

september 2004

rapport 893.04

Vaststellen voedings- status aan vitamines en spoorelementen bij melkvee via gerichte bepalingen in koemelk

dr.ir. M.H Bruinenberg

ir. R.M.A.J. Ruijschop (NIZO food research)

dr. G. Ellen (NIZO food research)

ir. C.F.J. van Dongen

nutriënten management instituut nmi bv

postbus 250

6700 ag wageningen

haagsteeg 2-b

6708 pm wageningen

tel. (0317) 46 77 00

fax (0317) 46 77 01

e-mail nmi@nmi-agro.nl

internet www.nmi-agro.nl

© 2004 Wageningen, Nutriënten Management Instituut NMI B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit de inhoud mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, op welke wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de directie van Nutriënten Management Instituut NMI.

Rapporten van NMI dienen in eerste instantie ter informatie van de opdrachtgever. Over uitgebrachte rapporten, of delen daarvan, mag door de opdrachtgever slechts met vermelding van de naam van NMI worden gepubliceerd. Ieder ander gebruik (daaronder begrepen reclame-uitingen en integrale publicatie van uitgebrachte rapporten) is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van NMI.

Disclaimer

Nutriënten Management Instituut NMI stelt zich niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen voortvloeiend uit het gebruik van door of namens NMI verstrekte onderzoeksresultaten en/of adviezen.

Verspreiding

ing. P.R.M. Witlox, Productschap Zuivel

5x

Inhoud

	pagina
Samenvatting en conclusies	3
1 Inleiding	5
1.1 Doel van het project	5
1.2 Vitamine- en spoorelementvoorziening van melkvee	5
1.3 Studieopzet	5
1.4 Toetsing analysemethoden	6
2 Vitamines	8
2.1 Vetoplosbare vitamines (vitamine E)	8
2.1.1 Gehalte in de melk	8
2.1.2 Bepalingsmethoden	9
2.2 Wateroplosbare vitamines	10
2.2.1 Vitamine B1 (thiamine)	10
2.2.2 Vitamine B3 (niacine)	12
2.2.3 Vitamine B10 (foliumzuur)	13
2.2.4 Vitamine B12 (cobalamine)	16
2.2.5 Vitamine H (biotine)	19
2.3 Conclusie vitamines	21
2.3.1 Gehalten in de melk	21
2.3.2 Conclusie bepalingmethoden	22
3 Spoorelementen	24
3.1 Kobalt	24
3.1.1 Gehalte in de melk	24
3.1.2 Bepalingsmethode	24
3.2 Koper	25
3.2.1 Gehalte in de melk	25
3.2.2 Bepalingsmethoden	25
3.3 Jodium	26
3.3.1 Gehalte in de melk	26
3.3.2 Bepalingsmethoden	27
3.4 Selenium	28
3.4.1 Gehalte in de melk	28
3.4.2 Bepalingsmethoden	29
3.5 Conclusie spoorelementen	29
3.5.1 Gehalten in de melk	29
3.5.2 Bepalingsmethoden	30
4 Gehalten van de verschillende vitamines en spoorelementen in het bloed	31
4.1 Vitamines in het bloed	31
4.2 Spoorelementen in het bloed	31
4.3 Conclusies	32
5 Conclusies en aanbevelingen	34
5.1 Conclusies gehalten in de melk	34
5.2 Conclusies bepalingmethoden	34

6	Vervolgonderzoek	37
7	Literatuur	38
Bijlagen		
1a	Werkingsprincipe van de verschillende bepalingsmethoden voor organische stoffen	42
1b	Werkingsprincipe van de verschillende bepalingsmethoden voor kobalt, koper en selenium	45
2	Bestaande, relevante bepalingsmethoden voor vitamines in melk	46
3	Bestaande, relevante bepalingsmethoden voor spoorelementen in melk	49

Samenvatting en conclusies

Voor een goede gezondheid en productie van melkkoeien is een voldoende voorziening met voedingsstoffen een basisvoorwaarde. De voedingsstatus aan vitamines en spoorelementen wordt in de praktijk vaak via een bloedmonster bepaald. Een meer directe weg om inzicht in de voedingsstatus te krijgen, zou zijn via bepalingen in de melk. Echter, er is nog weinig bekend over gehalten van vitamines en spoorelementen in de melk. Bovendien zijn de analysemethoden die voor bloed gebruikt worden niet direct toepasbaar voor melk.

Het doel van deze studie was dan ook tweeledig: ten eerste is gekeken naar de gehalten van vitamines en spoorelementen in de melk, inclusief de mogelijke spreiding en ten tweede is getracht de beste bepalingsmethoden voor de verschillende vitamines en spoorelementen te achterhalen.

In de eerste fase van dit project is een aantal vitamines en spoorelementen uitgekozen om na te gaan of de voedingsstatus van deze componenten meetbaar is in melk. De betreffende vitamines waren vitamine E (tocoferolen), vitamine B1 (thiamine), vitamine B3 (niacine), vitamine B10 (foliumzuur), vitamine B12 (cobalamine) en vitamine H (biotine). De spoorelementen waren kobalt, koper, jodium en selenium.

In Tabel A is voor ieder van deze componenten het gehalte in de melk bij een normale status en de meest geschikte bepalingsmethode weergegeven.

Tabel A. Het gehalte ($\mu\text{g l}^{-1}$) aan de verschillende vitamines en spoorelementen bij een adequate voedingsstatus in de melk en de meest geschikte bepalingsmethode. SPE = solid phase extractie, HPLC = high performance liquid chromatography, ICP = inductief gekoppelde plasma spectrometrie, UV = ultraviolette absorptie en AES = atomaire emissie spectrometrie.

Component	gehalte in melk, $\mu\text{g l}^{-1}$	voorbewerking	bepalingsmethode	
			scheidingsmethode	detectie
vitamine E	580-2000	extractie	HPLC	elektrochemisch
vitamine B1	340-430	derivatisering	HPLC	fluorescentie
vitamine B3	680-980		HPLC	
vitamine B10	45-55	hydrolyse	HPLC	fluorescentie
vitamine B12	3-7	SPE	HPLC	UV
vitamine H	15-40	SPE en derivatisering	HPLC	fluorescentie
koper	rond 150	droge verassing	ICP	AES
kobalt	0,5-0,9	droge verassing	ICP	AES
jodium	tot 700	membraanfiltratie	HPLC	elektrochemisch
selenium	3-21	droge verassing	ICP	AES

Een korte beschrijving van de verschillende manieren van voorbereiding, de scheidingsmethoden en de detectiemethoden is weergegeven in bijlage 1.

In de literatuur is weinig informatie beschikbaar over de gehalten in de melk waarbij tekorten optreden. Mogelijk kunnen tekorten wel afgeleid worden uit de normale gehalten. Bij bijvoorbeeld vitamine E zijn gehalten tussen de 580 en 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$ normaal, maar lagere gehalten komen ook voor. Bij vitamine E liggen de getallen waarbij een tekort opgetreden zou kunnen zijn in elk geval onder de 350 $\mu\text{g l}^{-1}$, bij vitamine B1 onder de 300, bij vitamine B3 onder de 500, bij vitamine B10 onder de 45, bij vitamine B12

onder de 3 en bij vitamine H onder de 20 à 30 $\mu\text{g l}^{-1}$. Ook voor de spoorelementen is het gehalte in de melk waarbij tekorten optreden niet bekend. Voor kobalt zouden gehalten waarbij tekorten optreden in elk geval onder de 0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ liggen, voor koper onder de 120, voor jodium onder de 25 en voor selenium onder de 20 $\mu\text{g l}^{-1}$. Voor zowel de vitamines als voor de spoorelementen geldt echter dat het niet bekend is bij welke gehalten de voedingsstatus daadwerkelijk marginaal zal zijn, maar bij gehalten die boven de genoemde schattingen liggen, zal de voedingsstatus voldoende zijn. Uit de literatuur zijn harde gegevens over een relatie tussen een onvoldoende voedingsstatus en gehalten in de melk niet beschikbaar. Schattingen van tekorten zullen daarom eerst gestaafd moeten worden aan de hand van gehalten in het bloed en eventueel leverbiopten.

Voor geen van de componenten is een analysemethode beschreven waarmee gehalten aan vitamines en spoorelementen snel en eenvoudig bepaald kunnen worden. Vooral matrixeffecten (de aanwezigheid van vetten en eiwitten in melk) en relatief lage gehalten aan vitamines en spoorelementen belemmeren de toepassing van eenvoudige bepalingsmethoden. Op boerderijschaal is het bepalen van gehalten aan vitamines en spoorelementen daarom niet mogelijk, op laboratoriumschaal wel.

Zoals in Tabel A beschreven zijn voor de vitamines E, B1, B3, B10, B12 en H HPLC (high performance liquid chromatography) technieken met elektrochemische, fluorescentie of UV-detectie het meest geschikt. Voor kobalt, koper en selenium is ICP-AES (inductief gekoppelde plasma spectrometrie – atomaire emissiespectrometrie) het meest geschikt. Met deze methode kunnen 10 verschillende spoorelementen in één analyserun simultaan geanalyseerd worden. Alleen voor jodium is deze methode niet geschikt. Hiervoor komt HPLC met elektrochemische detectie het meest in aanmerking.

Voor de toepassing van de verschillende methoden zijn de hoge kosten van de apparatuur en de bewerkelijke en langdurige monstervoorbewerking beperkende factoren voor routinematige bepalingen. Bij een analyse van enkele tientallen monsters, kunnen de kosten geschat worden op € 1.500 per 10 monsters voor kobalt, koper en selenium en € 2.500 per 10 monsters voor de analyse van jodium. Voor vitamines zullen de prijzen vergelijkbaar zijn: enige honderden euro's per vitamine en per monster. Voor routinematig testen in de praktijk is dit te kostbaar. Nieuwe technieken die op korte termijn beschikbaar komen zijn veelal gericht op een verlaging van de detectiegrens. Echter, voor de voorgestelde toepassing is een verlaging van de detectiegrens niet noodzakelijk. De ontwikkeling van goedkopere analysetechnieken is waarschijnlijk wel mogelijk, maar vindt op dit moment niet veel opgang doordat de marktvraag naar deze analyses nog beperkt is. Indien bepalingen in melk voor melkveehouders praktijkrijp worden, zal deze marktvraag wel ontstaan.

Uit deze literatuurstudie is nog geen duidelijk beeld ontstaan over de te verwachte gehalten aan vitaminen en spoorelementen onder Nederlandse omstandigheden. Het verkrijgen van deze informatie is als eerste van belang voor het verder praktijkrijp maken van de voorgestelde bepalingen in melk. Pas dan is er meer duidelijkheid over de noodzaak tot het ontwikkelen van instrumenten / goedkope analysetechnieken om de voedingsstatus van het melkvee te bepalen.

1 Inleiding

1.1 Doel van het project

Voor een goede gezondheid en productie van melkvee is een voldoende voorziening met voedingsstoffen een basisvoorwaarde. De voedingsstatus aan vitamines en spoorelementen bij melkvee wordt in de praktijk vaak via een bloedmonster bepaald. Een mogelijk meer directe weg om inzicht in de voedingstoestand van vitamines en spoorelementen te verkrijgen is via bepalingen in melk. Hiervoor kan, afhankelijk van de fysiologische processen waar een bepaald vitamine of spoorelement invloed op uitoefent, een directe bepaling van de gewenste vitamines of spoorelementen worden gekozen, maar ook een bepaling van een tussenproduct en/of een afbraakproduct kan inzicht geven in de voedingsstatus. Het doel van dit project is het in kaart brengen van de mogelijkheden om via bepalingen in melk de voedingsstatus aan vitamines en spoorelementen bij melkvee vast te stellen. De mogelijkheden zullen voor een aantal vitamines en spoorelementen worden verkend. Dit moet voor een aantal vitamines en spoorelementen leiden tot bepalingsmethoden die gebruikt kunnen worden in de praktijk.

De uitwerking van het project is in drie fasen opgesplitst. In de eerste fase, die reeds voltooid is, is een literatuurstudie naar vitamines en spoorelementen uitgevoerd (Van Dongen *et al.*, 1993). Dit resulteerde in een selectie van stoffen, waarvoor een bepaling in melk relevante informatie kan opleveren. In de tweede fase is gezocht naar de spreiding van de gehalten in de melk en naar geschikte bepalingsmethoden voor de in de eerste fase geselecteerde voedingsstoffen. In de derde fase zal een praktijktoetsing van de gevonden bepalingsmethoden en gehalten in melk plaatsvinden. De derde fase levert naar verwachting een aantal toepasbare bepalingen in koemelk op, die leiden tot een betere gezondheid en een hogere productie van de melkkoe.

Dit rapport is het resultaat van de tweede fase van het gehele project.

1.2 Vitamine- en spoorelementvoorziening van melkvee

In deze literatuurstudie zijn op basis van de in de eerste fase geselecteerde vitamines en spoorelementen (zie Tabel 1.1) de gehalten van de vitamines en spoorelementen geïnventariseerd en is gezocht naar beschikbare bepalingsmethoden in koemelk, zodat mogelijke indicatoren van de in Tabel 1.1 genoemde voedingsstoffen gemeten kunnen worden.

1.3 Studieopzet

Het doel van deze literatuurstudie was het vinden van geschikte bepalingsmethoden in melk voor de in fase 1 (zie Tabel 1.1) geselecteerde voedingsstoffen.

Hierbij is door Nutriënten Management Instituut NMI een inventarisatie uitgevoerd naar de concentraties in de melk waarin de geselecteerde vitamines, spoorelementen en indicatorcomponenten aanwezig kunnen zijn. De spreiding van de gehalten is hierbij van belang, omdat dit aangeeft welke gehalten bij een eventuele test aangetoond moeten kunnen worden. NIZO food research heeft vervolgens onderzocht welke analysemethoden in aanmerking komen voor snelle, gevoelige en financieel haalbare bepalingen van de geselecteerde stoffen in melk.

