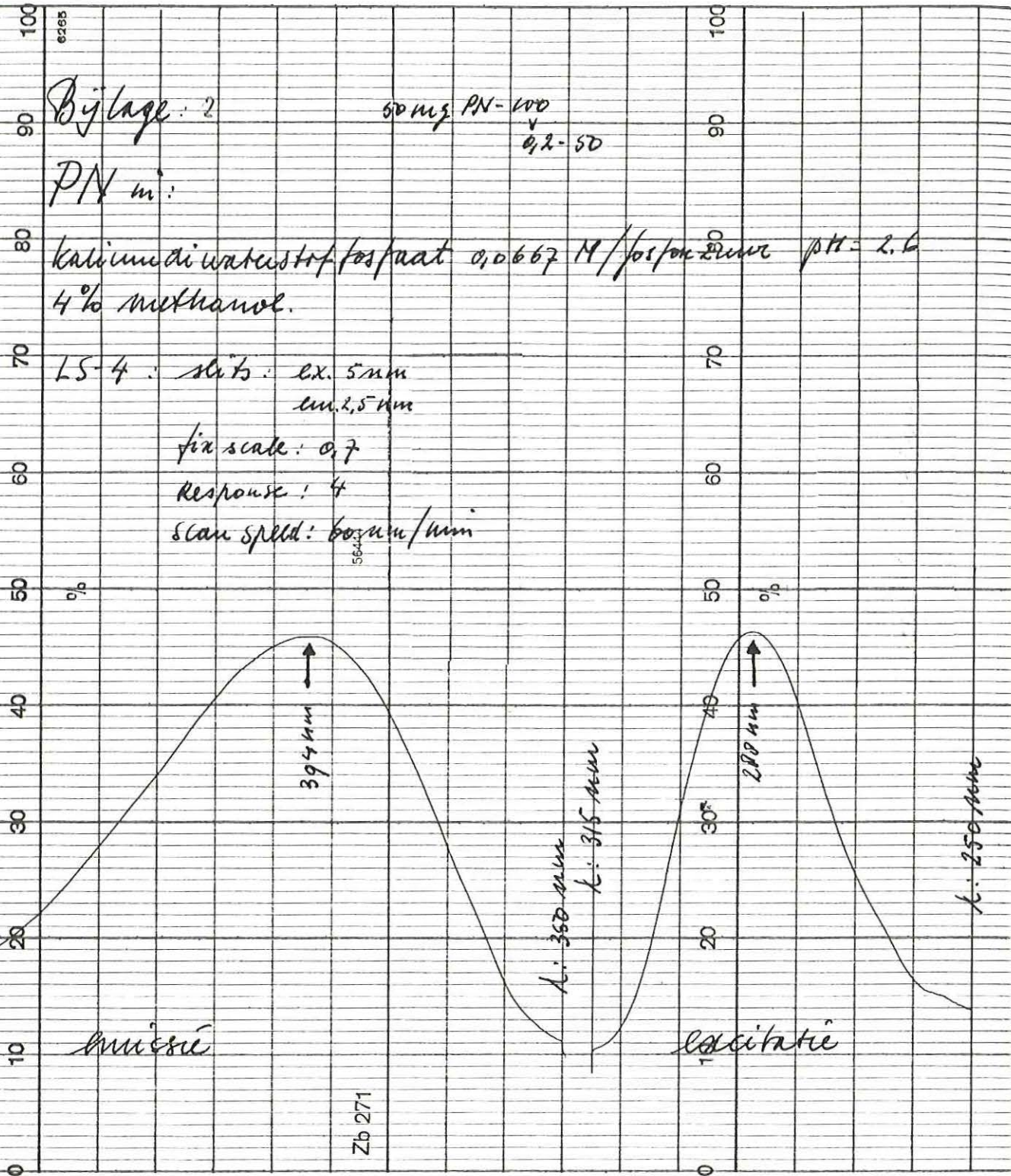
kaliumdiwaterstof fosfaat 0,0667 M / fosforzuur pH = 2,6  
4% methanol.

