

Afd. Veevoeders en Meststoffen

1982-03-09

VERSLAG 82.21

Pr.nr. 505.0100

Onderwerp: Literatuuroverzicht analyse-  
methodes voor vitamine B<sub>1</sub>  
en B<sub>2</sub>

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd.  
Veevoeders en Meststoffen (4x), afd. Normalisatie  
(Humme), Projektbeheer, Projektleider (Hollman).

Project: Ontwikkeling methodes voor het bepalen van nutriënten in levensmiddelen

Onderwerp: Literatuuroverzicht analysemethodes voor vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>

---

Doel:

Inventarisatie analysemethodes vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>.

Samenvatting en conclusie:

De extractie van vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> dient voor een aantal levensmiddelen nader onderzocht te worden.

Het is zinvol een automatische methode voor vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> op te starten. HPLC methodes zijn voor de levensmiddelenanalyse nog in een beginstadium.

---

Verantwoordelijk: ir P. Hollman

PH

Medewerkers/samenstellers: T. Oostenbrink/ir P. Hollman

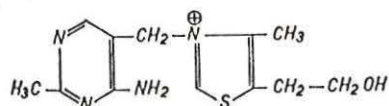
Projectleider: ir P. Hollman

Ⓢ

## 1 VITAMINE B<sub>1</sub>

### 1.1 Inleiding

Vitamine B<sub>1</sub> of thiamine behoort tot de groep der wateroplosbare vitamines en heeft de volgende structuurformule:



In natuurlijk materiaal komt B<sub>1</sub> voor een gering deel als "vrij" thiamine, dat wil zeggen als thiaminezout voor. Het belangrijkste deel is echter gebonden aan andere verbindingen: thiamine-ortho en -pyrofosforzuren esters, thiamine disulfide en fosforzuren esters hiervan, thiamine-eiwitverbindingen.

Thiamine in de vorm van thiaminehydrochloride lost zeer goed op in water. In zuur milieu (pH 2-3) is thiamine relatief stabiel, zelfs bij sterk verhitten en onder inwerking van zuurstof. In alkalisch milieu is het echter onstabiel, vooral bij temperaturen boven 100°C.

### 1.2 METHODES

#### 1.2.1 Fluorimetrische thiochroommethode

Dit is de meest toegepaste methode die berust op de fluorimetrische bepaling van thiochroom dat in alkalisch milieu door oxidatie van thiamine gevormd wordt (1,2,3,4). Noodzakelijk voor deze bepaling is dat het vit. B<sub>1</sub> vrijgemaakt wordt uit zijn verbindingen. Een universeel schema hiervoor is: a) zure hydrolyse b) behandeling met proteolytische enzymen c) eventueel reductie met cysteine om thiamine uit disulfiden vrij te maken d) behandeling met fosfatasen. Onderzocht werd de meest geschikte extraktietechniek voor een groot aantal levensmiddelen (9).

Het aldus vrijgemaakte thiamine wordt in alkalisch milieu geoxideerd met behulp van K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Bij de meting van het ontstane thiochroom moet echter rekening gehouden worden met matrixeffekten: quenching, storing van fluorescerende stoffen anders dan thiochroom.

Traditioneel probeert men deze storingen te verwijderen door vóór de oxidatiestap een kolomzuivering toe te passen met behulp van een kationwisselaar (Decalso, Permutit T) (1,4). De resterende aspecifieke fluorescentie wordt bepaald door in het monster een blanco bepaling uit te voeren zonder oxidatie. Kritiek op deze handelwijze komt van (15) die aantoont dat de quenching nog niet opgeheven is en (16) die bewijst dat op de bovenvermelde wijze inaccurate blanco's verkregen worden, omdat storende bestanddelen door  $K_3Fe(CN)_6$  geoxideerd worden en aspecifieke fluorescentie veroorzaken. Gewezen wordt door (17) op het feit dat de recovery van  $B_1$  van de Decalsokolom onvolledig en variabel is. Verbetering van de blankobepaling is mogelijk als de blankowaarde bepaald wordt in aanwezigheid van  $K_3Fe(CN)_6$  en reagentia die de vorming van thiochroom verhinderen. Hiervoor gebruikt (5) bisulfiet, (20) benzeensulfonylchloride (BSC) en (18) destructie van thiamine door thiaminase of UV licht (9). Alternatieven voor de Decalsokolom worden gegeven door (10,18) waarbij het extract van de enzymatische hydrolyse gezuiverd wordt door te wassen met isobutanol (4,16) en waarbij de blanco bepaald wordt met BSC of bisulfiet en gecorrigeerd wordt voor quenching m.b.v. een interne  $B_1$  standaard.

