

Stofnaam	Vitamine A
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Diervoeders en voormengsels
minimum bepaalbaarheidsgrens	De bepalingsgrens is 2000 IU vitamine A/kg.
Herhaalbaarheid	Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen mag niet meer dan 15% van het hoogste resultaat bedragen.
Reproduceerbaarheid	zie tabel in hoofdstuk 9
Categorie	A
Titel	Bepaling van Vitamine A
EEG-methode	Richtlijn 2000/45/EG van de Commissie van 6 juli 2000 tot vaststelling van communautaire analysemethoden voor de bepaling van het gehalte aan vitamine A, Vitamine E en tryptofaan, Bijlage. Publicatieblad L 174 van 13 juli 2000

Opmerking:

Deze EU- methode wijkt qua voorbereiding af van de reeds gedeponeerde methode (TVM-H1). Dit heeft echter geen invloed op het eindresultaat.

BEPALING VAN VITAMINE A

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van vitamine A (retinol) in diervoeders en voormengsels. Onder vitamine A worden begrepen zuivere *trans*-retinylalcohol en de *cis*-isomeren daarvan die met behulp van deze methode worden bepaald. Het gehalte aan vitamine A wordt uitgedrukt in Internationale Eenheden (IU) per kg. Eén IU komt overeen met de werking van 0,300 µg zuivere *trans*-vitamine-A-alcohol of 0,344 µg zuiver *trans*-vitamine-A-acetaat of 0,550 µg zuiver *trans*-vitamine-A-palmitaat.

De bepalingsgrens is 2000 IU vitamine A/kg.

2. Principe

Het monster wordt gehydrolyseerd met een ethanolische kaliumhydroxide-oplossing en de vitamine A wordt geëxtraheerd in lichtpetroleum. Het oplosmiddel wordt verwijderd door verdamping en het residu wordt opgelost in methanol en, indien noodzakelijk, verdund tot de gewenste concentratie. Het gehalte aan vitamine A wordt bepaald met reversed-phase hogedrukvloeistofchromatografie (RP-HPLC) met UV- of fluorescentiedetectie. De chromatografische parameters worden zodanig gekozen dat er geen scheiding optreedt tussen de zuivere *trans*-vitamine-A-alcohol en de *cis*-isomeren ervan.

3. Reagentia

3.1. Ethanol, $\sigma = 96\%$

3.2. Lichtpetroleum, kooktraject 40°C-60°C

3.3. Methanol

3.4. Kaliumhydroxideoplossing, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$

3.5. Natriumascorbaatoplossing, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (zie opmerkingen 7.7)

3.6. Natriumsulfide, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)

3.6.1. Natriumsulfideoplossing, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ in glycerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (voor $x = 9$) (zie opmerkingen 7.8)

3.7. Fenolftaleïneoplossing, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ in ethanol (3.1)

3.8. 2-propanol

3.9. Mobiele fase voor HPLC: mengsel van methanol (3.3) en water, bijv. 980 + 20 (v + v). De exacte verhouding wordt bepaald door de eigenschappen van de gebruikte kolom.

3.10. Stikstof, zuurstofvrij

- 3.11. Zuiver *trans*-vitamine-A-acetaat, extra gezuiverd, van gecertificeerde werking, bijv. $2,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.11.1. Stockoplossing van zuiver *trans*-vitamine-A-acetaat: weeg op 0,1 mg nauwkeurig 50 mg vitamine-A-acetaat (3.11) af in een maatkolf van 100 ml. Los op in 2-propanol (3.8) en vul met hetzelfde oplosmiddel aan tot de maatstreep. De nominale concentratie van deze oplossing is 1400 IU vitamine A per ml. Het exacte gehalte dient te worden bepaald volgens 5.6.3.1.
- 3.12. Zuiver *trans*-vitamine-A-palmitaat, extra gezuiverd, van gecertificeerde werking, bijv. $1,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.12.1. Stockoplossing van zuiver *trans*-vitamine-A-palmitaat: weeg op 0,1 mg nauwkeurig 80 mg vitamine-A-palmitaat (3.12) af in een maatkolf van 100 ml. Los op in 2-propanol (3.8) en vul met hetzelfde oplosmiddel aan tot de maatstreep. De nominale concentratie van deze oplossing is 1400 IU vitamine A per ml. Het exacte gehalte dient te worden bepaald volgens 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT) (zie opmerkingen: 7.5)