Tabel 1.1. Overzicht van de in de eerste fase geselecteerde voedingsstoffen (Van Dongen *et al.*, 2003).

Voedingsstof	mogelijke tekorten in praktijk*	relatie met een stof in melk*	spreiding gehalte in melk*	mogelijke indicatorstoffen	opmerkingen
vitamine E (tocoferolen)	+/-	+	+	▪ vitamine E	
vitamine B1 (thiamine)	+	+/-	+	▪ thiamine ▪ α -ketozen	
vitamine B3 (niacine)	+	+	+	▪ N'-methylnicotinamide ▪ N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide	
vitamine B10 (foliumzuur)	+	+/-	+	▪ folaten	niet veel gegevens bekend, wel aanknopingspunten voor vervolgonderzoek
vitamine B12 (cobalamine)	+	+	+	▪ cobalamine	let op analoga
vitamine H (biotine)	+	+	+	▪ vrije biotine	
kobalt	+	+	+	▪ cobalamine	let op analoga
koper	+	+/-	+/-	▪ koper	
jodium	+	+	+	▪ jodium ▪ T ₄ en/of T ₃	jodiumhoudend dipmiddel
selenium	+	+	+	▪ selenium	

* + aanwezig

+/- tegenstrijdige gegevens of onbekend maar wellicht mogelijk

1.4 Toetsing analysemethoden

De geschiktheid van een methode is in de eerste plaats getoetst aan een aantal technische aspecten (prestatiekenmerken), waaronder bepaalbaarheidsgrens (de kleinste hoeveelheid stof of laagste concentratie van de component in het monster die met een bepaalde (en redelijke) statistische waarschijnlijkheid met de analysemethode kwantitatief bepaald kan worden). In de literatuur worden de begrippen bepaalbaarheidsgrens (kwantitatief) en aantoonbaarheidsgrens (kwalitatief) vaak verwisseld. Indien het bepalingen van gehalten aan vitamines en spoorelementen betreft, wordt ervan uitgegaan dat het om de bepaalbaarheidsgrens in plaats van de aantoonbaarheidsgrens gaat, de herhaalbaarheid (mate van spreiding in de analyseresultaten als de analysemethode een aantal malen onder vastgelegde condities op hetzelfde monster wordt uitgevoerd) en de reproduceerbaarheid (de mate van spreiding als de analysemethode onder variabele omstandigheden, dit wil zeggen in verschillende laboratoriumruimten, door verschillende analisten, met verschillende apparaten en batches reagentia/standaarden, op verschillende tijdstippen met grotere tussenpozen wordt uitgevoerd). Van praktisch belang voor het project is de zogenaamde binnenlab reproduceerbaarheid, dat in feite de van dag tot dag variabiliteit in de meetresultaten bij uitvoering in een zelfde laboratorium weergeeft. Bij gehalten van microgrammen per kg ($\mu\text{g/kg}^{-1}$) moet rekening worden gehouden met een binnenlab reproduceerbaarheid van circa 10 procent of meer. Deze prestatiekenmerken zijn afhankelijk van de niveaus van de gehalten waarin de geselecteerde vitamines, spoorelementen en indicatorcomponenten

in melk aanwezig zijn.

Meestal kan een monster niet direct als zodanig worden geanalyseerd, maar is een zogenaamde monstervoorbewerking nodig. Dit kan zijn natte destructie of droge verassing om de organische matrix te verwijderen (bij elementbepalingen) of extractie bij bijvoorbeeld vitaminebepalingen. De hoeveelheid van de aanwezige - of toegevoegde - stof die dan bij de meting wordt teruggevonden wordt de recovery genoemd. Deze wordt uitgedrukt in een percentage van het ideale geval: 100 procent. Bij monsters die een laag gehalte van de te bepalen component bevatten, microgrammen tot milligrammen per kg, wordt een recovery van 80-110 procent als acceptabel beschouwd. Dit is ook het geval voor vitamines en spoorelementen in koemelk. Naast technische aspecten is de geschiktheid van een methode ook getoetst aan de financiële haalbaarheid van een bepaling. De maximaal toelaatbare prijs van een bepaling is afhankelijk van de te verwachten voordelen voor de veehouder. Daarnaast is nagegaan hoe dergelijke metingen in de praktijk uitgevoerd kunnen worden. Hierbij speelt onder andere de vraag of de bepaling op koemelk- of op tankmelkniveau dient te worden uitgevoerd en of het een test is die een veehouder zelf kan doen, dan wel een test die in een laboratorium moet worden uitgevoerd.

Naast de momenteel toegepaste methoden voor de bepaling van de geselecteerde stoffen in melk, is ook weergegeven welke ontwikkelingen in de toekomst te verwachten zijn.

2 Vitamines

2.1 Vetoplosbare vitamines (vitamine E)

Vitamine E wordt in het lichaam met name als anti-oxidant gebruikt en zorgt ervoor dat celmembranen instandgehouden worden. Vitamine E verbetert onder andere de gezondheidsstatus van de uier. Aangezien het vetoplosbaar is, wordt het in melk alleen gebonden aan melkvet uitgescheiden. Net als in het lichaam, is vitamine E ook in de melk belangrijk als anti-oxidant: een verlaagd gehalte verhoogt de kans op oxidatie van vetten.

Vitamine E komt in minstens 8 verschillende vormen voor, bijvoorbeeld α -, β -, γ - en δ -tocopherol (Linder, 1985). In de melk is vitamine E voornamelijk in vrije vorm aanwezig en met name als α -tocopherol (Herrero *et al.*, 2002).

2.1.1 Gehalte in de melk

De opgenomen hoeveelheid vitamine E is afhankelijk van het rantsoen van melkkoeien. Op een rantsoen met veel maïs en droog kuilvoer krijgen de dieren veel minder vitamine E binnen dan tijdens begrazing. In de winter is de opgenomen hoeveelheid vitamine E daardoor vaak lager dan in de zomer. Er is momenteel geen geschikte methode om de vitamine-E-status van melkkoeien te bepalen (Allison & Laven, 2001). Eventueel kan een biopsie van weefsels in het levende dier uitgevoerd worden, maar dit is praktisch niet eenvoudig en bovendien duur. Bemonstering van plasma of serum is de meest gebruikte methode om de vitamine-E-status van melkvee te bepalen, want gehalten in het bloed zijn sterk gecorreleerd met de vitamine-E-opname en de concentratie in de lever. Echter, door bepaalde factoren kan de vitamine-E-concentratie in het bloed ook verstoord worden (stress, cholesterolgehalte in bloed, periode vlak voor afkalven). Vlak voor afkalven zou de α -tocopherolconcentratie in het bloed minstens 3.000-3.500 $\mu\text{g l}^{-1}$ moeten zijn (Weiss, 1998). In andere lactatiestadia zijn de minimumgehalten niet bekend. De gehalten in het bloed zijn vlak voor afkalven normaal gesproken lager dan in andere lactatiestadia (Weiss, 1998). Gehalten zijn dan vaak lager dan vanuit de gezondheidsstatus van het dier gewenst is. Het toedienen van vitamine E tijdens droogstand verlaagt de kans op het ontstaan van klinische mastitis (Bieber Wlaschny, 1988).

Het zou makkelijker zijn om melk te bemonsteren dan bloedplasma, maar de relatie tussen de vitamine-E-status van het dier en de uitscheiding in de melk is complex en bovendien is het waarschijnlijker dat droogstaande koeien een gebrek aan vitamine E hebben dan de lacterende dieren (Allison & Laven, 2001).

De vitamine-E-gehalten in de melk kunnen uitgedrukt worden in de hoeveelheden per liter melk, of in hoeveelheden per gram melkvet. In een studie waarbij het effect van het toedienen van extra vitamine-E-supplementatie bekeken werd, werden gehalten in de melk van 650 μg alpha-tocopherol l^{-1} bij 1.000 IU vitamine E per dag (IU = international unit; volgens de Amerikaanse normen komt 1 IU vitamine E overeen met 1.000 μg all-*rac*- α -tocopherol of 670 μg RRR- α -tocopherol; Weiss, 1998), tot 1.110 μg alpha-tocopherol l^{-1} bij 2.000 IU vitamine E per dag gevonden (Baldi *et al.*, 2000). In het plasma waren de concentraties respectievelijk 3.250 en 4.850 μg α -tocopherol l^{-1} .

Het vitamine-E-gehalte wordt in de meeste studies uitgedrukt per gram melkvet. Het vitamine-E-gehalte moet minstens 25 μg vitamine E g^{-1} melkvet bedragen om de oxidatieve stabiliteit te handhaven (Rajiv *et al.*, 2000). Bij een melkvetgehalte van 4 procent (zoals in meetmelk; CVB, 2002), betekent dit

dat er $970 \mu\text{g l}^{-1}$ melk moet zitten.

Bij een verstrekking van 400 IU vitamine E per dag was het gehalte vitamine E in het melkvet $40\text{--}54 \mu\text{g}$ vitamine E g^{-1} melkvet, oftewel $1.554\text{--}2.097 \mu\text{g}$ vitamine E l^{-1} melk (Atwal *et al.*, 1990). Bij lagere verstrekking (50 IU) was het vitamine-E-gehalte in de melk ook lager: $9,1\text{--}14,4 \mu\text{g mg}^{-1}$ melkvet ($353\text{--}559 \mu\text{g l}^{-1}$) (Atwal *et al.*, 1990). De laagste waarde, $7,7 \mu\text{g mg}^{-1}$ melkvet ($299 \mu\text{g l}^{-1}$) werd aangetroffen bij het voeren van 50 IU vitamine E gecombineerd met calciumzouten (Atwal *et al.*, 1990). In onderzoek, aangehaald door Atwal *et al.* (1990), zijn vergelijkbare waarden en spreidingen gevonden.

Zoals eerder al genoemd, is het vitamine-E-gehalte in de melk afhankelijk van het rantsoen. Op rantsoenen met hooi en silage is het gehalte laag, tot minder dan $25 \mu\text{g g}^{-1}$ melkvet (ongeveer $970 \mu\text{g l}^{-1}$ melk). Nadat grazende dieren in het najaar opgestald zijn, daalt het gehalte ook tot minder dan $30 \mu\text{g g}^{-1}$ melkvet (ongeveer $1165 \mu\text{g l}^{-1}$ melk) terwijl het in de zomer, tijdens begrazing, een stuk hoger is, ongeveer $50 \mu\text{g g}^{-1}$ vet (ongeveer $1942 \mu\text{g l}^{-1}$ melk) (Schingoethe *et al.*, 1978). Weidende koeien hebben over het algemeen hogere vitamine-E-gehalten in de melk dan koeien op silage en hooi. Het gehalte aan vitamine E of α -tocopherolen in de melk zweeft bij een normale vitamine-E-status van het dier dus rond de $1.000 \mu\text{g l}^{-1}$ melk, variërend van 580 tot $2.000 \mu\text{g l}^{-1}$ melk. Bij hoge supplementatie kan het gehalte zelfs nog hoger liggen.

2.1.2 Bepalingsmethoden

De komst van HPLC-methoden heeft klassieke bepalingen van vitamine E via colorimetrie, polarografie, spectrofotometrie en directe fluorescentietechnieken vervangen. Door gebruik te maken van HPLC (zie Bijlage 1), kunnen de verschillende verschijningsvormen van vitamine E (α -, β -, γ -, δ -tocopherolen en tocotrienolen) in melk bepaald worden. Op basis hiervan kan het totale gehalte aan vitamine E in melk geschat worden (Fennema, 1996).

Chemische methoden

Indien verzeeping wordt toegepast om scheiding van vetten en vitamine E te vergemakkelijken, worden de vitamine-E-esters gehydrolyseerd (zie Bijlage 1) tot vrij α -tocopherol. Hierbij moet voorkomen worden dat oxidatie optreedt (Fennema, 1996; De Leenheer *et al.*, 1992). Een snelle methode is ontwikkeld (Hewavitharana & Van Brakel, 1998) om verzeeping toe te passen. Verlies aan vitamines tijdens extractie en HPLC wordt hierbij beperkt door anti-oxidanten toe te voegen en door de HPLC-silica-kolom te pre-conditioneren, zodat irreversibele absorptie van α -tocopherol voorkomen wordt. In de meeste gevallen wordt echter geen verzeeping toegepast bij biologische vloeistoffen zoals bloed, plasma, serum of melk. De reden hiervoor is dat de monstervoorbewerking sneller verloopt en dat er minder verlies aan vitamines plaatsvindt. Een twee-fase vloeistof/vloeistof extractie (zie Bijlage 1) volstaat dan (De Leenheer *et al.*, 1992). Het percentage vitamine E dat na extractie gedetecteerd wordt is hoog (recovery > 90 procent) (Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Detectie en kwantificering via HPLC vindt plaats door meten van UV-absorptie, fluorescentie-intensiteit of elektrochemisch (zie Bijlage 1). Met behulp van UV-absorptie kan elke component met maximale gevoeligheid en selectiviteit gedetecteerd worden op zijn absorptiemaximum. Voor tocoferolen ligt het UV-absorptiemaximum bij $292\text{--}298 \text{ nm}$, voor tocophylesters is dit $276\text{--}285 \text{ nm}$. Fluorescentie is gevoeliger en selectiever dan UV-absorptie. Uit literatuur (De Leenheer *et al.*, 1992) blijkt dat in vergelijking met UV-absorptie meting van tocoferolen met behulp van fluorescentie 2,5-3,3 maal gevoeliger is. Elektrochemische detectie is het meest selectief en gevoelig om tocoferolen te bepalen. De bepaalbaarheidsgrens ligt op $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ melk (Delgado-Zamarreno *et al.*, 1992).

