

Stofnaam	Vitamine E
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Diervoeders en voormengsels
minimum bepaalbaarheidsgrens	De bepalingsgrens is 2 mg vitamine E/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 E
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-H2). Dit heeft echter geen invloed op het eindresultaat.

BEPALING VAN VITAMINE E

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van vitamine E in diervoeders en voormengsels. Het gehalte aan vitamine E wordt uitgedrukt in mg DL- α -tocoferolacetaat per kg. 1 mg DL- α -tocoferolacetaat komt overeen met 0,91 mg DL- α -tocoferol (vitamine E).

De bepalingsgrens is 2 mg vitamine E/kg.

2. Principe

Het monster wordt gehydrolyseerd met een ethanolische kaliumhydroxideoplossing en de vitamine E 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 E wordt bepaald door reversed-phase hogedrukvlloeistofchromatografie (RP-HPLC) met fluorescentie- of UV-detectie.

3. Reagentia

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

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

3.3. Methanol

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

3.5. Natriumascorbaatoplossing, $\beta = 10$ g/100 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, $c = 0,5$ mol/l in glycerol, $\beta = 120$ g/l (voor $x = 9$) (zie opmerkingen 7.8)

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

3.8. 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.

3.9. Stikstof, zuurstofvrij

3.10. DL- α -tocoferolacetaat, extra gezuiverd, van gecertificeerde werking

3.10.1. Stockoplossing van DL- α -tocoferolacetaat: weeg op 0,1 mg nauwkeurig 100 mg DL- α -tocoferolacetaat (3.10) af in een maatkolf van 100 ml. Los op in ethanol (3.1) en vul met hetzelfde oplosmiddel aan tot de maatstreep. 1 ml van deze oplossing bevat 1 mg DL- α -tocoferolacetaat. (UV-controle: zie 5.6.1.3; stabilisatie: zie opmerkingen 7.4).

3.11. DL- α -tocoferol, extra gezuiverd, van gecertificeerde werking

3.11.1. Weeg op 0,1 mg nauwkeurig 100 mg DL- α -tocoferol (3.10) af in een maatkolf van 100 ml. Los op in ethanol (3.1) en vul met hetzelfde oplosmiddel aan tot de maatstreep. 1 ml van deze oplossing bevat 1 mg DL- α -tocoferol. (UV-controle: zie

5.6.2.3; stabilisatie: zie opmerkingen 7.4).

3.12. 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, 5 of 10 µm vulling, of een soortgelijke kolom

4.5.2. Fluorescentie- of UV-detector 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 E 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 de 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 verzepen te geschieden, daar er anders vitamine-E-verliezen kunnen optreden.

5.2. Verzeping

Weeg, afhankelijk van het vitamine-E-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 (3.12), 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 scheitrechter 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 scheitrechter 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 scheitrechter (4.2.3)

Breng na scheiding van de lagen (zie opmerking 7.3) de lichtpetroleum over in een andere scheitrechter (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 scheitrechter 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 scheitrechter 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), daarna nog tweemaal met telkens 50 ml licht-petroleum (3.2) en breng de lagen lichtpetroleum over in de scheidtrechter.

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 (3.9) en verwijder de maatkolf uit de rotatievacuümverdamer. Verwijder het resterende oplosmiddel met een stikstofstroom (3.9) en los het residu onmiddellijk op in een bekend volume (10-100 ml) methanol (3.3) (de concentratie DL- α -tocoferol dient in het gebied van 5 $\mu\text{g/ml}$ tot 30 $\mu\text{g/ml}$ te liggen).

5.5. HPLC-bepaling

Vitamine E wordt afgescheiden in een C₁₈ reversed-phase kolom (4.5.1) en de concentratie wordt gemeten door middel van een fluorescentiedetector (excitatie: 295 nm, emissie: 330 nm) of een UV-detector (292 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 (3.8). 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 (3.8):	Mengsel van methanol (3.3) en water bijv. 980 + 20 (v + v).
Elutiesnelheid:	1-2 ml/min
Detector (4.5.2)	Fluorescentiedetector (excitatie: 295 nm / emissie: 330 nm) of UV-detector (292 nm)

5.6. IJking (DL- α -tocoferolacetaat of DL- α -tocoferol)

5.6.1. Standaard-DL- α -tocoferolacetaat

5.6.1.1. Bereiding van de standaard-werkoplossing

Pipetteer 25 ml van de DL- α -tocoferolacetaat-stockoplossing (3.10.1) in een maatkolf of erlenmeyer van 500 ml (4.2.1) en hydrolyseer zoals beschreven onder 5.2. Extraheer vervolgens met lichtpetroleum (3.2) volgens 5.3 en vul tot 500 ml aan met lichtpetroleum. Damp 25 ml van dit extract in tot het bijna droog is met de rotatievacuümverdamer (zie 5.4), verwijder het resterende oplosmiddel met een stikstofstroom (3.9) en los het residu opnieuw op in 25,0 ml methanol (3.3). De nominale concentratie van deze oplossing is 45,5 μg DL- α -tocoferol per ml, overeenkomend met 50 μg DL- α -tocoferolacetaat per ml. De standaard-werkoplossing moet vóór gebruik vers worden bereid.