### 1.2.2 Automatische methodes

Deze zijn gebaseerd op de thiochroommethode en hebben als bijkomend voordeel dat de reaktiekondities konstant zijn waardoor de variatie-coëfficiënt van de bepaling gereduceerd wordt.

1.2.2.1 Methode zonder Decalsozuivering, blankobepaling door weglaten van de oxidatiestap met  $K_3Fe(CN)_6$  meting t.o.v. externe standaard (8, 10, 18) deze laatste geeft een combinatie van de  $B_1$  en de  $B_2$  bepaling. Zuivering geschiedt door het extract na enzymatische hydrolyse te wassen met isobutanol, een stap die alleen bij (10) geautomatiseerd is. De methode werd toegepast op melkprodukten, groente en fruit en graanprodukten en vergeleken met de AOAC handmethode (4). De voorgestelde methode gaf betere resultaten, zowel kwa recovery als standaardafwijking.

1.2.2.2 Methode met Decalsokolom, blanco's door bestraling met UV-licht, meting t.o.v. externe standaard, B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> gekombineerd (9,19). Onderzocht werden een twintigtal produkten, nl. vlees-, visprodukten, melk- zuivelprodukten, deegwaren, groente en fruit. De extraktieprocedure werd hierbij nader onderzocht.

1.2.2.3 Methode zonder Decalsokolom, blanco meting met BSC en interne B<sub>1</sub> standaard (16). Een vergelijking wordt gemaakt met de AOAC hand- methode (4) en methode 1.2.2.1, waarbij graanprodukten, deegwaren, leverpastei en tomatenpuree geanalyseerd werden. De BSC-methode voldeed duidelijk het beste.

### 1.2.3 Polarografie

Polarografische methodes zijn geschikt voor de controle van farmaceutische preparaten en bij levensmiddelen alleen toepasbaar indien verschillende zuiveringsstappen uitgevoerd worden (2). Combinatie van papierchromatografie en polarografie is mogelijk (1).

### 1.2.4 Geïnduceerde natrium azide jodium reactie

Hierbij wordt thiamine geïsoleerd op een Decalso of Amberlite IRC 50 kolom. Het verbruik van I<sub>2</sub> in deze reactie is evenredig aan de hoeveelheid thiamine. De nauwkeurigheid en gevoeligheid van de methode komen overeen met die van de thiochroommethode; maar de methode is sneller en simpeler. De methode werd toegepast op vleesprodukten, (12), de recovery bedroeg 93-99%.

### 1.2.5 GLC

5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazol ontstaat bij inwerking van sulfiet op thiamine. Deze omzetting is kwantitatief (7). Het thiazol kan gaschromatografisch (gepakte kolom, stationaire fase Triton X-305/Ionex 330, FID) bepaald worden. De methode werd ontwikkeld voor zgn. "Pintobonen". Vergelijking met de thiochroommethode leverde variabele resultaten.

### 1.2.6 HPLC

1.2.6.1 Voor vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> in rijstprodukten wordt een HPLC methode beschreven: scheiding op een RP C18 kolom, elutie met ionparing, detectie in UV-gebied (22).

1.2.6.2 Voor graanprodukten wordt een vergelijkbare methode als 1.2.6.1 beschreven (24). Vergelijking met een automatische thiochroom-methode leverde geen significante verschillen.

1.2.6.3 Bepaling van vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> in bloemkool, aardappelprodukten en vlees. Thiamine wordt op de gebruikelijke manier geëxtraheerd (AOAC) en m.b.v. K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> omgezet in thiochroom dat na extractie met isobutanol geïnjecteerd wordt op een RP C8 10 µm kolom. Elutie geschiedt isokratisch met methanol/acetonitril/isobutanol (80/10/10), detektie via fluorescentie (23). Recovery's van 94-105% werden bereikt.

1.2.6.4 Bepaling van vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> in vleesprodukten. Na extractie en omzetting in thiochroom (AOAC) wordt het isobutanolextrakt geïnjecteerd op een silica spherisorb 20 µm kolom en isokratisch geelueerd met chloroform/methanol (90:10), detektie via fluorescentie (14). Recovery van 83-102% worden gerapporteerd. Methode 1.2.6.1 werd ook toegepast op de onderzochte produkten, echter zonder succes omdat de UV detektor niet gevoelig genoeg bleek. Bovendien was de scheiding niet volledig.