Uit bovenstaande blijkt dat HPLC zeer geschikt is voor het bepalen van het vitamine-E-gehalte in melk.

De bepaalbaarheidsgrens ligt onder de in de literatuur vermelde gehalten aan vitamine E in koemelk (zie Bijlage 2).

Meest geschikte bepalingmethode

In Bijlage 2 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor de bepaling van vitaminegehalten in melk.

Op grond van selectiviteit en gevoeligheid is HPLC met elektrochemische detectie het meest geschikt voor de bepaling van vitamine E in koemelk.

Nieuwe ontwikkelingen

De laatste jaren is de gevoeligheid en selectiviteit van chromatografische methoden sterk verbeterd. HPLC in combinatie met massaspectrometrie (HPLC-MS) of tandem-massaspectrometrie (MS/MS) zijn hier voorbeelden van (De Leenheer *et al.*, 1992) (zie Bijlage 1). Deze nieuwe technieken zijn wel beschikbaar, maar alleen in gespecialiseerde laboratoria. Ze worden nog niet breed routinematig toegepast.

2.2 Wateroplosbare vitamines

2.2.1 Vitamine B1 (thiamine)

Thiamine speelt een rol bij de decarboxylatie van α -ketozen en transketolases (Van Dongen *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Gehalte in de melk

Bij ratten is het thiaminegehalte in de melk afhankelijk van de hoeveelheid thiamine in het rantsoen. Wanneer er geen thiamine in het rantsoen gevoerd werd, was het gehalte aan thiamine in de melk $97 \mu\text{g l}^{-1}$ melk en bij niveaus van 6 mg kg^{-1} voer en meer was de thiamine-excretie in de melk $1.845 \mu\text{g l}^{-1}$ melk (Roth-Maier *et al.*, 1997). Het gemiddelde thiaminegehalte van humane melk is $210 \mu\text{g l}^{-1}$ (FAO & WHO 2002).

Er zijn weinig gegevens beschikbaar over de thiaminegehalten in koemelk. In sommige gevallen neemt de melkproductie toe bij een supplementatie van thiamine in het rantsoen (Shaver & Bal, 2000). Gehalten in de melk zijn in dit onderzoek echter niet gemeten. Gehalten in melk zijn in gewone, niet behandelde melk ongeveer $340\text{--}430 \mu\text{g l}^{-1}$ (Alm, 1982). In het onderzoek van Alm (1982) zijn de gehalten in verse, niet-behandelde koemelk en in gefermenteerde melkproducten gemeten en bovendien zijn er data uit de literatuur verzameld (zonder de referenties te noemen). Het doel van het onderzoek was om na te gaan wat fermentatie van de melk voor yoghurt en andere producten doet met de verschillende B-vitamines in melk.

De getallen van Alm (1982) zijn in overeenstemming met de 300 en $480 \mu\text{g}$ thiamine per liter bulkmelk, zoals genoemd in een review van Gregory (1975).

2.2.1.2 Bepalingsmethoden

Er zijn verschillende zowel microbiologische als chemische methoden (zie Bijlage 1) beschikbaar om het thiaminegehalte te bepalen. Echter, de meeste methoden zijn niet gevalideerd voor bepalingen in melk (Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Microbiologische assays

Bij de microbiologische bepaling van thiamine wordt gebruik gemaakt van het gegeven dat bepaalde

micro-organismen, bijvoorbeeld *Lactobacillus fermenti* en *Lactobacillus viridescens*, thiamine nodig hebben als groeifactor. Desalniettemin moeten de fosfaatesters door het enzym thiamine pyrofosfokinase worden omgezet in vrij thiamine (Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Deze methode is niet gevalideerd in melk. Bovendien zijn de resultaten van deze microbiologische methode in vergelijking met HPLC-fluorescentie, tijdrovend, minder goed reproduceerbaar en standaardiseerbaar (De Leenheer *et al.*, 1992).

Chemische methoden

Sinds een aantal jaren wordt met name HPLC toegepast om het thiaminegehalte in urine en melk te bepalen (Fennema, 1996; De Leenheer *et al.*, 1992). Isolatie van thiamine vindt meestal plaats door verhitting van melk in een verdunde zuuroplossing, zodat hydrolyse optreedt. Om het totale gehalte aan thiamine te bepalen, wordt het gebufferde extract met fosfatasen behandeld, zodat fosfaatesters enzymatisch gehydrolyseerd worden tot vrij thiamine. Bij HPLC met “post-column” derivatisering (zie Bijlage 1) van niet-thiamine fluoroforen wordt door behandeling met een oxidant thiamine omgezet in sterk fluorescerend thiochroom, dat goed te detecteren is. De fluorescentie-intensiteit van thiochroom is evenredig met het totale gehalte aan thiamine.

Het totale gehalte thiamine kan ook bepaald worden door HPLC met “pre-column” derivatisering. Hierbij wordt thiamine pre-column omgezet in thiochroom, waarna chromatografie plaatsvindt met fluorimetrische detectie.

Afzonderlijke fosfaatesters van thiamine kunnen gelijktijdig door middel van HPLC bepaald worden (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999; Laukkanen *et al.*, 1988). Uit literatuur (Gauch *et al.*, 1992) blijkt dat toepassing van HPLC met fluorescentie geschikt is voor bepalingen in melk. De bepaalbaarheidsgrens van deze methode is $5 \mu\text{g l}^{-1}$.

Uit bovenstaande blijkt dat HPLC in combinatie met fluorescentie geschikt is voor het bepalen van het thiaminegehalte in melk. De bepaalbaarheidsgrens ligt ruimschoots onder de in de literatuur vermelde gehalten aan thiamine in koemelk (zie Bijlage 2). Bovendien is het percentage thiamine dat na extractie gemeten wordt hoog (recovery: 92-98 procent) (Gauch *et al.*, 1992).

Uit een onderzoek van Albalá-Hurtado *et al.* (1997) blijkt dat in vloeibare en poedervormige zuigelingenvoeding het gehalte aan toegevoegd thiamine bepaald kan worden door middel van ion-pair reversed-phase HPLC met UV-detectie. Deze methode is snel, eenvoudig en betrouwbaar en wordt toegepast voor de gelijktijdige bepaling van nicotinamide, thiamine, riboflavine, pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine, cyanocobalamine en foliumzuur. De bepaalbaarheidsgrens varieert van 30 tot $250 \mu\text{g l}^{-1}$. Een vergelijkbare methode is ontwikkeld door Woollard & Indyk (2002), voor snelle en gelijktijdige bepaling van zowel het gehalte aan thiamine, riboflavine, pyridoxine als nicotinamide in verrijkte zuigelingenvoeding. Deze methoden zijn niet zondermeer toepasbaar voor koemelk. In het geval van verrijkte melk zijn de vitaminegehalten aanzienlijk hoger. Bovendien hebben de toegevoegde vitamines vaak een andere chemische structuur, die minder complex is dan die van de natuurlijke vitamines in koemelk. Voor toepassing op koemelk moeten de methoden aangepast worden, waarbij het monster in de voorbewerking geconcentreerd moet worden en conjugaten vrijgemaakt moeten worden. Vanwege de complexe melkmatrix en relatief lage gehalten aan aanwezige vitamines, lijkt dit geen aantrekkelijke aanpak.

In fase één van dit project werd verondersteld dat een tekort aan thiamine wellicht ook aan uitscheiding van α -ketozuren in melk (Van Dongen *et al.*, 2003) vast te stellen zou zijn. In de literatuur is geen bepalingsmethode voor α -ketozuren in melk gevonden.

Meest geschikte bepalingsmethode

In Bijlage 2 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van vitaminegehaltes in melk. HPLC met fluorescentie detectie is het meest geschikt voor bepaling van het thiamine gehalte in koemelk.

Nieuwe ontwikkelingen

Bepaling van thiamine in melk met behulp van capillaire zone elektroforese (CZE) is een van de nieuwste ontwikkelingen (Vidal-Valverde & Diaz-Pollan, 2000) (zie Bijlage 1). Scheiding vindt plaats op lading en niet op absorptie. Hierbij wordt het monster voorbereid door middel van zuur en enzymatische hydrolyse. Vervolgens vindt CZE plaats waarbij UV-detectie bij 254 nm wordt toegepast. De resultaten van CZE vertonen goede overeenkomst met ion-pair reversed-phase HPLC met post-column derivatisering en fluorescentie detectie. CZE is onder andere beschikbaar bij NIZO food research, maar wordt voor deze toepassing niet gebruikt.

2.2.2 Vitamine B3 (niacine)

Niacine is de directe precursor van de co-enzymen NAD en NADP (Van Dongen *et al.*, 2003) en het omvat nicotinezuur en nicotinamide. De twee vormen hebben dezelfde vitamineactiviteit (Girard, 1998).

2.2.2.1 Gehalte in de melk

Het gemiddelde niacinegehalte van humane melk is $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ en het tryptofaangehalte van humane melk is 210 mg l^{-1} (FAO & WHO, 2002). Tryptofaan is een precursor van niacine. De excretie van niacine-equivalenten in humane melk bedraagt ongeveer $5.000 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ (FAO & WHO, 2002). De niacinestatus van het dier kan ingeschat worden aan de hand van de verhouding tussen de verschillende metabolieten in de urine, met name die tussen 2-pyridone en N'-methyl-nicotamide (FAO & WHO, 2002).

Er is niet veel onderzoek gedaan naar niacinegehalten in koemelk. In onderzoek van Alm (1982) is het gehalte aan nicotinezuur $0,68 \text{ mg l}^{-1}$, het gehalte aan tryptofaan 308 mg l^{-1} en het gehalte aan niacine-equivalenten $5,8 \text{ mg l}^{-1}$. In aangehaalde literatuur was het nicotinezuurgehalte hoger, namelijk $0,93\text{-}0,98 \text{ mg l}^{-1}$; de gehalten aan tryptofaan en niacine-equivalenten worden niet genoemd. Er is geen verklaring gegeven voor het verschil tussen het onderzoek van Alm (1982) en de aangehaalde literatuur.

2.2.2.2 Bepalingsmethoden

Het gehalte aan niacine kan bepaald worden door microbiologische en chemische analysemethoden. Evenals bij de bepaling van het thiaminegehalte zijn de meeste methoden niet gevalideerd voor bepalingen in melk (Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Microbiologische assays

Het gehalte aan niacine kan bepaald worden door middel van microbiologische assays. De verschillende micro-organismen die hiervoor gebruikt worden zijn *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mesenteroides* en *Tetrahymena thermophila* (pyriformis). Van deze micro-organismen wordt vooral *L. plantarum* ingezet, omdat dit micro-organisme reageert op zowel nicotinezuur als nicotinamide. Met name voor de bepaling van het niacinegehalte in urine wordt deze methode toegepast (Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Nadeel is dat deze methode tijdrovend en slecht reproduceerbaar is (De Leenheer *et al.*, 1992).

Chemische methoden

De belangrijkste klassieke chemische methode voor het bepalen van niacine in voedingsmiddelen, is gebaseerd op de König-reactie. Hierbij reageert niacine met cyanogeen bromide, zodat N-gesubstitueerd pyridine ontstaat. Dit wordt vervolgens gekoppeld aan een aromatisch amine, waarbij chromoforen gevormd worden, die colorimetrisch bepaald kunnen worden bij 436 nm (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Deze methode is weinig gevoelig en de benodigde reagentia zijn instabiel (De Leenheer *et al.*, 1992), zodat ze niet geschikt is om niacine in melk te bepalen.

Er zijn verscheidene HPLC-methoden beschreven, voornamelijk reversed-phase HPLC in combinatie met UV-detectie, voor de bepaling van nicotinezuur, nicotinamide en de hieraan gerelateerde metabolieten in urine. De bepaalbaarheidsgrens voor nicotinezuur in urine bedraagt $49 \mu\text{g l}^{-1}$. De Leenheer *et al.* (1992) beschrijven een HPLC-methode om in urine het gehalte aan nicotinamide en N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide gelijktijdig te bepalen. De bepaalbaarheidsgrens voor nicotinamide is $49 \mu\text{g l}^{-1}$. Voor N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide is dat $12 \mu\text{g l}^{-1}$. Met HPLC kan ook het N'-methylnicotinamide bepaald worden. Uit een onderzoek van Shibata (geciteerd in De Leenheer *et al.*, 1992) blijkt dat HPLC met fluorescentie detectie het meest gevoelig is. De bepaalbaarheidsgrens is $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$. Chromatografische bepaling van het gehalte aan de co-enzymen NAD en NADP is niet mogelijk. Deze metabolieten zijn niet stabiel (De Leenheer *et al.*, 1992).

Voor bovengenoemde chemische analysemethoden geldt dat ze alleen gevalideerd zijn voor bepalingen in urine.

Voor bepaling van het niacinegehalte in melk, is een HPLC-methode beschikbaar (pers.com., TNO Voeding, Zeist). Deze methode bepaalt zowel het gehalte aan nicotinamide als nicotinezuur. De bepaalbaarheidsgrens van deze methode is voldoende laag voor bepalingen in melk namelijk $1.000 \mu\text{g l}^{-1}$ (zie Bijlage 2).

Zoals reeds vermeld in paragraaf 2.2.1, kan in vloeibare en poedervormige zuigelingenvoeding het gehalte aan toegevoegd nicotinamide bepaald worden door middel van ion-pair reversed-phase HPLC met UV-detectie (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997; Woollard & Indyk, 2002). De methode is gevoelig, maar kan niet zondermeer toegepast worden op koemelk. Daarvoor moet de methode aangepast worden, waarbij het monster in de voorbereiding geconcentreerd moet worden en conjugaten vrijgemaakt moeten worden. Vanwege de complexe melkmatrix en relatief lage gehalten aan aanwezige vitamines, lijkt dit geen aantrekkelijke aanpak.