LS-4 : slits : ex. 5mm  
                  cm. 2,5mm

fix scale : 0,7

response : 4

scan speed : 6000 / min



λ: 470 nm

missie

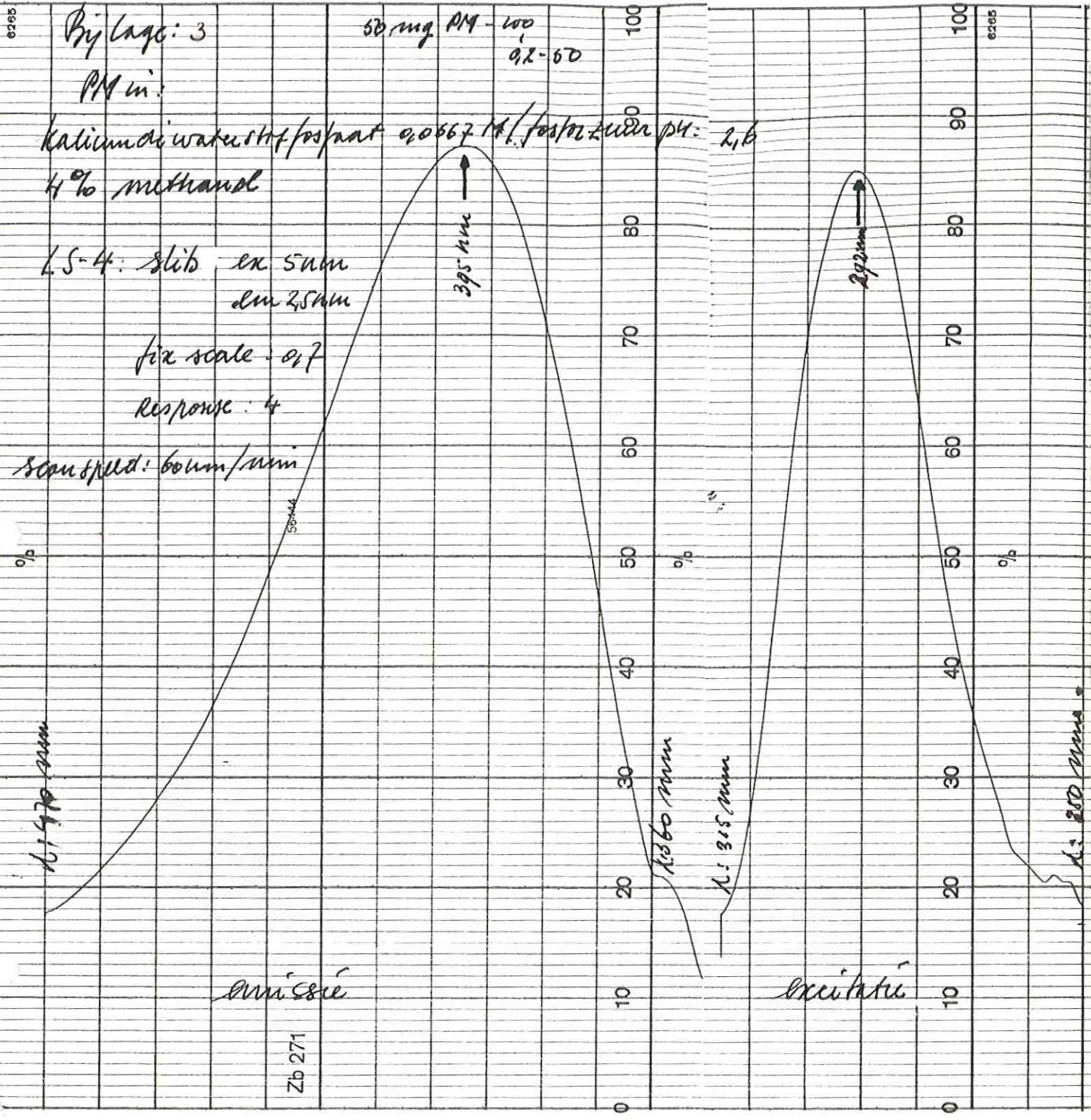
Zb 271

λ: 350 nm

λ: 315 nm

excitatie

λ: 250 nm



6285

6285

Dry layer: 4

PL in: Kalium watriklorid posnat buffer 0,100M / faktor Zeme pH = 2,6

C7 H15 O3 S Na 0,012 M

TEACE: 0,005 M

1 kopromol: 3,75 g

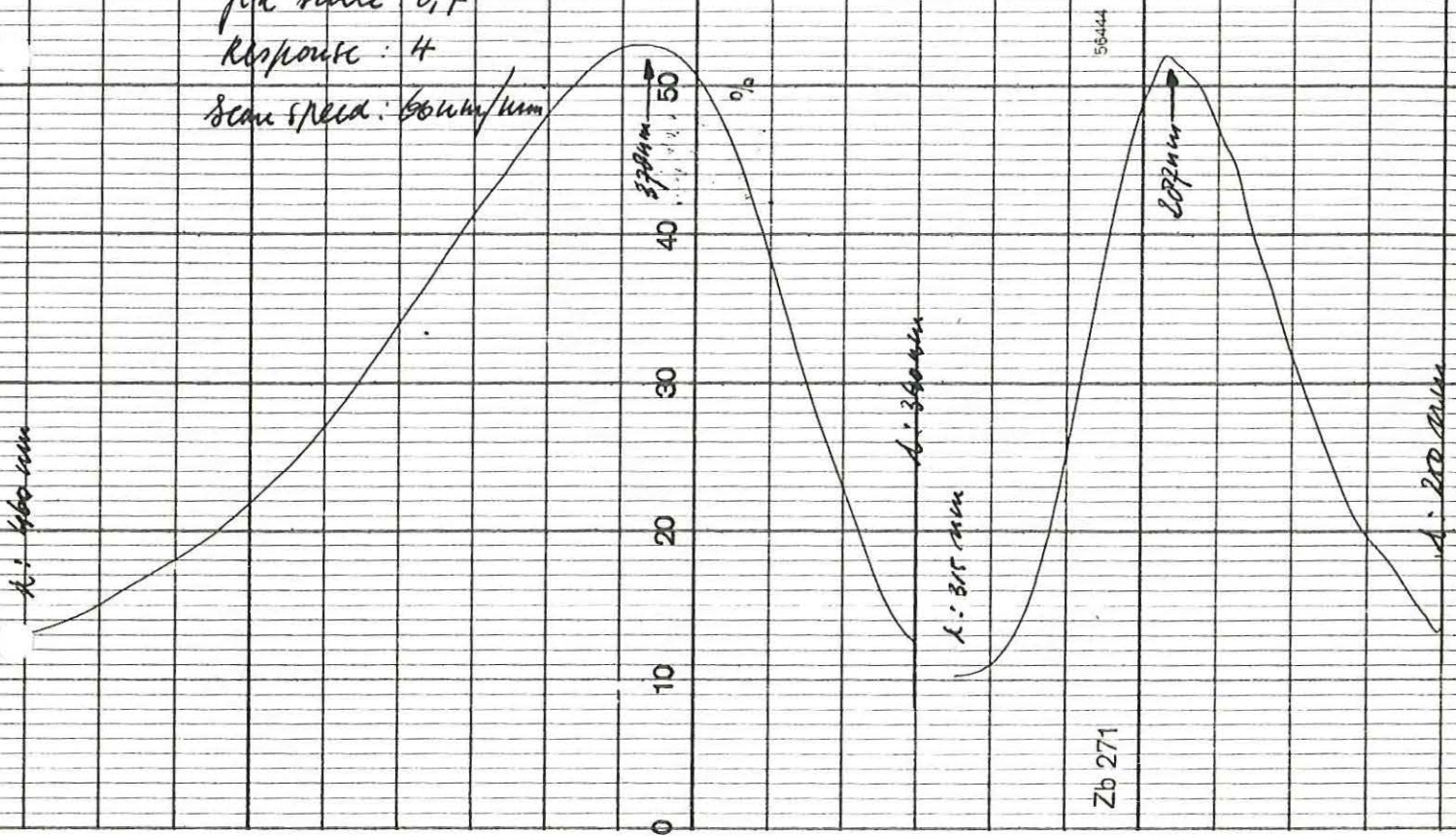
LS-4 slit ex. 5um

lm. 2,5um

fix scale: 0,7