4. Apparatuur

- 4.1. Rotatievacuümverdamer
- 4.2. Bruin glaswerk
 - 4.2.1. Maatkolven of erlenmeyers, 500 ml, met houders van geslepen glas
 - 4.2.2. Maatkolven met stoppen van geslepen glas en een smalle hals, 10, 25, 100 en 500 ml
 - 4.2.3. Scheitrechters, 1000 ml, met stoppen van geslepen glas
 - 4.2.4. Peervormige maatkolven, 250 ml, met houders van geslepen glas
- 4.3. Allihn-condensor, hulslengte 300 mm, met verbindingstuk van geslepen glas en adapter voor gasaanvoerleiding
- 4.4. Geplooid filtreerpapier voor fasescheiding, diameter 185 mm (bijv. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. HPLC-apparatuur met injectiesysteem
 - 4.5.1. Vloeistofchromatografiekolom, 250 mm x 4 mm, C₁₈, vulling van 5 of 10 µm, of een soortgelijke kolom (prestatie criterium: slechts één piek voor alle retinolisomeren onder de HPLC-condities)
 - 4.5.2. UV- of fluorescentiedetector met variabele golflengte
- 4.6. Spectrofotometer met kwartscellen van 10 mm
- 4.7. Waterbad met magneetroerder
- 4.8. Extractieapparatuur (zie figuur 1) bestaande uit:
 - 4.8.1. Glazen cilinder met een inhoud van 1 l, voorzien van een hals en stop van geslepen glas
 - 4.8.2. Inzetstuk van geslepen glas, voorzien van een zijarm en een verstelbare buis door het midden. De verstelbare buis moet een U-vormig benedenuiteinde hebben en een uitstroomopening aan het andere uiteinde, zodat de bovenste vloeistoflaag in de cilinder kan overlopen naar een scheitrechter.

5. Werkwijze

***N.B.:** Vitamine A is gevoelig voor (UV-)licht en oxidatie. Alle bewerkingen moeten plaatsvinden buiten de invloed van licht (met behulp van bruin glaswerk of glaswerk dat is beschermd met aluminiumfolie) en zuurstof (spoelen met stikstof). Tijdens de extractie dient lucht boven de vloeistof te worden vervangen door stikstof (voorkom overdruk door de stop af en toe even los te maken).*

5.1. Bereiding van het monster

Maal het monster zo fijn dat het een zeef met mazen van 1 mm kan passeren, en zorg dat er geen hitte vrijkomt. Het malen dient **onmiddellijk** voorafgaand aan het wegen en verzeppen te geschieden, daar er anders vitamine-A-verliezen kunnen optreden.

5.2. Verzeping

Weeg, afhankelijk van het vitamine-A-gehalte, op 0,01 g nauwkeurig 2 g à 25 g van het monster af in een maatkolf of erlenmeyer van 500 ml (4.2.1). Voeg daar achtereenvolgens al roerend 130 ml ethanol (3.1), circa 100 mg BHT (3.13), 2 ml natriumascorbaatoplossing (3.5) en 2 ml natriumsulfideoplossing (3.6) aan toe. Sluit een condensor (4.3) aan op de maatkolf en dompel de maatkolf in een waterbad met magneetroerder (4.7). Breng het mengsel aan de kook en laat het 5 minuten terugvloeien. Voeg daarna 25 ml kaliumhydroxideoplossing (3.4) toe via de condensor (4.3) en laat het mengsel nog eens 25 minuten terugvloeien, al roerend onder een trage stikstofstroom. Spoel vervolgens de condensor met circa 20 ml water en laat de inhoud van de maatkolf afkoelen tot kamertemperatuur.