Meest geschikte bepalingsmethode

In Bijlage 2 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van vitaminegehalten in melk. HPLC met UV-detectie is het meest geschikt voor bepaling van het thiaminegehalte in koemelk.

Nieuwe ontwikkelingen

Naast de bestaande HPLC-technieken, is bepaling van het gehalte aan niacine in bijvoorbeeld urine met behulp van capillaire zone elektroforese (CZE) een van de nieuwste ontwikkelingen. Na SPE (solid phase extraction) vindt CZE plaats, waarbij UV-detectie bij 254 nm wordt toegepast. De resultaten van CZE vertonen goede overeenkomst met reversed-phase HPLC in combinatie met UV-detectie (Eitenmiller & Landen Jr., 1999). CZE is onder andere beschikbaar bij NIZO food research, maar wordt voor deze toepassing niet gebruikt.

2.2.3 Vitamine B10 (foliumzuur)

Foliumzuur is essentieel voor de overdracht van koolstofatomen en het is betrokken bij het

aminozuurmetabolisme (Van Dongen *et al.*, 2003). Van foliumzuur zijn meer dan 100 actieve vormen, die folaten genoemd worden. Foliumzuur komt in melk voornamelijk als 5-methyl-tetrahydro-foliumzuur voor.

2.2.3.1 Gehalte in de melk

Bij vrouwen zonder foliumzuursupplementatie is de foliumzuurconcentratie in de melk tussen de 82 en 99 $\mu\text{g l}^{-1}$ melk (Mackey & Picciano, 1999). De behoefte van baby's (bij een melkopname van 0,75 liter) ligt op 107 $\mu\text{g l}^{-1}$. Aangezien aangenomen kan worden dat het foliumzuurgehalte in moedermelk voldoende is, zal het gehalte normaal gesproken rond deze hoeveelheid liggen. Het gehalte aan foliumzuurbindende eiwitten in verse koemelk is vergelijkbaar met dat van moedermelk (Areekul *et al.*, 1978). Mogelijk is dan ook het maximale foliumzuurgehalte ongeveer vergelijkbaar.

Bij koeien is de concentratie van foliumzuur in het serum direct gecorreleerd met de hoogte van de supplementatie, maar het gehalte in de melk niet. Dit neemt weliswaar toe nadat een foliumzuurtekort opgeheven wordt, maar zodra er voldoende foliumzuur aanwezig is, stopt de toename en blijft het gehalte rond de 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ (46,0-56,1) zweven (Girard & Matte, 1998). Bij supplementatie van 0 naar 2 mg kg^{-1} lichaamsgewicht nam het gehalte in de melk toe. Echter, bij een toename van de supplementatie van 2 naar 4 mg kg^{-1} lichaamsgewicht waren er geen verschillen meer waarneembaar, waarschijnlijk doordat de concentratie van folaten in de melk gereguleerd wordt door reguleringsmechanismen in de melkklieren. Melk bevat een specifiek, folaatbindend eiwit in overmaat. De excretie van folaten in de melk is hieraan gerelateerd, met als gevolg dat de concentratie van folaten in de melk niet verder omhoog gaat wanneer de maximale bindingscapaciteit van de eiwitten bereikt is (Girard & Matte, 1998). De vrije capaciteit van dit eiwit wordt geschat op 50 $\mu\text{g folaat l}^{-1}$ melk (Túdos *et al.*, 2002). Dit is lager dan de gehalten in humane melk.

Bij dieren die niet of wel met foliumzuur geïnjecteerd werden, hadden de controledieren een foliumzuurconcentratie in de melk van $44,0 \pm 2,3 \mu\text{g l}^{-1}$ en de behandelde koeien van $53,9 \pm 4,8 \mu\text{g l}^{-1}$ (Girard *et al.*, 1995). Bij de controlegroep is de bindingscapaciteit van het eiwit dus blijkbaar niet volledig benut.

In onderzoek van Alm (1982) was het gehalte aan foliumzuur 37 $\mu\text{g l}^{-1}$ en in de aangehaalde literatuur was het iets hoger, 55-59 $\mu\text{g l}^{-1}$. De gehalten in het onderzoek van Alm (1982) lijken aan de lage kant te zijn. Mogelijk zijn de meetmethoden van Alm (1982) afwijkend – hierop wordt in het artikel verder niet ingegaan. Bij Gregory (1975) worden foliumzuurgehalten van 37-72 $\mu\text{g l}^{-1}$ genoemd.

Door de zelfregulerende werking van melk ten aanzien van het folaatgehalte is het moeilijk om tekorten aan folaat in de melk te meten. Echter, waarschijnlijk is de foliumzuurstatus van het dier krap wanneer de bindingscapaciteit van de eiwitten niet volledig benut wordt, dus bij foliumzuurgehalten onder de 45 of 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ melk.

2.2.3.2 Bepalingsmethoden

Een aantal potentieel geschikte technieken zijn beschikbaar om het gehalte aan foliumzuur (folaat) in melk te bepalen. Dit zijn microbiologische, immunochemische (biochemische) en chemische methoden (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Vanwege het grote aantal verschijningsvormen, is de bepaling van foliumzuur complex.

Monstervoorbewerking voor de folaatbepaling bestaat uit het ontleden van de voedselmatrix en de cellulaire structuur door het monster te homogeniseren in een bufferoplossing. Vervolgens wordt het monster verhit (100°C) zodat folaat gescheiden wordt van de folaatbindende eiwitten, worden de enzymen die in staat zijn om de omzetting van folaten te katalyseren geïnactiveerd en wordt het eiwit in

het monster neergeslagen. Door centrifugeren wordt een gezuiverd extract verkregen. Tot slot wordt het extract behandeld met pteroylglutamaat hydrolase ("conjugase"), indien de analysemethode alleen op monoglutamaat of andere kortketenige folaten is gericht (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

In de monstervoorbewerking moet rekening gehouden worden met afbraak van folaat bij verwarming of door aanwezigheid van O₂. Door deze effecten worden te lage gehalten aan (vrij) foliumzuur gemeten (Túdös *et al.*, 2002).

Microbiologische assays

Microbiologische assays vertegenwoordigen de traditionele bepaling van het gehalte aan folaat. Deze methoden zijn gebaseerd op benodigheden voor groei van micro-organismen (*Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* en *Enterococcus hirae*). *P. acidilactici* en *E. hirae* worden meestal niet gebruikt in een voedingsanalyse, omdat ze niet op alle verschijningsvormen van folaat reageren. Daarentegen doet *L. rhamnosus* dit wel en is het daarom geschikt als testorganisme in microbiologische assays om totaal folaat te bepalen (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Nadeel is dat de juistheid en de reproduceerbaarheid van deze methode slecht zijn.

Immunochemische methoden

Zowel eiwitbindingsassays (competitieve binding) als immunoassays worden gebruikt om foliumzuur te bepalen. Het principe van competitieve bindingsassays (ELISA, RIA) bestaat uit competitie tussen folaat in het monster en een enzymgelabeld of met een radio-isotoop gelabeld folaatbindend eiwit. Deze methoden zijn vooral ontwikkeld voor klinisch-chemische doeleinden, maar hebben operationele voordelen in vergelijking met microbiologische assays als snelheid en eenvoud van uitvoering. Voor de analyse van voedingsmiddelen is de toepassing beperkt wegens de geringe selectiviteit, variabele respons en matige overeenkomst met de resultaten van microbiologische assays, met *L. casei* als testorganisme (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999; Indyk *et al.*, 2000).

Biacore heeft een immunochemische techniek ontwikkeld die tot nu toe vooral toegepast wordt om macromoleculaire interacties te karakteriseren. Het principe is gebaseerd op een verwisselbare immunosensor chip, die via een carboxymethyldextran oppervlak wordt geïmmobiliseerd met analyt. Detectie is gebaseerd op "surface plasmon resonance" (SPR), ontstaan uit een verandering in brekingsindex veroorzaakt door ligandbinding.

Vergeleken met andere immunochemische methoden, zijn de voornaamste voordelen van deze instrumentele techniek "real time measurement" dat er geen vereisten zijn met betrekking tot enzym- of radio-isotoop-labeling en verbeterde reproduceerbaarheid. Omdat de techniek gebaseerd is op specifieke antilichaam-antigeen-interacties, is deze doorgaans vrij van potentiële verstoringen in de melkmatrix. De bepaalbaarheidsgrens voor foliumzuur in melk is 1,0 µg l⁻¹. Het percentage foliumzuur dat na extractie gemeten wordt is hoog (recovery: 87-96 procent) (Indyk *et al.*, 2000).

Uit onderzoek van NIZO food research blijkt dat de Biacore kit niet geschikt is om alle vormen van folaat die in melk voorkomen aan te tonen. Gebaseerd op de kruisreactiviteit van de gebruikte antilichamen, wordt 100 procent van het aanwezige foliumzuur, 17 procent dihydro-foliumzuur, circa 8 procent tetrahydro-foliumzuur en > 55 procent 5-methyl-tetrahydro-foliumzuur gedetecteerd. Folinezuur wordt niet gedetecteerd met deze kit. Hierdoor is de kit ongeschikt voor de bepaling van het gehalte aan totaal foliumzuur in rauwe melk (Túdös *et al.*, 2002).

Chemische methoden

Verschillende in de literatuur beschreven HPLC-methoden zijn potentieel geschikt voor het bepalen van

foliumzuur in koemelk. De extractie, de enzymatische voorbehandeling en het zuiveren van het extract zullen geoptimaliseerd moeten worden. Een belangrijke ontwikkeling is het gebruik van affiniteitschromatografie, waarbij de kolom gecoat is met een folaathoudend eiwit. Met HPLC kunnen zowel geëxtraheerde folaten in intacte polyglutamaatvormen worden bepaald of na enzymatische deconjugatie in de monoglutamaat vorm (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Detectie en kwantificering van folaten bij HPLC kan worden gedaan met UV-absorptie, fluorescentie of elektrochemie. Met UV-absorptie bij 280 nm kan een breed spectrum aan folaten worden gemeten; fluorescentie en elektrochemie zijn niet bruikbaar voor alle folaatvormen. UV-detectie is in vergelijking met fluorescentie en elektrochemie minder gevoelig en selectief (De Leenheer *et al.*, 1992; Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Bij fluorescentie-detectie moet de pre-column derivatisering zeer zorgvuldig plaatsvinden om betrouwbare resultaten te krijgen (De Leenheer *et al.*, 1992). Monstervoorbewerking bestaat meestal uit het verwijderen van caseïne door neerslaan en enzymatische omzetting met conjugase van polyfolaten tot monofolaat. Een ionenwisselaar kan gebruikt worden voor preconcentratie en clean-up (van Leeuwen, 1998).

Holt *et al.* (1988) beschrijven een reversed-phase HPLC-methode met fluorescentie detectie voor de bepaling van foliumzuur in melk. Met een bepaalbaarheidsgrens van $1,7 \mu\text{g l}^{-1}$ is deze methode voldoende gevoelig voor foliumzuur in koemelk (zie Bijlage 2) (Holt *et al.*, 1988; Van Leeuwen, 1998). Konings (1999) heeft een vergelijkbare methode voor foliumzuur in melkpoeder ontwikkeld, gebaseerd op reversed-phase HPLC met fluorescentie en diode-arraydetectie. Deze methode is eveneens voldoende gevoelig voor bepaling in melk (bepaalbaarheidsgrens $1 \mu\text{g l}^{-1}$).

Zoals vermeld in paragraaf 2.2.1, kan in vloeibare en poedervormige zuigelingenvoeding het gehalte aan toegevoegd foliumzuur bepaald worden door middel van ion-pair reversed-phase HPLC met UV-detectie (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997). De methode is gevoelig, maar kan niet zondermeer toegepast worden op koemelk. Daarvoor moet de methode aangepast worden, waarbij het monster in de voorbewerking geconcentreerd moet worden en conjugaten vrijgemaakt moeten worden. Vanwege de complexe melkmatrix en relatief lage gehalten aan aanwezige vitamines, lijkt dit geen aantrekkelijke aanpak.

Meest geschikte bepalingsmethode

In Bijlage 2 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van vitaminegehalten in melk. HPLC-methoden zijn voldoende gevoelig en selectief om het gehalte aan foliumzuur in koemelk te bepalen. HPLC met fluorescentie-detectie is het meest geschikt voor bepaling van het foliumzuurgehalte in koemelk.

Nieuwe ontwikkelingen

Verbeteringen van HPLC-analysmethoden richten zich voornamelijk op de detectietechnieken. Met name bij fluorescentie en elektrochemische detectie kunnen gevoeligheid en selectiviteit wellicht nog vergroot worden. Bij toepassing van HPLC-MS kan waarschijnlijk worden volstaan met een minder intensieve monstervoorbewerking. Daarnaast neemt het gebruik van immunoassays steeds meer toe als alternatief voor analytisch-chemische en microbiologische bepalingsmethoden.

2.2.4 Vitamine B12 (cobalamine)

Vitamine B12 is een co-enzym voor methioninesynthase en methylmalonyl-CoA-mutase. Het eerste enzym is nodig voor de vorming van methionine en het tweede is van belang voor de vorming van de actieve isomeer van methylmalonyl-Co, die vervolgens getransformeerd kan worden naar succinyl-CoA. Succinyl-CoA is noodzakelijk voor de citroenzuurcyclus. Vitamine B12 bevat een groep moleculen met

dezelfde biologische activiteit. Al deze moleculen bevatten een kobaltatoom. Naast de actieve moleculen, zijn er ook moleculen met een chemische structuur die erg op vitamine B12 lijkt, maar die niet de biologische activiteit van vitamine B12 hebben: de vitamine B12-analogen (Van Dongen *et al.*, 2003). Deze zijn waarschijnlijk intermediaire vormen geproduceerd gedurende het proces van vitamine-B12-biosynthese (Girard, 1998).