Response: 4

Scan speed: 50um/min



By large: 5

PN m: Kalium unkuhat potrat bu. flu 0,100 M / potratum p<sub>H</sub> = 6

C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub> Na: 0,012 M

TRACU: 0,0075 M

LS-4: stat 2,5 mm  
in 2,5 mm

fix scale: 0,7

Response 94

scan speed: 60 mm/min

A: 40 mm

100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0

6265

%

395 nm →

Zb 271

5644

A: 30 mm

100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0

%

288 nm →

A: 20 mm

# Bylage 6

PM in: Kalium wasserstoffphosphat buffer 0,100 M / fosfor 2 mm pH = 2,6  
 $C_7H_5O_3S \cdot Na$  0,012 M  
 TEACl: 0,0075 M  
 isopropanol: 8,75 %

LS-4: Nits ex sum  
 um 2,5 mm

fix scale: 0,7

Uspouk: 4

scan speed: 60 mm/min

A: 370 mm

A: 310 mm

20°C: 315 mm

A: 260 mm

100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0

%

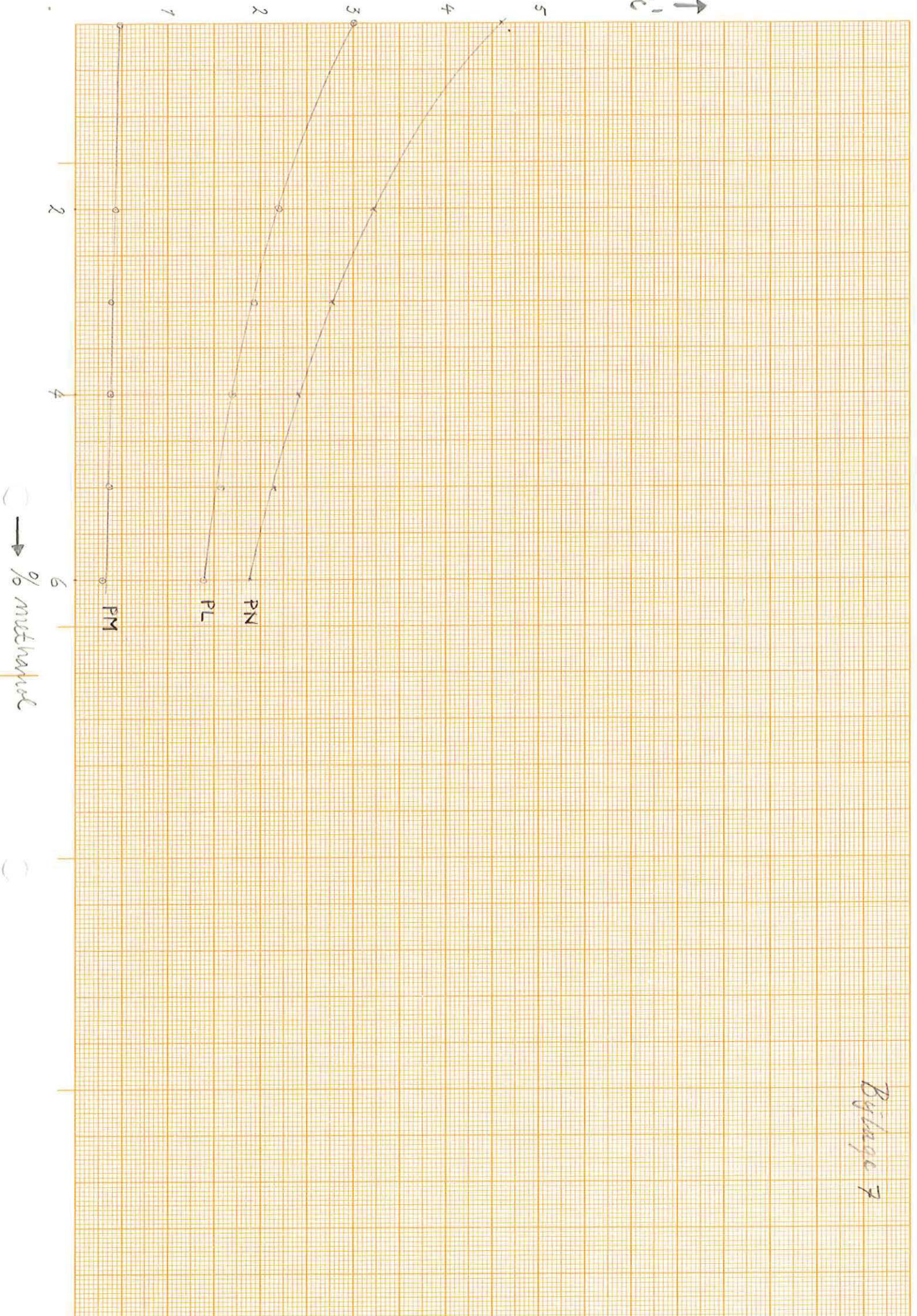
100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0