#### 1.2.7 Mikrobiologische methoden

Lactobacillus fermenti, Lactobacillus viridescens, Ochromonas danica en Kloeckera brevis worden toegepast bij de mikrobiologische bepaling van thiamine (1,18,3). Een probleem vormt het feit dat de mikroorganismen vaak op dezelfde wijze reageren op de afbraakprodukten van thiamine als op het thiamine zelf (3). Ochromonas en Kloeckera werken specifieker dan de Lactobacilli, maar de bepaling met deze mikroorganismen is bewerkelijker. Van de Lactobacilli is Lactobacillus viridescens het meest specifiek. Gerapporteerd wordt door (18) een vergelijkend onderzoek met de AOAC-handmethode, de AutoAnalyser methode 1.2.2.1 en de mikrobiologische methode met Lactobacillus viridescens, waarbij de mikrobiologische methode de beste resultaten gaf.

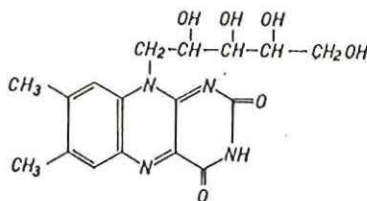
#### 1.2.8 Diverse methoden

Minder specifieke methoden waarvoor hogere detektiegrenzen gelden en die gedeeltelijk eenvoudiger en nauwkeuriger zijn worden door (1) beschreven. Ze zijn alleen geschikt voor de bepaling van thiamine in farmaceutische preparaten.

## 2 VITAMINE B<sub>2</sub>

### 2.1 Inleiding

Vitamine B<sub>2</sub> of riboflavine wordt gerekend tot de groep der wateroplosbare vitamines en wordt gekarakteriseerd door de volgende structuurformule:



Het komt in natuurlijk materiaal bijna alleen in gebonden vorm voor: als fosforzure ester (flavinemononukleotide FMN), als flavineadenine-dinukleotide (FAD) en gebonden aan eiwitten. Riboflavine lost slecht in water op, de oplosbaarheid wordt verhoogd in zwak zuur en zwak alkalisch milieu. Onder invloed van licht wordt riboflavine zeer snel afgebroken, waarbij verhoging temperatuur het afbraakproces versnelt. In alkalisch milieu is het vitamine eveneens weinig stabiel. Verhitten en lucht zuurstof alleen hebben over het algemeen geen invloed.

### 2.2 Methodes

#### 2.2.1 Fluorimetrische methode

Dit is de meest toegepaste chemische methode. Het riboflavine wordt warm geextraheerd in zuur milieu evt. m.b.v. een autoklaaf (2,3,4). Bij deze behandeling worden FAD en FMN volledig gehydrolyseerd. Storingen (eiwitten) worden verwijderd door de pH te verhogen tot 6,5 en daarna met verdund zuur weer te verlagen tot  $\pm$  4,5 (4), of door enzymatische hydrolyse met diastase of clarase waarbij hogere resultaten verkregen worden, waarschijnlijk omdat adsorptief aan eiwitten gebonden fosforzure riboflavine-esters vrijgemaakt worden (2,9).

Bij fruit blijkt het soms noodzakelijk ethyleenglycolmonomethylether toe te voegen om te voorkomen dat riboflavine of thiamine geadsorbeerd worden aan onoplosbaar materiaal (9). Meting van de fluorescentie van het vrije riboflavine geschiedt bij pH 3-5, omdat alleen in dit gebied de fluorescentie onafhankelijk is van de pH. Rekening gehouden moet worden met aspecifieke fluorescentie. Algemeen wordt een clean-up door oxidatie met  $\text{KMnO}_4$  toegepast. (2) Wijst erop dat door deze oxidatie ook nieuwe aspecifieke fluorescentie kan ontstaan. Een extra zuiveringsstap door kolomchromatografie met een kationwisselaar (Permutit T) vóór de oxidatie met  $\text{KMnO}_4$  wordt door (1) beschreven. De restfluorescentie wordt bepaald na reductie van riboflavine met  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (dithioniet). Door (2) wordt opgemerkt dat aangezien  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  een sterk reductiemiddel is fouten kunnen ontstaan als ook aspecifieke fluorescentie vernietigd wordt door  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . Steeds wordt na de extractie een interne standaard  $\text{B}_2$  toegevoegd.