2.2.4.1 Gehalte in de melk

In humane melk zit ongeveer 0,5 µg vitamine B12 l⁻¹ (FAO & WHO, 2002). De excretie in koemelk is ongeveer 3-7 µg l⁻¹ (Underwood & Suttle, 1999). Dit is dus veel hoger dan de excretie in humane melk, mogelijk doordat vitamine B12 bij herkauwers in de pens gemaakt wordt.

Bij herkauwers is de hoeveelheid ruwvoer in het rantsoen van invloed op de productie van vitamine B12 in de pens: op ruwvoerrijke rantsoenen wordt er relatief meer vitamine B12 en worden minder analogen gemaakt (Walker & Elliott, 1972). Het vitamine-B12-gehalte (actieve vorm) in de betreffende studie is, afhankelijk van het lactatiestadium en het ruwvoergehalte, 2,4 tot 7,2 µg l⁻¹. De waarden van Alm (1982) lagen aan de ondergrens van deze getallen, namelijk op 3,1 µg l⁻¹, terwijl in de aangehaalde literatuur het gehalte 4,1-4,5 µg l⁻¹ was (Alm, 1982). In de review van Gregory (1975) worden waarden variërend van 2-18 µg l⁻¹ aangehaald. De getallen zijn het hoogst in verse melk, lager in gepasteuriseerde melk en het laagst in gesteriliseerde melk.

Het is niet duidelijk bij welke gehalten tekorten optreden, maar waarschijnlijk duiden lage gehalten wel tekorten aan vitamine B12 of kobalt aan.

2.2.4.2 Bepalingsmethoden

Om het gehalte aan vitamine B12 te bepalen, worden voedingsmiddelen doorgaans voorbereid door te homogeniseren in een bufferoplossing, gevolgd door incubatie bij verhoogde temperatuur (~60°C), in de aanwezigheid van papaïne (eiwitsplitsend enzym, afkomstig van de papaja) en natriumcyanide. Deze voorbereiding maakt de eiwitgebonden vormen van vitamine B12 (circa 95 procent) los en zet alle cobalaminen om in de vorm van het meer stabiele cyanocobalamine. Omzetting naar cyanocobalaminen verbetert ook de werking van de immuno-assays, die verschil in affiniteit ten opzichte van de verschillende vormen van vitamine B12 vertonen (Fennema, 1996).

Er zijn verschillende methoden in de literatuur beschreven voor het bepalen van vitamine B12 in biologische matrices, zoals HPLC, microbiologische en immunochemische (radio-ligand binding) methoden (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Microbiologische assays

Doorgaans wordt het vitamine-B12-gehalte in voedingsmiddelen bepaald met behulp van microbiologische assays, waarbij gebruik gemaakt wordt van *Lactobacillus delbrueckii* (*leichmannii*) (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Deze methode is gevoelig genoeg om in voedingsmiddelen een vitamine B12 vanaf 5 µg l⁻¹ te bepalen. *L. delbrueckii* reageert op een breed spectrum aan vormen van vitamine B12. Indien het monster hoge concentraties aan deoxyribosiden (nucleosiden in DNA) bevat (> 1 µg ml⁻¹ assay medium), kunnen microbiologische assays met *L. delbrueckii* gevoelig zijn voor verstoring. Dit betekent dat *L. delbrueckii* ook op (biologisch inactieve) vitamine-B12-analoga, deoxyribonucleotiden en deoxyribonucleosiden kan reageren (Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Voorkomen van dergelijke verstoring kan door verdunning van het medium of door te kiezen voor protozoa als testorganisme. Echter het gebruik van *L. delbrueckii* is eenvoudiger (Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Immunochemische methoden

In de literatuur is een competitieve enzym immunoassay beschreven voor vitamine B12 in rauwe melk. Hierbij wordt eerst het cobalamine met KCN omgezet in cyanocobalamine. Na verdunnen (1/10) wordt een assay toegepast die is afgeleid van een commerciële testkit (Ridascreen® van R-Biopharm), die ontwikkeld is voor vitamine-B12-bepalingen in verrijkte voedingsmiddelen. Voor bepaling van vitamine B12 in rauwe melk is deze methode door de slechte reproduceerbaarheid niet betrouwbaar genoeg (Amann, 1999).

Toepassing van radio-ligand bindingsassays met ^{57}Co -gelabeld cyanocobalamine is eveneens niet altijd betrouwbaar om vitamine B12 in voedingsmiddelen te bepalen. De reden hiervoor is dat het gebruikte bindingseiwit zowel aan de actieve vorm van vitamine B12 als aan de biologisch inactieve analoga van vitamine B12 kan hechten. De selectiviteit van deze assays is de laatste jaren sterk verbeterd door gebruik te maken van een vitamine-B12-bindingseiwit (doorgaans porcine intrinsieke factor), dat specifiek is voor de biologisch actieve vormen van vitamine B12 (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Desalniettemin blijkt uit diverse onderzoeken dat de resultaten van deze assays afhankelijk zijn van de verschillende vormen van vitamine B12, die in het voedingsmiddel aanwezig zijn. De assays vertonen namelijk niet voor alle vormen van vitamine B12 dezelfde affiniteit (Eitenmiller & Landen Jr., 1999). Voor bepaling van het totale vitamine-B12-gehalte in voedingsmiddelen zijn deze assays minder geschikt. Voor toepassing in klinische vloeistoffen (serum, bloed, weefsel) zijn deze bepalingsmethoden wel geschikt (Fennema, 1996; Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Recent is de toepassing van de Biacore techniek (zie paragraaf 2.2.3) ook ontwikkeld voor bepaling van het vitamine-B12-gehalte in melk (Indyk *et al.*, 2002). De bepaalbaarheidsgrens voor vitamine B12 in melk is $0,08 \mu\text{g l}^{-1}$. Het percentage cobalamine dat na extractie gemeten wordt is hoog (recovery: 89-106 procent) (Indyk *et al.*, 2002). Vergeleken met microbiologische assays is deze techniek veel gevoeliger. Uit een onderzoek van Indyk *et al.* (2002) bleek dat het vitamine-B12-gehalte in koemelk, bepaald met behulp van de Biacore techniek, $2,0\text{-}8,0 \mu\text{g l}^{-1}$ bedroeg. Uit onderzoek van NIZO food research (Túdös *et al.*, 2002) blijkt dat de voor gesuppleerde voedingsmiddelen ontwikkelde Biacore kits niet makkelijk toe te passen zijn voor de bepaling van natuurlijke vitaminegehalten in melk. De problemen worden niet veroorzaakt door het meetbereik van de analysekits, maar vooral door matrixeffecten (storing) en verschillen in verschijningsvormen van natuurlijke vitaminen; niet alle verschijningsvormen worden gemeten.

Chemische methoden

Hoewel de verschillende vormen van vitamine B12 met HPLC gescheiden kunnen worden, is de detectie voor de lage gehalten in voedingsmiddelen meestal ontoereikend. UV-detectie bij 350 nm na HPLC vereist 10 ng product op de kolom. De relatief hoge bepaalbaarheidsgrens in combinatie met lage, natuurlijke vitamine-B12-niveaus in dierlijke producten, maken de bepaling van het vitamine-B12-gehalte met behulp van HPLC lastig, zelfs wanneer het monster in de voorbewerking wordt geconcentreerd (Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Gauch *et al.* (1992) hebben een geschikte HPLC-methode met UV-detectie ontwikkeld voor bepaling van het vitamine-B12-gehalte in melk. Het percentage cobalamine dat na extractie gedetecteerd wordt is hoog (recovery: 91-99 procent). Deze methode is voldoende gevoelig voor bepalingen in koemelk (bepaalbaarheidsgrens $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$) (zie Bijlage 2).

Zoals reeds vermeld in paragraaf 2.2.1, kan in vloeibare en poedervormige zuigelingenvoeding het gehalte aan toegevoegd cobalamine bepaald worden door middel van ion-pair reversed-phase HPLC met UV-detectie (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997). De methode is gevoelig, maar kan niet zondermeer toegepast worden op koemelk. Daarvoor moet de methode aangepast worden, waarbij het monster in

de voorbewerking geconcentreerd moet worden en conjugaten vrijgemaakt moeten worden. Vanwege de complexe melkmatrix en relatief lage gehalten aan aanwezige vitamines, lijkt dit geen aantrekkelijke aanpak.

Meest geschikte bepalingsmethode

In Bijlage 2 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van vitaminegehalten in melk. HPLC met UV-detectie is het meest geschikt voor bepaling van het cobalaminegehalte in koemelk.

Nieuwe ontwikkelingen

Nieuwe ontwikkelingen liggen met name op het gebied van toepassing van immunoassays als alternatief voor analytisch-chemische en microbiologische bepalingmethoden. Vooral toepassing van de Biacore techniek biedt hiervoor interessante perspectieven (Indyk *et al.*, 2002).

2.2.5 Vitamine H (biotine)

Biotine is essentieel voor de activering van carboxylasen, die de incorporatie van CO₂ in verschillende substraten katalyseren (Van Dongen *et al.*, 2003). Er is maar één biologisch actieve vorm van biotine. In humane melk zijn de biotinegehalten ongeveer 6 µg l⁻¹, waarbij de waarde variëren van 4-7 (FAO & WHO, 2002). De waarden kunnen echter aanzienlijk variëren over 24 uur (Mock *et al.*, 1992). Als indicator voor de biotinestatus in het lichaam wordt normaliter de excretie van biotine in de urine gebruikt (FAO & WHO, 2002). Bij de mens komt een deficiëntie van biotine niet vaak voor (FAO & WHO, 2002). Bij koeien is de kans op biotinetekorten mogelijk ook klein.

2.2.5.1 Gehalte in de melk

Het biotinegehalte in koemelk lijkt beïnvloed te worden door het lactatiestadium. In een vroeg stadium (0-80 dagen na afkalven) was het gehalte in de melk 43 ± 5, in het middenstadium (81-200 dagen na afkalven) was het gehalte 30 ± 4 en in het eindstadium (201-305 dagen na afkalven) was het 38 ± 7 µg l⁻¹ (Higuchi *et al.*, 2003). De biotinegehalten in het serum waren juist het laagst in de eerste periode en het hoogst in de middenperiode, wat waarschijnlijk veroorzaakt is door de hogere uitscheiding in de melk in de eerste en lagere uitscheiding in de melk in de middenperiode. In de droge periode was het biotinegehalte in het serum het laagst, wat geweten wordt aan de voorbereiding van de uitscheiding van colostrum (Higuchi *et al.*, 2003).

Alm (1979) heeft verschillende B-vitamines en vitamine H in de melk gemeten en heeft gegevens uit de literatuur gerapporteerd. Met name bij biotine vindt ze lagere gehalten in de monsters dan in de literatuur genoemd worden. Gehalten in het onderzoek waren 14 µg l⁻¹ en in de aangehaalde literatuur 30-40 µg l⁻¹. Er wordt geen verklaring voor dit verschil gegeven. De biotinegehalten uit de analyses van Alm (1979) zijn ook een stuk lager dan die waargenomen door Higuchi *et al.* (2003).

Het is niet bekend bij welke gehalten in de melk de biotinestatus van het dier onvoldoende is. Dit zou in nader onderzoek gemeten moeten worden.

2.2.5.2 Bepalingsmethoden

Meting van het gehalte aan biotine kan met behulp van microbiologische assays (meestal met *Lactobacillus plantarum*) of met verschillende ligandbinding immunoassays, die avidine als bindingseiwit gebruiken. Verschillende HPLC-methoden zijn eveneens ontwikkeld, maar de toepassing op voedingsmiddelen is nog beperkt.

Microbiologische assays

Traditioneel wordt biotine in voedingsmiddelen bepaald met behulp van microbiologische assays met *Lactobacillus plantarum*. Minder vaak worden ook *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Ochramonas danica*, *Escherichia coli* KS302bio en *Kloeckera apiculata (brevis)* gebruikt. *L. plantarum* is selectiever voor biologisch actieve vormen van biotine dan de overige micro-organismen (Eitenmiller & Landen Jr., 1999). *L. plantarum* is gevoelig genoeg om een biotinegehalte van 0,1 ng absoluut per assay in voedingsmiddelen te bepalen (De Leenheer *et al.*, 1992). Echter, het reageert ook significant op dethiobiotine, de precursor van biotine, waardoor het ware biotinegehalte wordt overschat (Fennema, 1996).

Immunochemische methoden

De hoge affiniteit van avidine voor biotine is toegepast in verschillende eiwitbindingsassays, die gebruik maken van enzymen of radio-isotoop labels. De eerste avidinebindingsassays waren gebaseerd op isotoop verdunningmethoden. Het gehalte biotine werd geschat aan de hand van een bekende hoeveelheid gelabeld biotine, gevolgd, na scheiding van beide soorten, door een bepaling van de specifieke activiteit van het avidinecomplex en/of vrije biotine. [¹⁴C] Biotine, [³H] biotine of een ¹²⁵I-gelabeld derivaat van biotine werden gebruikt. De gevoeligheid is afhankelijk van de specifieke activiteit van het gelabeld biotine en varieert van 20 ng bij [¹⁴C] biotine tot 1 ng bij [³H] biotine en zelfs minder dan 0,1 ng bij de ¹²⁵I-gelabelde afleiding (De Leenheer *et al.*, 1992; Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

Vanwege de toepassing van conventionele enzym eiwitbindingsassay (EPBS) procedures, is het gebruik van radio-ligands om het biotine te bepalen momenteel niet meer nodig. EPBS-methoden zijn echter nog niet uitgebreid toegepast voor voedingsmiddelen (Eitenmiller & Landen Jr., 1999).