5.3. Extractie

Giet de verzepingsoplossing al spoelend met in totaal 250 ml water kwantitatief over in een scheidrecter van 1000 ml (4.2.3) of in de extractieapparatuur (4.8). Spoel de verzepingsmaatkolf achtereenvolgens met 25 ml ethanol (3.1) en 100 ml lichtpetroleum (3.2) en giet het uitspoelsel over in de scheidrecter of de extractieapparatuur. De verhouding van water en ethanol in de gecombineerde oplossingen dient ongeveer 2:1 te zijn. Schud het mengsel krachtig gedurende 2 minuten en laat het daarna 2 minuten staan om het te laten bezinken.

5.3.1. Extractie met behulp van een scheidrecter (4.2.3)

Breng na scheiding van de lagen (zie opmerking 7.3) de lichtpetroleum over in een andere scheidrecter (4.2.3). Herhaal deze extractie tweemaal met 100 ml lichtpetroleum (3.2) en tweemaal met 50 ml lichtpetroleum (3.2).

Was de gecombineerde extracten tweemaal in de scheidrecter onder voorzichtig schudden (om de vorming van emulsies tegen te gaan) met hoeveelheden van 100 ml water en vervolgens onder herhaaldelijk schudden met telkens nieuwe hoeveelheden van 100 ml water, totdat het water kleurloos blijft bij toevoeging van fenoltaleïneoplossing (3.7) (viermaal wassen is gewoonlijk voldoende). Filtreer het gewassen extract door een droog vouwfilter voor fasescheiding (4.4) in een maatkolf van 500 ml (4.2.2) om eventueel aanhangend water te verwijderen. Spoel de scheidrecter en het filter met 50 ml lichtpetroleum (3.2), vul tot de maatstreep aan met licht- petroleum (3.2) en meng goed.

5.3.2. Extractie met behulp van extractieapparatuur (4.8)

Vervang na scheiding van de lagen (zie opmerking 7.3) de stop van de glazen cilinder (4.8.1) door het inzetstuk van geslepen glas (4.8.2) en plaats het U-vormige benedenuiteinde van de verstelbare buis zodanig dat het zich juist boven het niveau van het scheidingsvlak bevindt. Breng, onder toepassing van druk uit een stikstofleiding op de zijarm, de bovenste laag licht- petroleum over in een scheitrechter van 1000 ml (4.2.3). Voeg 100 ml licht- petroleum (3.2) toe aan de glazen cilinder, doe de stop erop en schud goed. Wacht tot de lagen zijn gescheiden en breng de bovenste laag over in de scheitrechter zoals beschreven. Herhaal de extractieprocedure nog eens met 100 ml lichtpetroleum (3.2) en daarna tweemaal met hoeveelheden van telkens 50 ml lichtpetroleum (3.2) en breng de lagen lichtpetroleum over in de scheitrechter.

Was de gecombineerde lichtpetroleumextracten zoals beschreven in 5.3.1 en ga verder te werk zoals daar beschreven.

5.4. Bereiding van de monsteroplossing voor HPLC

Pipetteer een fractie van de lichtpetroleumoplossing (uit 5.3.1 of 5.3.2) in een peervormige maatkolf van 250 ml (4.2.4). Damp het oplosmiddel in tot het bijna droog is met de rotatievacuümverdamer (4.1) bij gereduceerde druk en een badtemperatuur van hoogstens 40°C. Herstel de atmosferische druk door toevoer van stikstof (3.10) en verwijder de maatkolf uit de rotatievacuümverdamer. Verwijder het resterende oplosmiddel met een stikstofstroom (3.10) en los het residu onmiddellijk op in een bekend volume (10-100 ml) methanol (3.3) (de concentratie vitamine A dient in het gebied van 5 IU/ml tot 30 IU/ml te liggen).

5.5. HPLC-bepaling

Vitamine A wordt afgescheiden in een C₁₈ reversed-phase kolom (4.5.1) en de concentratie wordt gemeten door middel van een UV-detector (325 nm) of fluorescentiedetector (excitatie: 325 nm, emissie: 475 nm) (4.5.2).

Injecteer een fractie (bijv. 20 µl) van de oplossing in methanol die is verkregen in 5.4 en elueer met de mobiele fase (3.9). Bereken de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van diverse injecties van dezelfde monsteroplossing en de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van diverse injecties van de ijkoplossingen (5.6.2).