395 mm  
292 mm

%

emissie

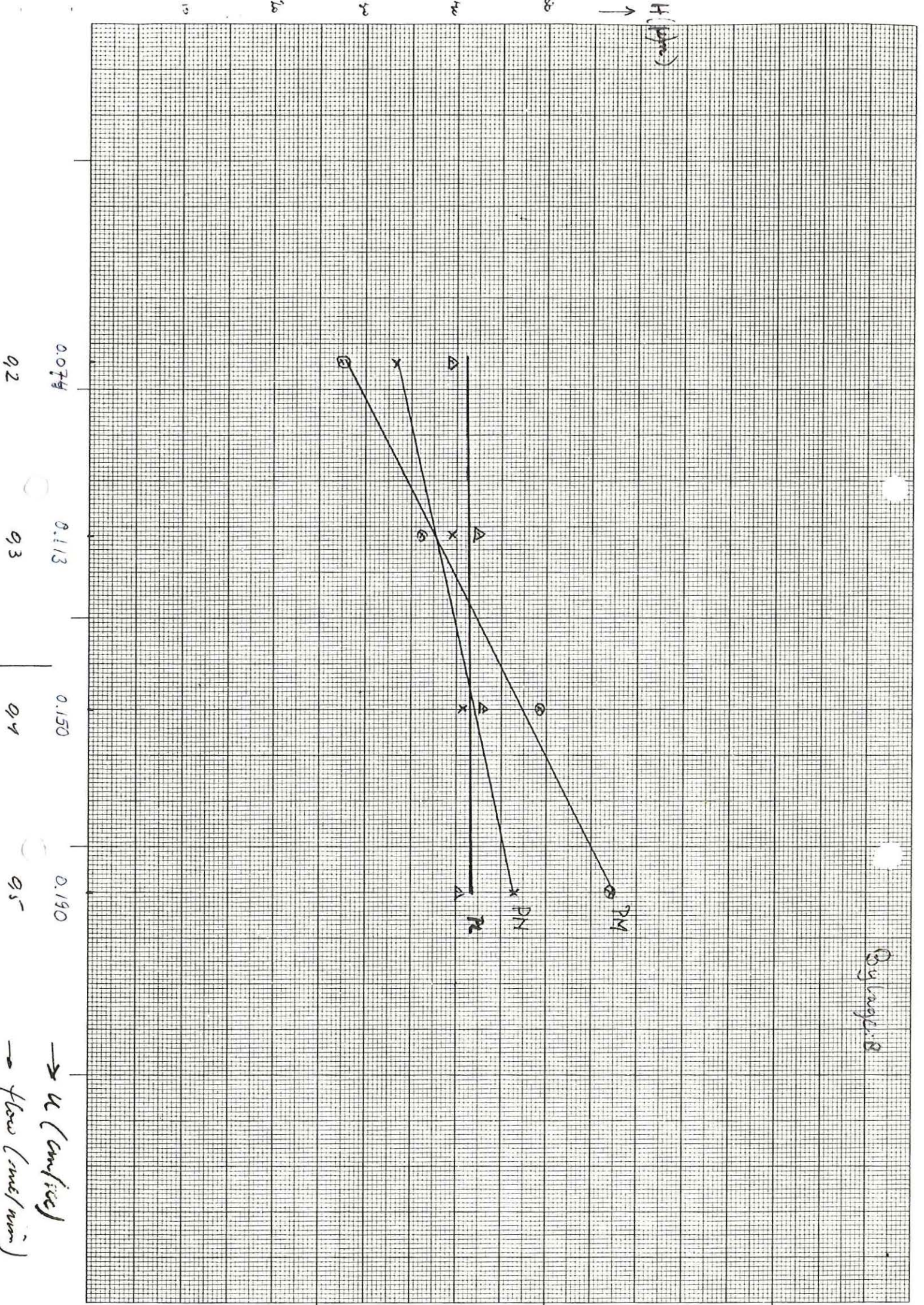