#### 2.2.2 Automatische methodes

Deze zijn gebaseerd op de fluorimetrische methode.

2.2.2.1 Methode voor  $\text{B}_1$  en  $\text{B}_2$  (zie methode 1.2.2.2). De extractie van  $\text{B}_1$  en  $\text{B}_2$  geschiedt met één procedure.  $\text{B}_2$  wordt geextraheerd met pyridine-butanol, blanco's worden bepaald door  $\text{B}_2$  af te breken m.b.v. UV-licht. De methode werd vergeleken met methode 2.2.2.3 waarbij graanprodukten melkpoeder, brood, macaroni en meel geanalyseerd werden met beide methodes. De resultaten waren onderling goed vergelijkbaar.

2.2.2.2 Methode voor  $\text{B}_1$  en  $\text{B}_2$  een extractieprocedure voor  $\text{B}_1$  en  $\text{B}_2$  nl. enzymatische hydrolyse, geen dialyse, reductie van overmaat  $\text{KMnO}_4$  geschiedt met hydroxylaminehydrochloride geen interne standaardmethode (10,13). Tien verschillende soorten babyvoeding werden onderzocht en vergeleken met de AOAC handmethode (4). De variatiecoëfficiënt van de geautomatiseerde methode was kleiner, de recovery bedroeg 100-106%.

2.2.2.3 Methode voor  $\text{B}_2$ , extractieprocedure via een enzymatische hydrolyse, verwijdering storende stoffen door dialyse gevolgd door oxidatie met  $\text{KMnO}_4$  (11,21).



Een vergelijkend onderzoek met deze methode en de AOAC-handmethode, werd uitgevoerd door 16 labs, waarvan 6 labs de automatische methode uitvoerden, gaf voor de 10 onderzochte produkten het verwachte betere resultaat voor de automatische methode.

### 2.2.3 Lumiflavinemethode

Deze methode is specifiekere dan de fluorescentiemethode (1). Ze berust op het principe dat in alkalisch milieu alleen riboflavine, in tegenstelling tot andere flavines, door UV-licht omgezet wordt in lumiflavine waarvan de fluorescentie gemeten kan worden. Het riboflavine wordt warm geextraheerd in zuur milieu (6), evt. m.b.v. een autoklaaf (1) en vrijgemaakt door enzymatische hydrolyse met diastase of clarase. Zuivering geschiedt door uitschudden met chloroform. Bij pH 10-12 wordt riboflavine omgezet door UV-licht in lumiflavine. De omzetting is niet kwantitatief (60-70%), reden waarom een interne standaard toegevoegd wordt. Het lumiflavine wordt geextraheerd met chloroform en de fluorescentie gemeten.

### 2.2.4 HPLC

2.2.4.1 Methode met UV-detektie, zie methode 1.2.6.1 en 1.2.6.2.

2.2.4.2 Bepaling van B<sub>2</sub> in melkprodukten (25). De eiwitten worden neergeslagen met TCA, het waterig extract geïnjecteerd op een ODS-Sil-X-1 kolom en isokratisch geelueerd met water/acetonitril (92/8). Detektie d.m.v. fluorescentie, vrij B<sub>2</sub> en een fosforzure ester van B<sub>2</sub> werden gescheiden.

2.2.4.3 Bepaling van B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> in vleesprodukten (zie methode 1.2.6.4). Het B<sub>2</sub> wordt omgezet in lumiflavine en geextraheerd met chloroform. Het chloroformextract wordt op dezelfde wijze als bij B<sub>1</sub> gechromatografeerd. Recovery's van 82-102% werden gevonden.

2.2.4.4 Zie methode 1.2.6.3. Vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> worden op dezelfde wijze geextraheerd. Het hydrolysaat wordt gezuiverd met chloroform en het waterig extract geïnjecteerd op een Lichrosorb-NH<sub>2</sub> kolom en isokratisch geelueerd met methanol/NaAc buffer pH 4,5 (50:50), detektie via fluorescentie. Recovery's 97-103%.

### 2.2.5 Polarografie

De polarografische methode is vooral geschikt voor de analyse van vitaminepreparaten (1). Voor biologisch materiaal is deze techniek niet geschikt (2).