HPLC-condities

De volgende condities worden als leidraad aangegeven; andere parameters mogen worden gebruikt op voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

HPLC-kolom (4.5.1):	250 mm x 4 mm, C ₁₈ , 5 of 10 µm vulling, of een soortgelijke kolom
Mobiele fase (3.9):	Mengsel van methanol (3.3) en water bijv. 980 + 20 (v + v).
Elutiesnelheid:	1-2 ml/min
Detector (4.5.2):	UV-detector (325 nm) of fluorescentiedetector (excitatie: 325 nm / emissie: 475 nm)

5.6. IJking

5.6.1. Bereiding van de standaard-werkoplossingen

Pipetteer 20 ml van de vitamine-A-acetaat-stockoplossing (3.11.1) of 20 ml van de vitamine-A-palmitaat-stockoplossing (3.12.1) in een maatkolf of erlenmeyer van 500 ml (4.2.1) en hydrolyseer zoals beschreven onder 5.2, echter zonder toevoeging van BHT. Extraheer vervolgens met lichtpetroleum (3.2) volgens 5.3 en vul tot 500 ml aan met lichtpetroleum (3.2). Damp 100 ml van dit extract in tot het bijna droog is met de rotatievacuümverdamer (zie 5.4), verwijder het resterende oplosmiddel met een stikstofstroom (3.10) en los het residu opnieuw op in 10,0 ml methanol (3.3). De nominale concentratie van deze oplossing is 560 IU vitamine A per ml. Het exacte gehalte dient te worden bepaald volgens 5.6.3.3. De standaard-werkoplossing moet vóór gebruik vers worden bereid.

Pipetteer 2,0 ml van deze standaard-werkoplossing in een maatkolf van 20 ml, vul tot de maatstreep aan met methanol (3.3) en meng. De nominale concentratie van deze **verdunde** standaard-werkoplossing is 56 IU vitamine A per ml.

5.6.2. Bereiding van de ijkoplossingen en tekenen van de ijklijn

Breng 1,0, 2,0, 5,0 en 10,0 ml van de **verdunde** standaard-werkoplossing over in een reeks maatkolven van 20 ml, vul tot de maatstreep aan met methanol (3.3) en meng. De nominale concentraties van deze oplossingen zijn 2,8, 5,6, 14,0 en 28,0 IU vitamine A per ml.

Injecteer diverse malen 20 µl van iedere ijkoplossing en bepaal de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten). Maak met de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten) een ijklijn, rekening houdend met de resultaten van de UV-controle (5.6.3.3).

5.6.3. UV-standaardisatie van de standaardoplossingen

5.6.3.1. Vitamine-A-acetaat-stockoplossing

Pipetteer 2,0 ml van de vitamine-A-acetaat-stockoplossing (3.11.1) in een maatkolf van 50 ml (4.2.2) en vul tot de maatstreep aan met 2-propanol (3.8). De nominale concentratie van deze oplossing is 56 IU vitamine A per ml. Pipetteer 3,0 ml van deze verdunde vitamine-A-acetaatoplossing in een maatkolf van 25 ml en vul tot de maatstreep aan met 2-propanol (3.8). De nominale concentratie van deze oplossing is 6,72 IU vitamine A per ml. Meet het UV-spectrum van deze oplossing tegen 2-propanol (3.8) in de spectrofotometer (4.6) tussen 300 nm en 400 nm. Het extinctiemaximum moet tussen 325 nm en 327 nm liggen.

Berekening van het vitamine-A-gehalte:

$$\text{IU vitamine A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E \begin{array}{l} 1\% \\ 1 \text{ cm} \end{array} \text{ voor vitamine-A-acetaat} = 1530 \text{ bij } 326 \text{ nm in 2-propanol} \right)$$

5.6.3.2. Vitamine-A-palmitaat-stockoplossing

Pipetteer 2,0 ml van de vitamine-A-palmitaat-stockoplossing (3.12.1) in een maatkolf van 50 ml (4.2.2) en vul tot de maatstreep aan met 2-propanol (3.8). De nominale concentratie van deze oplossing is 56 IU vitamine A per ml. Pipetteer 3,0 ml van deze verdunde vitamine-A-palmitaatoplossing in een maatkolf van 25 ml en vul tot de maatstreep aan met 2-propanol (3.8). De nominale concentratie van deze oplossing is 6,72 IU vitamine A per ml. Meet het UV-spectrum van deze oplossing tegen 2-propanol (3.8) in de spectrofotometer (4.6) tussen 300 nm en 400 nm. Het extinctiemaximum moet tussen 325 nm en 327 nm liggen.