excitatie



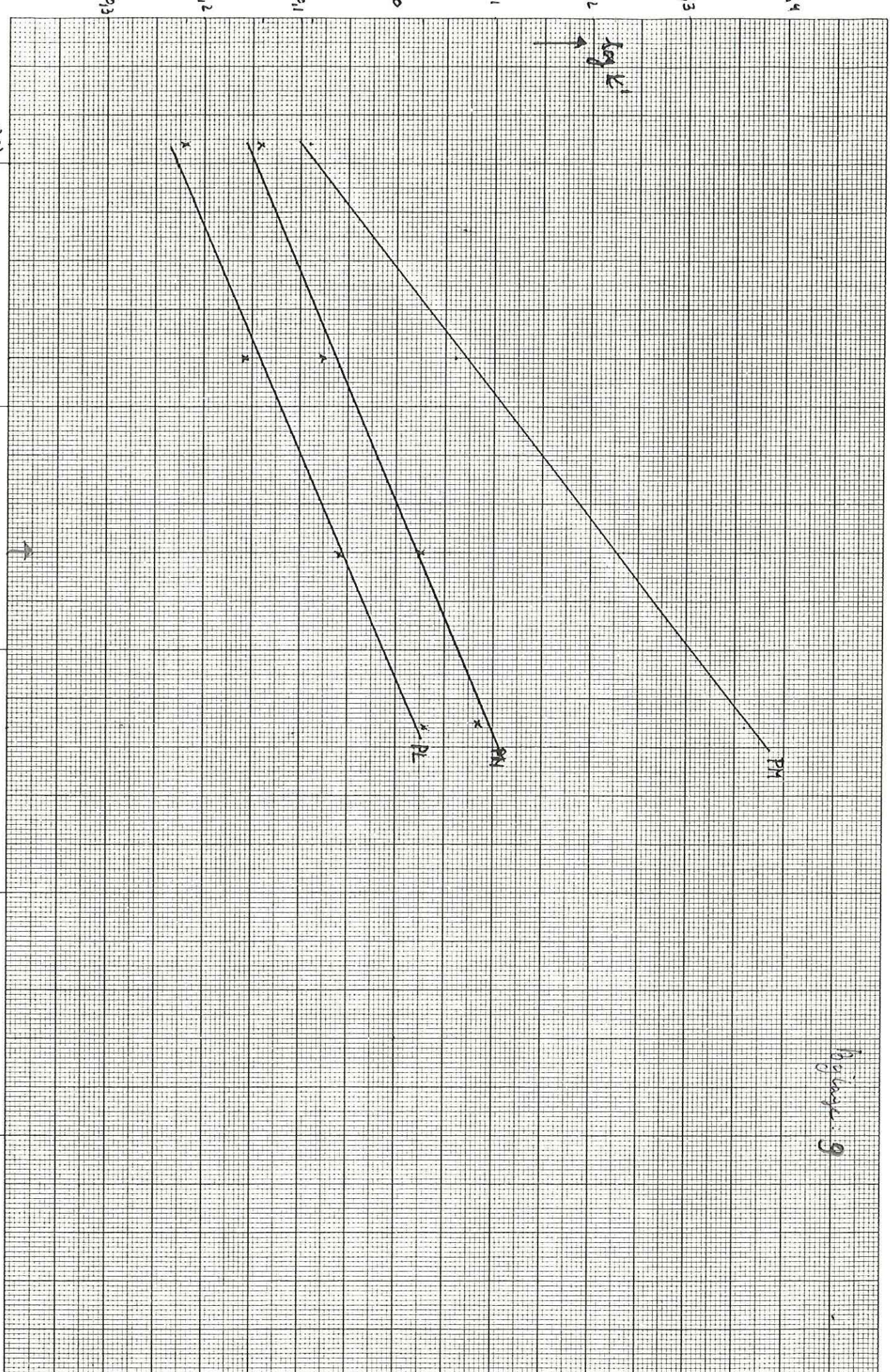
Bylong 7