In de literatuur is een competitieve enzym immunoassay (EIA) test beschreven voor biotine in rauwe melk. De assay is afgeleid van een commerciële testkit (Ridascreen® van R-Biopharm), die gebruikt wordt voor biotinebepalingen in verrijkte voedingsmiddelen, waarbij voor bepalingen in rauwe melk, de melkmonsters verdund (1/500) moeten worden. Deze methode is met een bepaalbaarheidsgrens van ongeveer 0,3 µg l⁻¹ gevoelig genoeg voor bepaling van het biotinegehalte in melk. Daarnaast is de herhaalbaarheid van de methode relatief goed (Amann, 1999).

Recent is de toepassing van de Biacore techniek (zie paragraaf 2.2.3) ook ontwikkeld voor bepaling van het biotinegehalte in melk (Indyk *et al.*, 2000). De bepaalbaarheidsgrens voor biotine in melk is 0,5 µg l⁻¹. Het percentage biotine dat na extractie gemeten wordt is hoog (recovery: 86-102 procent) (Indyk *et al.*, 2000).

Chemische methoden

Met HPLC kunnen biotine, sulfoxiden, sulfonen en andere biotine analoga efficiënt worden gescheiden. Omdat biotine een lage, niet-specifieke UV-absorptie heeft en geen fluorescentie vertoont kunnen gangbare HPLC-detectoren, als UV en fluorescentie niet gebruikt worden om biotine direct te bepalen (Eitenmiller & Landen Jr., 1999; Konings, 1999).

Omdat biotine vrij voorkomt in de waterige fase van melk kan de monstervoorbewerking beperkt blijven tot het verwijderen van vet en eiwit door middel van neerslaan, gevolgd door preconcentrerend via SPE (solid phase extraction) (Van Leeuwen, 1998).

Door pre- of post-column derivatisering kan een chromofore groep gebonden worden aan biotine, waarna selectieve gevoelige detectie met UV of fluorescentie na HPLC kan plaatsvinden. Met HPLC-fluorescentie detectie kan een bepaalbaarheidsgrens van 5 µg l⁻¹ bereikt worden (De Leenheer *et al.*, 1992; Eitenmiller & Landen Jr., 1999; Lahély *et al.*, 1999). Dit is voldoende gevoelig om het biotinegehalte in koemelk te bepalen (zie Bijlage 2). Bovendien is het percentage biotine dat na extractie

gedetecteerd wordt hoog (recovery: 90-106 procent) (Lahély *et al.*, 1999).

Detectie kan ook met behulp van post-column amperometrische oxidatie van het S-atoom in biotine. In combinatie met HPLC is de bepaalbaarheidsgrens van deze methode relatief hoog, $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (Amann, 1999; Van Leeuwen, 1998) en daarmee niet toereikend voor biotine in koemelk.

Meest geschikte bepalingsmethode

In Bijlage 2 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van vitaminegehalten in melk. HPLC met fluorescentie detectie is het meest geschikt voor bepaling van het biotinegehalte in koemelk.

Nieuwe ontwikkelingen

Nieuwe ontwikkelingen liggen met name op het gebied van toepassing van immunoassays als alternatief voor analytisch-chemische en microbiologische bepalingsmethoden. Toepassing van EIA en de Biacore techniek bieden hiervoor interessante perspectieven (Indyk *et al.*, 2000).

2.3 Conclusie vitamines

2.3.1 Gehalten in de melk

De gehalten van de verschillende vitamines in de melk zijn samengevat in Tabel 2.1.

Gehalten waarbij tekorten optreden, worden in de literatuur niet genoemd. Over het algemeen zullen deze gehalten onder de spreiding liggen zoals dat in de tabel genoemd is.

Bij vitamine E liggen deze getallen in elk geval onder de $350 \mu\text{g l}^{-1}$, bij vitamine B1 getallen onder de 300, bij vitamine B3 onder de 500, bij vitamine B10 onder de 45, bij vitamine B12 onder de 3 en bij vitamine H onder de $20 \mu\text{g l}^{-1}$. Dit zijn voorlopige schattingen, gebaseerd op de normale gehalten in het bloed. Een marginale status van de verschillende vitamines zou ook pas bij veel lagere gehalten op kunnen treden.

Een ander probleem dat bij deze kwantificering optreedt, is dat de gehalten in het onderzoek van Alm (1982) steeds erg laag en mogelijk zelfs te laag lijken te liggen. Bij vitamine B1, B3, B10 en B12 zit Alm (1982) steeds 30-40 procent lager dan de door haarzelf aangehaalde literatuur en bij vitamine H zit ze zelfs meer dan 50 procent lager dan in de aangehaalde literatuur. Voor de vitamines B10, B12 en H is ook andere literatuur gevonden, die over het algemeen ook hogere gehalten aangeeft dan Alm (1982). Met name voor vitamine H lijken de gehalten in het onderzoek van Alm (1982) dusdanig laag te zijn dat ze mogelijk al in het kritieke gebied vallen. Voor de andere vitamines is een mogelijke grens ongeveer op de door haar gevonden gehalten gesteld.

Tabel 2.1. De gehalten ($\mu\text{g l}^{-1}$) aan vitamines of metabolieten in de melk; gehalten en spreiding.

Vitamine	werknaam	diersoort	gehalten	spreiding	type proef	referentie
vitamine E	tocopherol	rund		650-1110		Baldi <i>et al.</i> , 2000
vitamine E		rund	1000			Rajiv <i>et al.</i> , 2000
vitamine E		rund		300-2000		Atwal <i>et al.</i> , 1990
vitamine E		rund		1000-2000		Schingoethe <i>et al.</i> , 1978
vitamine B1	thiamine	rat		100-1900	B1-suppl	Roth-Maier <i>et al.</i> , 1997
		mens	210			FAO & WHO, 2002
		rund	340	± 30		Alm, 1982, analyses
		rund	430			Alm, 1982: uit literatuur
vitamine B3	niacine	mens	1500			FAO & WHO, 2002
	tryptofaan ¹	mens	210 000			FAO & WHO, 2002
	niacine-equi	mens	5000			FAO & WHO, 2002
	nicotinic acid	rund	680	± 100		Alm, 1982 analyses
	tryptofaan ¹	rund	308 000	$\pm 10,0$		Alm, 1982 analyses
	niacine-equi	rund	5800	± 20		Alm, 1982 analyses
	nicotinic acid	rund	930-980			Alm, 1982, uit literatuur
vitamine B10	foliumzuur	mens		82-99		Mackey & Picciano, 1999
		mens	107			FAO & WHO, 2002
	folaten	rund	46,2	37,9-56,1	B10-suppl	Girard & Matte, 1998
	folaten	rund		44 $\pm$ 2,3/ 53,9 $\pm$ 4,8	B10-injectie	Girard <i>et al.</i> , 1995
		rund	37,0	$\pm 8,0$		Alm, 1982, analyses
		rund	55-59			Alm, 1982, uit literatuur
vitamine B12	cobalamine	mens	0,5			FAO & WHO, 2002
		rund		3-7		Underwood & Suttle, 1999
		rund	3,1	$\pm 0,3$		Alm, 1982 analyses
		rund		4,2-4,5		Alm, 1982, uit literatuur
		rund		2,4-7,2	bep/onbep. ruwvoer, ls	Walker & Elliott, 1972
vitamine H	biotine	mens	6	4-7		FAO & WHO, 2002
		rund	37	43 $\pm$ 5/ 30 $\pm$ 4/ 38 $\pm$ 7		Higuchi <i>et al.</i> , 2003
		rund	14,0	$\pm 1,0$		Alm, 1982, analyses
		rund	30-40			Alm, 1982, uit literatuur

¹ Tryptofaan kan omgerekend worden in niacine-equivalenten: 60 mg tryptofaan komt overeen met 1 mg niacine (Alm, 1982).

2.3.2 Conclusie bepalingsmethoden

In de literatuur zijn tal van analysemethoden beschreven voor vitaminebepalingen. Het blijkt echter dat maar een beperkt aantal daarvan voor melk toegepast kan worden. Een aantal is alleen geschikt voor bepalingen in klinische vloeistoffen, zoals urine, serum en bloed.

Toekomstige ontwikkelingen zullen zich moeten toespitsen op verbetering van de snelheid, gevoeligheid

en selectiviteit van bestaande methoden. De traditioneel toegepaste methoden zijn meestal tijdrovend en arbeidsintensief. Als alternatief voor analytisch-chemische en microbiologische bepalingsmethoden neemt het gebruik van immunochemische methoden steeds meer toe. In dit verband bieden EIA en de Biacore techniek interessante perspectieven (Indyk *et al.*, 2000). Uit onderzoek van NIZO food research (Túdös *et al.*, 2002) blijkt dat de voor gesuppleerde voedingsmiddelen ontwikkelde Biacore kits niet gemakkelijk toe te passen zijn voor de bepaling van natuurlijke vitaminegehalten in melk. De problemen worden niet veroorzaakt door het meetbereik van de analysekits. Vooral matrixeffecten en verschillen in verschijningsvormen van natuurlijke vitamines belemmeren toepassing van de kits. Om matrixproblemen te verminderen moeten de monsters zeer sterk worden verdund, of de eiwitten worden neergeslagen. Dit leidt in vele gevallen tot verliezen van de doelstof. Bij vitamine B12 en biotine is het wellicht mogelijk om een voorbewerkingsmethode te ontwikkelen om matrix interferentie te verminderen. De Biacore foliumzuur kit is niet geschikt om alle bestaande vormen van deze vitamine in rauwe melk te bepalen (Túdös *et al.*, 2002).

Een interessante ontwikkeling vormen multi-analysemethoden, waarmee het gehalte van een aantal vitamines gelijktijdig, snel, eenvoudig en betrouwbaar kan worden gemeten (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997; Woollard & Indyk, 2002). Deze multi-methoden (vaak gebaseerd op HPLC) worden meestal toegepast bij verrijkte zuigelingenvoeding. Deze methoden zijn niet zondermeer toepasbaar op koemelk. In met vitamines verrijkte melk zijn de gehalten veel hoger en de toegevoegde vitamines hebben vaak een andere chemische structuur, die minder complex is. Voor toepassing in koemelk moeten deze multi-methoden aangepast worden, waarbij het monster in de voorbewerking geconcentreerd moet worden en conjugaten vrijgemaakt moeten worden. Vanwege de complexe melkmatrix en relatief lage gehalten aan aanwezige vitamine, lijkt dit vooralsnog geen aantrekkelijke aanpak.

3 Spoorelementen

Mineralen komen voor in alle cellen en organen van het dierlijk lichaam, in bepaalde combinaties en concentraties. De concentratie van mineralen en spoorelementen wordt over het algemeen binnen bepaalde grenzen gehouden. Echter, wanneer het rantsoen deficiënt in een bepaald spoorelement is, zal de concentratie in organen en weefsels buiten de grenzen gaan vallen, wat in eerste instantie resulteert in mindere dierprestaties. Bij aanhoudende tekorten kunnen dieren echter ook ziekteverschijnselen gaan vertonen. Tekorten aan bepaalde nutriënten in het rantsoen worden meestal indirect geschat, aan de hand van het rantsoen, of er worden bloedmonsters genomen. Echter, ook met de melk worden mineralen uitgescheiden. Gehalten aan spoorelementen in de melk zijn mogelijk een maat voor een tekort of overmaat van dat spoorelement in het rantsoen. In dit hoofdstuk worden de gehalten en bepalingsmethoden van vier verschillende spoorelementen behandeld: kobalt (Co), koper (Cu), jodium (I) en selenium (Se).

3.1 Kobalt

Kobalt is noodzakelijk voor de groei en vermenigvuldiging van pensbacteriën die onder andere vitamine B12 produceren. Kobalt is een essentieel element van dit vitamine. Wanneer de kobaltstatus van melkkoeien omlaag gaat, gaan de vitamine-B12-gehalten in penssap en bloedserum omlaag (Underwood & Suttle, 1999).

3.1.1 Gehalte in de melk

In melk zit over het algemeen weinig kobalt: het gehalte varieert tussen de 0,5 en 0,9 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Kirchgesser, 1959, volgens Underwood & Suttle, 1999), maar door hoge supplementatie kan het gehalte omhoog gaan. Door supplementatie met kobalt zal tevens het gehalte aan vitamine B12 in de melk omhoog gaan (Underwood & Suttle, 1999). Zowel lage kobaltgehalten als lage vitamine-B12-gehalten in de melk kunnen een indicator zijn van een kobalttekort in het rantsoen. Echter, de grenzen moeten nog vastgesteld worden.

3.1.2 Bepalingsmethode

Baucells *et al.* (1988) hebben een ICP-methode ontwikkeld om het Co-gehalte in melk te bepalen na natte destructie met zuur. In vergelijking met vlam AAS (FAAS) blijkt het percentage Co dat na extractie gemeten wordt door ICP (recovery) op 110 procent te liggen, terwijl dat voor FAAS 105 procent is. Geconcludeerd werd dat zowel ICP als FAAS geschikt zijn om het Co-gehalte in melk te bepalen. Bepaling van het Co-gehalte in melk kan tevens met behulp van GFAAS. In de literatuur is GFAAS toegepast voor geëvaporeerde melk. Het percentage Co dat na extractie gemeten wordt is hoog (recovery: 95 procent). De methode is voldoende gevoelig voor bepaling van het gehalte aan Co in koemelk (bepaalbaarheidsgrens ligt tussen 0,04 en 0,2 $\mu\text{g l}^{-1}$, zie Bijlage 3, Dabeka, 1989). Verder hebben Koops & Klomp (1991) een elektrochemische bepalingsmethode ontwikkeld, gebaseerd op "differential pulse adsorptive cathodic stripping voltammetry". Het principe berust op destructie van het monster met zuur en polarografische bepaling van het Co-gehalte, waarbij een hangende kwikdruppелеlektrode wordt gebruikt. De bepaalbaarheidsgrens van deze methode is voldoende laag, 0,4 $\mu\text{g l}^{-1}$ melk (zie Bijlage 3, Koops & Klomp, 1991).