5.6.1.2. Bereiding van de ijkoplossingen en tekenen van de ijklijn

Breng 1,0, 2,0, 4,0 en 10,0 ml van de 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 2,5, 5,0, 10,0 en 25,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -

tocoferolacetaat, d.w.z. 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml en 22,8 µg/ml DL-α-tocoferol. Injecteer diverse malen 20 µl van iedere ijkoplossing en bepaal de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten). Maak met behulp van de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten) een ijklijn.

5.6.1.3. UV-standaardisatie van de DL-α-tocoferolacetaat-stockoplossing (3.10.1)

Verdun 5,0 ml van de DL-α-tocoferolacetaat-stockoplossing (3.10.1) tot 25,0 ml met ethanol en meet het UV-spectrum van deze oplossing tegen ethanol (3.1) in de spectrofotometer (4.6) tussen 250 nm en 320 nm.

Het absorptiemaximum dient bij 284 nm te liggen:

$$E \begin{matrix} 1\% \\ \\ 1 \text{ cm} \end{matrix} = 43,6 \text{ bij } 284 \text{ nm in ethanol}$$

Bij deze verdunning dient een extinctiewaarde van 0,84 tot 0,88 te worden verkregen.

5.6.2. Standaard-DL-α-tocoferol

5.6.2.1. Bereiding van de standaard-werkoplossing

Pipetteer 2 ml van de DL-α-tocoferol-stockoplossing (3.11.1) in een maatkolf van 50 ml, los op in methanol (3.3) en vul tot de maatstreep aan met methanol. De nominale concentratie van deze oplossing is 40 µg DL-α-tocoferol per ml, overeenkomend met 44,0 µg DL-α-tocoferolacetaat per ml. De standaard-werkoplossing moet vóór gebruik vers worden bereid.

5.6.2.2. Bereiding van de ijkoplossingen en tekenen van de ijklijn

Breng 1,0, 2,0, 4,0 en 10,0 ml van de 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 2,0, 4,0, 8,0 en 20,0 µg/ml DL-α-tocoferol, d.w.z. 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml en 22,0 µg/ml DL-α-tocoferolacetaat. Injecteer diverse malen 20 µl van iedere ijkoplossing en bepaal de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten). Teken met behulp van de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten) een ijklijn.

5.6.2.3. UV-standaardisatie van de DL-α-tocoferol-stockoplossing (3.11.1)

Verdun 2,0 ml van de DL-α-tocoferol-stockoplossing (3.11.1) tot 25,0 ml met ethanol en meet het UV-spectrum van deze oplossing tegen ethanol (3.1) in de spectrofotometer (4.6) tussen 250 nm en 320 nm. Het absorptiemaximum dient bij 292 nm te liggen:

$$E \begin{matrix} 1\% \\ \\ 1 \text{ cm} \end{matrix} = 75,8 \text{ bij } 292 \text{ nm in ethanol}$$

Bij deze verdunning dient een extinctiewaarde van 0,6 te worden verkregen.

6. Berekening van de resultaten

Bepaal de concentratie van de monsteroplossing in $\mu\text{g/ml}$ uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de vitamine-E-pieken van de monsteroplossing (berekend als α -tocopherolacetaat) op basis van de ijklijn (5.6.1.2 of 5.6.2.2).

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

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2}{V_1 \cdot m} \quad [\text{mg/kg}]$$

waarin:

- β = vitamine-E-concentratie van de monsteroplossing (5.4) in $\mu\text{g/ml}$
- 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-E-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. Voeg na de spectrofotometrische meting van de DL- α -tocopherolacetaat-respectievelijk DL- α -tocopheroloplossing volgens 5.6.1.3 of 5.6.2.3 circa 10 mg BHT (3.12) aan de oplossing (3.10.1 of 3.10.2) toe en bewaar de oplossing in een koelkast (maximale houdbaarheid: 4 weken).
- 7.5. In plaats van BHT mag ook hydrochinon worden gebruikt.
- 7.6. Met een normale-fasekolom is het mogelijk α -, β -, γ - en δ -tocopherol van elkaar te scheiden.
- 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	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
gem. [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg] 384	45.3	25.2	13.0	2.3	
r [mg/kg]	1075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R [mg/kg]	830	65.0	55.5	7.8	7.8
R [mg/kg] 2324	182.0	155.4	52.9	21,8	
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

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 van de reproduceerbaarheid

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

Figuur 1: Extractieapparatuur (4.8)