### 2.2.6 Mikrobiologische methoden

Lactobacillus helveticus (ook wel Lactobacillus casei & genoemd) wordt voor de riboflavine bepaling gebruikt (1). Zetmeel, glycogeen, vrije vetzuren en bepaalde eiwitten storen en moeten vooraf verwijderd worden. De gevoeligheid van riboflavine voor licht en een alkalisch milieu zijn bij de voor de microbiologische methode sterke verdunning zeer storend, zodat de reactie onder uitsluiting van licht moet plaatsvinden en zelfs glaswerk vooraf met zuur gespoeld moet worden.

## 3 DISKUSSIE

De analysemethodes voor vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> (handmethodes) die op dit ogenblik door het RIKILT toegepast worden (5,6) zijn gezien de literatuur een goede keuze. De extractie van B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> zou voor een aantal levensmiddelen nader bekeken moeten worden (9). De geautomatiseerde vit. B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> bepaling biedt een mogelijkheid tot verbetering van zowel de efficiency als betrouwbaarheid van de analyse. Onderzocht zouden moeten worden de BSC variant met interne standaard voor vit. B<sub>1</sub> (16) en de methode met dialyse en KMnO<sub>4</sub> behandeling voor vit. B<sub>2</sub> (21). Er is in de literatuur slechts een beperkt aantal HPLC methodes voor levensmiddelen beschreven. UV detectie biedt voor de gekompliceerde matrix van levensmiddelen geen perspectief. De beschreven methodes bieden nog geen verbetering t.o.v. de automatische methodes. Voor vit. B<sub>1</sub> zal post-column reactie een verbetering opleveren.

## 4 KONKLUSIE

De extractie van vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> dient voor een aantal levensmiddelen nader bekeken te worden. Het is zinvol een automatische methode voor vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> op te starten. HPLC methodes zijn voor de levensmiddelenanalyse nog in een beginstadium.

5 LITERATUUR

1. R. Strohecker, H.M. Henning - Vitamin - Bestimmungen (1963), Verlag Chemie GMBH, Weinheim/Bergstr.
2. Schormüller - Handbuch der Lebensmittel, Analytik der Lebensmittel, Band II/2.Teil (1967), Springer Verlag.
3. Methods of Vitamin Assay, The Association of Vitamin Chemists Inc., third ed. (1966) Interscience Publishers.
4. AOAC, Official Methods of Analysis, (1980) 13th ed., AOAC, Arlington, VA, secs. 43.024-43.030, 43.039-43.043.
5. Publikatieblad EEG, (1973) nr. L 83, 30-31.
6. Voorstel EEG 1323/4/VI/67-D.
7. R.M. Seifert, C.F. Miller, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1973) 56, 1273-1276.
8. J.R. Kirk, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1974), 57, 1081-1084.
9. O. Pelletier, R. Madère, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1977), 60, 140-146.
10. W.E. Dunbar, K.E. Stevenson, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1979), 62, 642-647.
11. D.C. Egberg, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1979), 62, 1041-1044.
12. Food Sci. Techn. A. (1981) 13, 8 S 1327.
13. B.S. Jacobson, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1977), 60, 147-150.
14. C.Y.W. Ang, F.A. Moseley, J. Agric. Food. Chem., (1980), 28, 483-486.

15. H.N. Ridyard, *Analyst*, (1950), 75, 634-650.
16. A.M. Soliman, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, (1981), 64, 616-622.
17. E.L. Phippen, A.L. Potter, *J. Agric. Food. Chem.* (1975), 23, 523-526.
18. D.W. Defibaugh, J.R. Smith, C.E. Weeks, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*(1977), 60, 522-527.
19. O. Pelletier, R. Madère, *J. Food. Sci.* (1975), 40, 374-379.
20. K.L. Muiruri, D.R. Romsos, J.R. Kirk, *Am. J. Clin. Nutr.*, (1974), 27, 837-839.
21. D.C. Egberg, *J. Agric. Food. Chem.* (1975), 23, 815-820.
22. R.B. Torna, M.M. Tabekia, *J. Food Sci.* (1979), 44, 263-266.
23. Bognár, *Deutsche Lebensm. Rundsch.* (1981), 77, 431-436.
24. *Food Sci. Techn. A.* (1981), 13, 8M 809.
25. A.T. Rhys Williams, W. Slavin, *Chrom. News1.* (1977), 5, 9.