NIZO food research maakt tegenwoordig gebruik van ICP-AES na droge verassing voor bepaling van het Co-gehalte in melk. De voor Co-detectie typische golflengte die meestal gebruikt wordt is 238,892

nm. Deze methode is voldoende gevoelig voor bepaling van het Co-gehalte in melk (bepaalbaarheidsgrens $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$, zie Bijlage 3, Aljawaheri, 2001). Meer informatie over de bepalingmethode van Co is te vinden in Bijlage 1b.

Meest geschikte bepalingmethode

In Bijlage 3 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van het gehalte aan spoorelementen in melk. ICP is voldoende gevoelig en selectief om het gehalte aan Co in koemelk te bepalen. Bovendien kan bij analyse met behulp van ICP het gehalte aan 10 verschillende spoorelementen in melk in 1 analyserun simultaan worden gemeten. ICP-AES is het meest geschikt voor bepaling van het Co-gehalte in koemelk.

3.2 Koper

Koper is een bestanddeel van een groot aantal enzymen en met name van oxidasen, die betrokken zijn bij stofwisselingsprocessen.

3.2.1 Gehalte in de melk

Bij ratten gaat tijdens de lactatie veel meer koper naar de melkklieren dan tijdens droogstand. Bij droogstaande ratten gaat het meeste koper naar de lever en nieren, bij lacterende dieren gaat 60 procent van het koper naar de melkklieren. De snelheid van opname en de koperinhoud van de melkklieren waren 20 keer hoger tijdens de lactatie. Het kopergehalte van de melk was $3.300 \mu\text{g l}^{-1}$ (Donley *et al.*, 2002).

Er zit nogal wat variatie in koperexcretie tussen diersoorten: de het kopergehalte van koemelk is veel lager dan dat van de ratten in het onderzoek van Donley *et al.* (2002), namelijk $150 \mu\text{g l}^{-1}$ (Underwood & Suttle, 1999). De excretie van koper in de melk gaat omlaag wanneer de hoeveelheid koper in het rantsoen niet toereikend is. Hoe groter het tekort, hoe groter de daling zal zijn. Lacterende dieren hebben overigens geen significant hogere koperbehoefte dan niet-lacterende dieren.

Het grote verschil tussen koeien en ratten kan waarschijnlijk geweten worden aan de grote worpgrootte bij ratten. Ook melk van zeugen heeft een hogere koperconcentratie ($750 \mu\text{g l}^{-1}$) dan die van koeien, vanwege het onderhouden van grote, snel groeiende nesten tijdens een korte lactatieperiode (Underwood & Suttle, 1999).

3.2.2 Bepalingsmethoden

Uit een onderzoek van Jorhem (2000) blijkt dat door vlam AAS (FAAS) na droge verassing het gehalte aan koper in onder andere melkpoeder bepaald kan worden. Gemeten wordt met een lucht-acetyleen brander bij een golflengte van 324,7 nm. De bepaalbaarheidsgrens ligt gemiddeld op $108,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Voor bepaling in koemelk zal deze grens ongeveer een factor 10 lager zijn ($11,0 \mu\text{g l}^{-1}$). Deze bepalingmethode is voldoende gevoelig voor bepaling van het Cu-gehalte in melk (zie Bijlage 3).

Jorhem & Engman (2000) pasten natte destructie met salpeterzuur en waterstofperoxide, onder druk in een afgesloten vat in een microgolfoven, toe. Na verdunnen werd het Cu-gehalte bepaald met behulp van FAAS, ICP-AES en ICP-massaspectrometrie (ICP-MS). Er bleek een goede overeenkomst te zijn tussen AAS na microgolfdestructie en AAS na droge verassing en ook tussen de resultaten van FAAS en ICP-AES / ICP-MS na microgolfdestructie (Jorhem & Engman, 2000; Miller-Ihli, 1996).

Bepaling van het Cu-gehalte in melk kan tevens met behulp van grafietoven AAS (GFAAS). Deze methode is voldoende gevoelig (bepaalbaarheidsgrens $0,04 \mu\text{g l}^{-1}$ melk, zie Bijlage 3, International Dairy Federation, 1992).

NIZO food research maakt gebruik van ICP-AES na droge verassing voor bepaling van het Cu-gehalte in melk. De voor Cu-detectie typische golflengte die meestal gebruikt wordt is 327,396 nm. Deze methode is voldoende gevoelig voor bepaling van het Cu-gehalte in melk (bepaalbaarheidsgrens $0,6 \mu\text{g l}^{-1}$, zie Bijlage 3, Aljawaheri, 2001). Meer informatie over de bepalingsmethode van Cu is te vinden in Bijlage 1b.

Meest geschikte bepalingsmethode

In Bijlage 3 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van het gehalte aan spoorelementen in melk. Bij analyse met behulp van ICP kan het gehalte aan 10 verschillende spoorelementen in melk in 1 analyserun simultaan worden gemeten. ICP-AES is voldoende gevoelig en selectief, zodoende het meest geschikt voor bepaling van het Cu-gehalte in koemelk.

3.3 Jodium

Jodium is een bestanddeel van de schildklierhormonen. Deze regelen de intensiteit van stofwisselingsprocessen van het dier.

3.3.1 Gehalte in de melk

Jodium wordt met name in urine uitgescheiden, maar de jodiumconcentratie in melk is erg gevoelig voor veranderingen in jodiumopname door het dier (Underwood & Suttle, 1999). Het jodiumgehalte in melk van lacterende dieren is afhankelijk van de voedingsstatus van het dier (Underwood & Suttle, 1999). Waarden tot ongeveer $700 \mu\text{g l}^{-1}$ melk worden hierbij gerapporteerd. Gehalten zijn heel variabel. In onderzoek met melkkoeien van Brzoska *et al.* (2000) varieerden de gehalten van $9,51 \mu\text{g l}^{-1}$ melk zonder jodiumsupplementatie, tot $217 \mu\text{g l}^{-1}$ melk bij een supplementatie van 58,3 mg per koe per dag. De excretie in de melk varieerde van 7 procent van de totale opname bij de experimentele groepen, tot 14,3 procent bij de controlegroepen (jodiumsupplementatie van 5,8 mg per dier, Brzoska *et al.*, 2000). De hoeveelheid jodium in het rantsoen wordt suboptimaal geacht als de concentratie in de melk lager is dan $25 \mu\text{g l}^{-1}$. In colostrum moet de concentratie zelf minstens $50 \mu\text{g l}^{-1}$ zijn, omdat hier meer jodium in hoort te zitten dan in gewone melk (Underwood & Suttle, 1999).

In Groot-Brittannië is de gemiddelde jodiumconcentratie in melk $302 \mu\text{g l}^{-1}$ (Anonymous, 1997), wat hoger is dan de maximale jodiumconcentratie in de proef van Brzoska *et al.* (2002). Mogelijk spelen het verschil in dierrantsoen tussen Polen en Groot-Brittannië hierbij een rol. Ook het gebruik van een jodiumhoudende dipmiddelen kan hierbij invloed hebben gehad. Leslie *et al.* (1999) rapporteerden een gemiddelde concentratie van $294 \pm 7,2 \mu\text{g l}^{-1}$ bulkmelk in Ontario. In sommige gevallen werd hierbij een jodiumhoudend dipmiddel gebruikt na het melken. Overigens zit niet in alle dipmiddelen jodium. In jodiumhoudende dipmiddelen zit 0,25-0,5 procent actieve jodium (Anonymous, 1997). Het is onbekend hoeveel van deze dipmiddelen bij de volgende melkbeurt nog op de speen aanwezig zijn en in de melk terechtkomen. Wanneer een dipmiddel met 0,5 procent jodium gebruikt wordt en er twee gram dipmiddel per melkbeurt gebruikt wordt, zal er 0,01 g jodium per dier per melkbeurt gebruikt worden. Bij een gemiddelde melkproductie van 25 kg kan er dan maximaal $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ melk terecht komen. Echter, waarschijnlijk zal het grootste deel van de jodium voor de volgende melkbeurt van de speen verdwenen zijn.

Om een eventueel effect van jodiumhoudende dipmiddelen te vermijden, kan ook het thyroxinegehalte

van de melk gemeten worden. Deze is positief gecorreleerd met het thyroxinegehalte in het plasma (Magdub & Johnson, 1978). Voor de productie van thyroxine in het lichaam en dus voor de excretie in melk, is jodium nodig. Thyroxinegehalten in melk zijn normaliter boven de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ en bij laagproductieve dieren zijn de gehalten hoger dan bij hoogproductieve dieren (Magdub & Johnson, 1978; Magdub *et al.*, 1979). Waargenomen gehalten waren $1,4 \mu\text{g l}^{-1}$ bij een gemiddelde productie van 28,3 kg melk en $1,5 \mu\text{g l}^{-1}$ bij een productie van 16,3 kg melk per dag (Magdub & Johnson, 1978) en $1,07 \mu\text{g l}^{-1}$ bij een productie van 32 kg melk per dag en $1,09 \mu\text{g l}^{-1}$ bij een productie van 19 kg melk per dag (Magdub *et al.*, 1979). Verschillen waren significant in Magdub *et al.* (1979). Bij deze proef werd een groter aantal dieren gebruikt dan bij Magdub & Johnson (1978): 34 versus 22 dieren in de proef.

3.3.2 Bepalingsmethoden

De meest gebruikte methoden om het jodiumgehalte in melk te bepalen zijn HPLC met amperometrische detectie en gaschromatografie na derivatisering. Daarnaast is een flow injectie spectrofotometrische katalytische bepalingmethode beschreven (De Araujo-Nogueira *et al.*, 1998). Deze methode is gebaseerd op de katalytische werking van jodium op de ontkleuring van het FeSCN^{2+} -complex. De bepaalbaarheidsgrens van deze methode is $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ melk. Organische bestanddelen worden eerst verwijderd door middel van droge verassing onder basische condities (KOH). Het percentage jodium dat na extractie gemeten wordt is hoog (recovery: 94,5 - 105 procent) (de Araujo-Nogueira *et al.*, 1998).

Tegenwoordig wordt onder andere ICP-MS na loogextractie toegepast (Fecher *et al.*, 1998). Het principe van ICP-MS na loogextractie bestaat uit destructie van het melkmonster met tetramethylammoniumhydroxide (TMAH) in een afgesloten vat bij 90°C . Hierdoor wordt al het aanwezige jodium omgezet in een oplosbare vorm. Het extract wordt vervolgens verdund, gefiltreerd en geanalyseerd met ICP-MS. Het percentage jodium dat na extractie gemeten wordt (recovery) is circa 100 procent (Fecher, 1998).

ICP-MS heeft vergelijking met de overige methoden een aantal voordelen. Er is geen verlies aan jodium tijdens monstervoorbewerking; jodium wordt specifiek bepaald met MS, de methode is dus vrij van storing van andere elementen. Het percentage jodium dat na extractie gemeten wordt ligt hoger en per bepaling kan een aantal monsters gelijktijdig geanalyseerd worden. ICP-MS is relatief kostbaar (Fecher, 1998).

In tegenstelling tot Co en Cu is ICP-AES niet geschikt voor bepaling van het jodiumgehalte in koemelk. Jodium is een ongevoelig element voor ICP-AES. De structuur van de elektronenwolk van het element is hiervan de oorzaak en de meting wordt gestoord door zink.

Een andere methode die niet routinematig wordt toegepast voor melk, is neutronenactiveringsanalyse (NAA) (Sertl & Malone, 1993). Deze methode is als referentie waardevol, maar vereist een kernreactor en kan alleen in zeer gespecialiseerde laboratoria worden uitgevoerd.

De meest geschikte methode voor bepaling van het jodiumgehalte in melk lijkt HPLC. Sertl & Malone (1993) hebben een HPLC-methode ontwikkeld, waarbij vloeibare melk door een 25 kD membraanfilter wordt geperst om eiwitten en onoplosbare componenten te verwijderen. Jodium in de vorm van jodide wordt vervolgens in het heldere filtraat gescheiden door middel van reversed-phase ion-pair HPLC en selectief elektrochemisch gedetecteerd met behulp van een zilverelektrode met een potentiaal van 0 tot +50 mV. De methode is selectief, gevoelig en snel. De bepaalbaarheidsgrens ligt op $10 \mu\text{g l}^{-1}$ melk en het percentage jodium dat gemeten wordt is hoog (recovery: 87 procent). Het bepalinggebied van deze methode ligt voor melk tussen 20-1.000 $\mu\text{g jodium l}^{-1}$ melk (Sertl & Malone, 1993). Deze methode is voldoende gevoelig voor bepaling van het jodiumgehalte in koemelk (zie Bijlage 3).

De methode van Sertl & Malone wordt als internationale standaard toegepast voor bepaling van het jodiumgehalte in melk door ISO, Nederlands Normalisatie Instituut (NEN) en International Dairy Federation (IDF 167) (NEN, 2000).

Na reactie met een keton, bijvoorbeeld broomaceton, kan het jodiumgehalte in melk ook via GC-ECD (electron capture detection) worden bepaald (zie Bijlage 1). Het percentage jodium dat na extractie gemeten wordt (recovery) ligt tussen 92 en 97 procent. Deze methode is voldoende gevoelig voor bepaling van het jodiumgehalte in koemelk (bepaalbaarheidsgrens $20 \mu\text{g l}^{-1}$ melk, zie Bijlage 3, International Dairy Federation, 1992; pers.com., COZK, Leusden).