Berekening van het vitamine-A-gehalte:

$$\text{IU vitamine A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E \begin{array}{l} 1\% \\ 1 \text{ cm} \end{array} \text{ voor vitamine-A-palmitaat} = 957 \text{ bij } 326 \text{ nm in 2-propanol} \right)$$

5.6.3.3. Vitamine-A-standaard-werkoplossing

Pipetteer 3,0 ml van de **onverdunde** vitamine-A-standaard-werkoplossing die is bereid volgens 5.6.1 in een maatkolf van 50 ml (4.2.2) en vul tot de maatstreep aan met 2-propanol (3.8). Pipetteer 5,0 ml van deze oplossing in een maatkolf van 25 ml en vul tot de maatstreep aan met 2-propanol (3.8). De nominale concentratie van deze oplossing is 6,72 IU vitamine A per ml. Meet het UV-spectrum van deze oplossing tegen 2-propanol (3.8) in de spectrofotometer (4.6) tussen 300 nm en 400 nm. Het extinctiemaximum moet tussen 325 nm en 327 nm liggen.

Berekening van het vitamine-A-gehalte:

$$\text{IU vitamine A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

$$\left(E \begin{array}{l} 1\% \\ 1 \text{ cm} \end{array} \text{ voor vitamine-A-alcohol} = 1821 \text{ bij } 325 \text{ nm in 2-propanol} \right)$$

6. Berekening van de resultaten

Bepaal de concentratie van de monsteroplossing in IU/ml uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de vitamine-A-pieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.6.2).

Het vitamine-A-gehalte w in IU/kg van het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1000}{\text{[IU/kg]}}$$

$$V_1 \cdot m$$

waarin:

- β = vitamine-A-concentratie van de monsteroplossing (5.4) in IU/ml
- V_1 = volume van de monsteroplossing (5.4) in ml
- V_2 = volume van de in 5.4 genomen fractie in ml
- m = massa van het monster in g

7. Opmerkingen

- 7.1. Voor monsters met een lage vitamine-A-concentratie kan het dienstig zijn de lichtpetroleumextracten van twee verzepingsfracties (gewogen hoeveelheid: 25 g) voor de HPLC-bepaling te combineren tot één monsteroplossing.
- 7.2. Het gewicht van het monster voor de analyse mag niet meer dan 2 g vet bevatten.
- 7.3. Als er geen fasescheiding optreedt, voeg dan circa 10 ml ethanol (3.1) toe om de emulsie te breken.
- 7.4. Met levertraan en andere zuivere vetten dient de verzepingstijd te worden verlengd tot 45-60 minuten.
- 7.5. In plaats van BHT mag ook hydrochinon worden gebruikt.
- 7.6. Met behulp van een normale-fasekolom is de scheiding van retinolisomeren mogelijk.
- 7.7. In plaats van natriumascorbaatoplossing mag ook circa 150 mg ascorbinezuur worden gebruikt.
- 7.8. In plaats van natriumsulfideoplossing mag ook circa 50 mg EDTA worden gebruikt.

8. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen mag niet meer dan 15% van het hoogste resultaat bedragen.

9. Resultaten van een ringonderzoek¹⁾

	Voormengsel	Voormengsel-voeder	Mineraal-concentraat	Proteïne-voeder	Biggen-voeder
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
gem. [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

- L : aantal laboratoria
n : aantal bepalingen
 s_r : standaardafwijking van de herhaalbaarheid
 s_R : standaardafwijking van de reproduceerbaarheid
r: herhaalbaarheid
R; reproduceerbaarheid
 CV_r : variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid
 CV_R : variatiecoëfficiënt vande reproduceerbaarheid

¹⁾ Uitgevoerd door de Werkgroep Diervoeders van het Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)

Figuur 1: Extractieapparatuur (4.8)