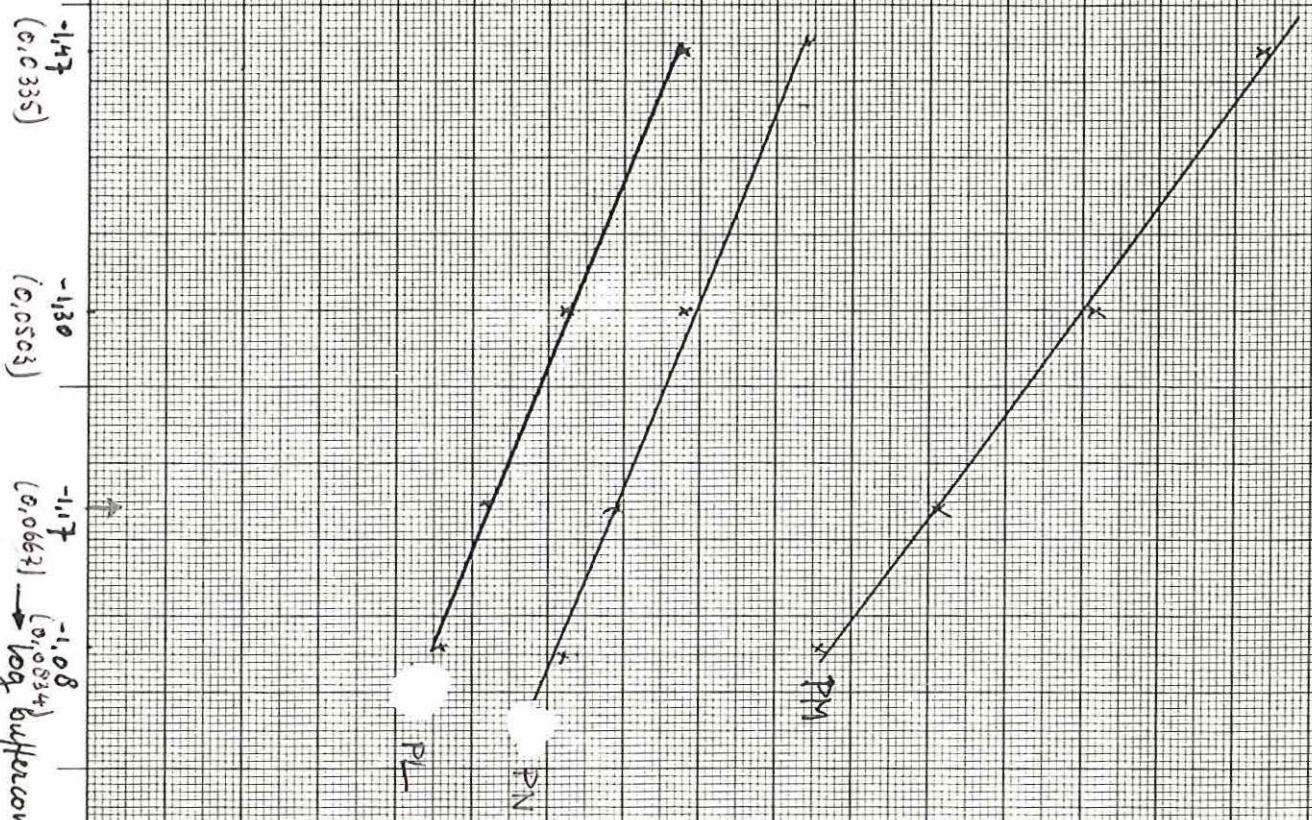
Bylage 8



Handwritten signature or mark.



↑ log K'



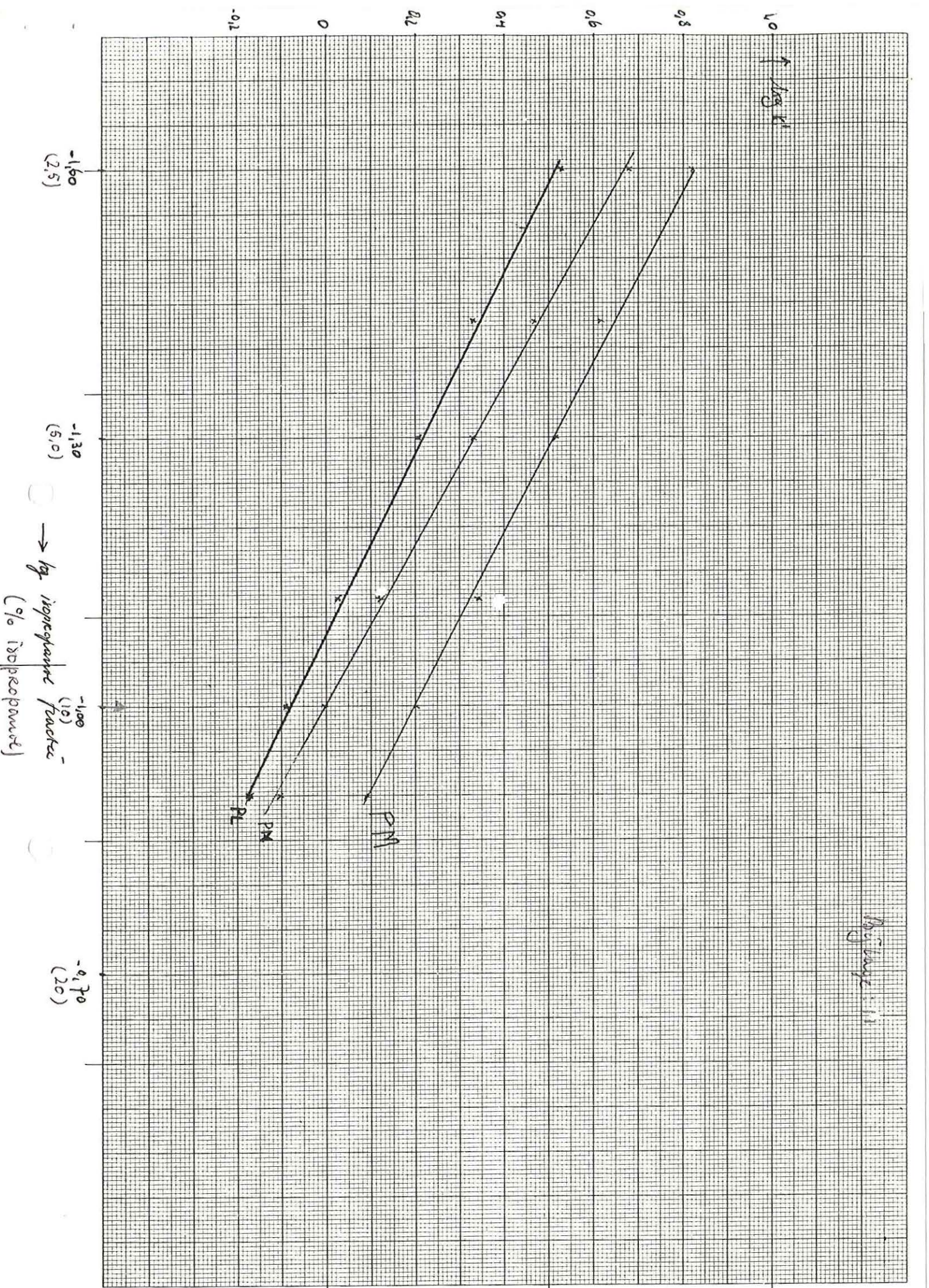
-1.47 (0,0335)  
-1.30 (0,0503)  
-1.17 (0,0667)  
-1.08 (0,0834)  
log konzentration  
(bakterieller häut)

PM

PL

PN

Dr. J. J. J. J.



Bestimmung: 11

k'

3

2

1

25

30

35

40

45

$\rightarrow t (^{\circ}C)$

log  $\mu_{\text{avg}} = 1.2$