Er zijn geen bepalingsmethoden voor thyroxine in melk gevonden. In de artikelen van Magdub & Johnson (1978) en Magdub *et al.* (1979), waarin de thyroxinegehalten in melk gegeven worden, is niet beschreven volgens welke methode thyroxine geanalyseerd was.

Meest geschikte bepalingsmethode

In Bijlage 3 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van het gehalte aan spoorelementen in melk. De internationaal gestandaardiseerde HPLC-methode met elektrochemische detectie is het meest geschikt voor bepaling van het jodiumgehalte in koemelk.

3.4 Selenium

Selenium maakt deel uit van het enzym glutathionperoxidase, dat voorkomt in bloed, organen en weefsels en dat betrokken is bij het onschadelijk maken van peroxiden. Peroxiden ontstaan bij stofwisselingsprocessen en hebben een negatief effect op de stabiliteit van celmembranen, waardoor er makkelijk schade aan weefsels kan ontstaan wanneer, in geval van een Se-tekort, peroxiden niet onschadelijk gemaakt worden.

3.4.1 Gehalte in de melk

De seleniumconcentratie van melk varieerde in onderzoek van Wiewiora *et al.* (2003) van $3,16$ tot $7,04 \mu\text{g l}^{-1}$ melk, bij variërende hoeveelheden in het rantsoen ($1,8$ - $5,3 \text{ mg Se}$ per dag). Relatief werd $2,02$ - $4,35$ procent van de Se-opname uitgescheiden in de melk, waarbij er relatief meer Se in de melk werd uitgescheiden bij een lage opname dan bij een hoge opname (Wiewiora *et al.*, 2003).

De seleniumstatus van melkkoeien kan in principe geschat worden uit Se-gehalten in melk (Conrad & Moxon, 1979; Grace *et al.*, 2001). In de proef van Conrad & Moxon werd een Se-deficiënt rantsoen met verschillende supplementatieniveaus gevoerd en er werd een rantsoen met een adequate Se-status gevoerd. Gehalten in de melk varieerden tussen de 7 en $42 \mu\text{g l}^{-1}$. Bij de rantsoenen met een adequate Se-status was het Se-gehalte van de melk, na een gewenningsperiode, rond de $30 \mu\text{g l}^{-1}$ en hoger, terwijl het gehalte bij de Se-deficiënte rantsoenen steeds, ondanks een supplementatie van maximaal 225 ng g^{-1} , onder de $20 \mu\text{g l}^{-1}$ was (Conrad & Moxon, 1979). Waarschijnlijk was de beschikbaarheid van Se in het voer hoger dan wanneer het als supplement toegediend wordt. De getallen in het onderzoek van Conrad & Moxon (1979) waren veel hoger dan die in het onderzoek van Wiewiora *et al.* (2003). In een Chinees onderzoek waren de gemiddelde Se-concentraties ook hoger dan in de proef van Wiewiora *et al.* (2003), maar lager dan in de behandelingen van Conrad & Moxon met een adequate Se-status: de gemiddelde Se-gehalten op drie bedrijven waren $19,93$, $21,01$ en $13,40 \mu\text{g l}^{-1}$ (Baoxiang, 1993). Se-gehalten in het colostrum kunnen 4 tot 5 keer zo hoog zijn dan in gewone melk (Conrad & Moxon, 1979).

3.4.2 Bepalingsmethoden

In de literatuur is een aantal methoden beschreven om het Se-gehalte in melk te bepalen. Aleixo & Nobrega (2003) hebben voor Se in melk een grafietoven AAS (GFAAS) methode ontwikkeld. Een mengsel van wateroplosbare tertiaire aminen wordt gebruikt om de melk te verdunnen. De monstervoorbewerking met aminen verbetert de herhaalbaarheid en maakt destructie overbodig. De voor Se optimale temperaturen van pyrolyse en atomisatie zijn respectievelijk 1.500 en 2.400°C. Gemeten wordt bij een golflengte van 196,026 nm, waarbij achtergrondcorrectie (D_2 - of Zeemancorrectie) noodzakelijk is. De bepaalbaarheidsgrens van deze methode is $2,5 \mu\text{g l}^{-1}$ melk. Daarnaast is door Cava-Montesinos *et al.* (2003) een methode ontwikkeld, die het Se-gehalte in melk bepaalt met behulp van hydride atoomfluorescentie (HG-AFS), voorafgegaan door microgolfdestructie. Deze methode is zeer gevoelig, bepaalbaarheidsgrens $0,005 \mu\text{g l}^{-1}$. Verder hebben Inam & Somer (2000) een elektrochemische bepalingmethode ontwikkeld, gebaseerd op “differential pulse cathodic stripping voltammetry”. Het principe berust op destructie van het monster met zuur en polarografische bepaling van het Se-gehalte, waarbij een hangende kwikdruppel-elektrode wordt gebruikt. De bepaalbaarheidsgrens van deze methode is $1,2 \mu\text{g l}^{-1}$ melk. Bovenstaande methoden zijn alle voldoende gevoelig voor bepaling van het Se-gehalte in koemelk (zie Bijlage 3). Daarnaast kan ICP-AES na droge verassing voor bepaling van het Se-gehalte in melk worden toegepast. Deze methode is in de literatuur niet beschreven. Volgens de fabrikant van de analyseapparatuur (Varian) is de voor Se-detectie typische golflengte die meestal gebruikt wordt 196,026 nm. ICP-AES is met een bepaalbaarheidsgrens van $5,0 \mu\text{g l}^{-1}$ in principe voldoende gevoelig voor bepaling van het Se-gehalte in koemelk (zie Bijlage 3). Bij Se-gehalten die dicht in de buurt liggen van de bepaalbaarheidsgrens is de meting onnauwkeurig. Meer informatie over de bepalingmethode van Se is te vinden in Bijlage 1b.

Meest geschikte bepalingmethode

In Bijlage 3 staat samengevat welke momenteel toegepaste methoden relevant zijn voor bepaling van het gehalte aan spoorelementen in melk. ICP is in principe voldoende gevoelig en selectief om het gehalte aan Se in koemelk te bepalen. Bovendien kan bij analyse met behulp van ICP het gehalte aan 10 verschillende spoorelementen in melk in 1 analyserun simultaan worden gemeten. ICP-AES lijkt het meest geschikt voor bepaling van het Se-gehalte in koemelk.

3.5 Conclusie spoorelementen

3.5.1 Gehalten in de melk

De gehalten van de verschillende spoorelementen in de melk zijn weergegeven in Tabel 3.1.

Tabel 3.1. De gehalten ($\mu\text{g l}^{-1}$) van kobalt, koper, jodium en selenium in de melk; gemiddelden en spreiding.

Spoor-element	diersoort	gemiddeld in melk	spreiding	Type proef	referentie
kobalt	rund	-	0,5-0,9	metingen	Underwood & Suttle, 1999
koper	rund	150	-	metingen	Underwood & Suttle, 1999
koper	rat	3.300	-	Cu-injectie	Donley <i>et al.</i> , 2002
jodium	rund	302	-	metingen	Anonymous, 2000
jodium	rund	92,8	9,5-217	I-supplementatie	Brzoska <i>et al.</i> , 2000
jodium	rund	294	$\pm 7,2$	metingen	Leslie <i>et al.</i> , 2002
selenium	rund	17,5	7-42	Se-niveau rantsoen	Conrad & Moxon, 1979
selenium	rund	4,95	3,16-7,04	Se-niveau rantsoen	Wiewiora <i>et al.</i> , 2003
selenium	rund	18,1	13,4-21,0 ¹	metingen	Baoxiang, 1993

- = geen getallen gegeven

¹ = spreiding van de drie bedrijven, niet per dier

Voor geen van de spoorelementen is het bekend bij welke gehalte er tekorten optreden. Deze gehalten zouden achterhaald moeten worden aan de hand van de normale status en spreiding en de verschillende beschreven experimenten. Voor kobalt zouden gehalten waarbij tekorten optreden in elk geval onder de $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ liggen, voor koper onder de 120, voor jodium onder de 25 en voor selenium onder de $20 \mu\text{g l}^{-1}$. Dit zijn echter schattingen en de gehalten waarbij daadwerkelijk tekorten optreden zouden ook veel lager kunnen liggen.

3.5.2 Bepalingsmethoden

Zoals uit dit hoofdstuk blijkt, zijn er diverse analysemethoden beschikbaar die geschikt zijn om het gehalte aan spoorelementen in melk te bepalen. Voor de analyse van Co, Cu en Se zijn de meeste van deze methoden gebaseerd op atoomspectrametrische technieken, waaronder vlam AAS, vlamloze AAS, ICP-AES en ICP-MS. Bij analyse met behulp van ICP kan het gehalte aan 10 verschillende spoorelementen in melk in 1 analyserun simultaan worden gemeten. Het gehalte aan jodium kan door middel van HPLC bepaald worden.

4 Gehalten van de verschillende vitamines en spoorelementen in het bloed

In de 3^e fase van dit project zullen de vitamine- en spoorelementenstatus van melkkoeien bekeken worden aan de hand van gehalten in de melk. Uit voorgaande studie is echter gebleken dat het nog niet of nauwelijks bekend is bij welke gehalten aan mineralen of spoorelementen in de melk de status van het dier onvoldoende is. Wanneer bij problemen op melkveebedrijven gedacht wordt aan een tekort aan vitamines of spoorelementen, worden er op het moment meestal monsters van bloed of serum genomen.

Naast bemonstering van de melk in de 3^e fase zal daarom waarschijnlijk ook het bloed van de dieren bemonsterd worden, zodat beide getallen gecombineerd kunnen worden en er meer zekerheid zal ontstaan over het al dan niet te laag zijn van de gehalten in de melk. Aanvullende bepalingen in leverbiopten kan voor een aantal spoorelementen veel extra informatie worden verkregen.

In deze paragraaf is daarom nagegaan bij welke vitamine- of spoorelementgehalten in bloed of serum een dier een tekort heeft.

4.1 Vitamines in het bloed

Er is wel veel onderzoek gedaan naar de toename van gehalten in het bloed bij supplementatie, maar hier zijn niet altijd getallen uit gedestilleerd. Het is dan ook niet van alle vitamines bekend bij welke gehalten in het bloed tekorten op treden.

Bij vitamine E, B10 en B12 is dit wel bekend. Bij vitamine E treden deficiëntiesymptomen op bij 3.400 µg vitamine E l⁻¹ bloed.

Zonder foliumzuursupplementatie is het gehalte folaten in het serum ongeveer 16,7 µg l⁻¹ en met supplementatie 25,3 (2 mg foliumzuur kg⁻¹ lichaamsgewicht) en 35,5 µg l⁻¹ (4 mg foliumzuur kg⁻¹ lichaamsgewicht) (Girard & Matte, 1998). Folaten in de melk waren alleen significant lager bij dieren zonder supplementatie. Bij multipare dieren nam de melkproductie toe bij de toediening van extra foliumzuur, met name bij de hoogste dosis (Girard & Matte, 1998). Hieruit zou afgeleid kunnen worden dat bij folatengehalten onder de 30 µg l⁻¹ serum het dier een foliumzuurstatus heeft die een optimale melkproductie in de weg staat. Echter, aangenomen wordt dat het aanbod van folaten via voeding en synthese in de pens voldoende is om echte foliumzuurdeficiëntie te voorkomen (Girard *et al.*, 1995). Gehalten in het bloed liggen hierbij rond de 15 µg l⁻¹ (Girard *et al.*, 1995).

De benutting van folaten in het bloed is echter deels afhankelijk van de vitamine-B12-status van het dier. Foliumzuur is in bloed aanwezig in een gemethyleerde vorm. Voordat de vitamine gebruikt kan worden, moet het eerst de methylgroep kwijtraken. Hier is vitamine B12 waarschijnlijk bij betrokken. Wanneer er een tekort is aan vitamine B12, vermindert het gebruik van foliumzuur in de cellen doordat de demethylering onderbroken wordt.

Het is dus ook mogelijk dat er veel folaten in het bloed aanwezig zijn, maar dat de benutting ervan laag is vanwege een gebrek aan vitamine B12 (Girard & Matte, 1998).

De vitamine-B12-status van runderen is marginaal bij gehalten in het bloed tussen de 40 en 80 pmol l⁻¹ bloedserum. Dit komt overeen met 0,05-0,11 µg l⁻¹ serum. Voor de vitamines B1, B3 en H is niet gevonden bij welke gehalten in het bloed deficiënties optreden. In vervolgonderzoek zullen de suboptimale gehalten, in samenwerking met de Gezondheidsdienst voor Dieren, achterhaald worden.

4.2 Spoorelementen in het bloed

Kobalt

De waarde waarbij deficiëntiesymptomen optreden kan bij kobalt worden vastgesteld aan de hand van

Vaststellen voedingsstatus aan vitamines en spoorelementen bij melkvee via gerichte bepalingen in koemelk (NMI, 2004)

de vitamine-B12-gehalten in het bloed (Underwood & Suttle, 1999). Dit was bij 0,05-0,11 µg vitamine B12 l⁻¹ serum (Underwood & Suttle, 1999).

Bij kobaltgehalten in de lever tussen de 40-60 µg kg⁻¹ is er sprake van een deficiëntie. Het gewenste kobaltgehalte in de lever ligt tussen de 80-120 µg kg⁻¹ (Underwood & Suttle, 1999).

Koper

Bij koper kan aangehouden worden dat er een tekort optreedt wanneer de kopergehalten in het bloed lager zijn dan 288 µg l⁻¹ plasma of serum, hoewel er wel voorbeelden bekend zijn waarbij gehalten tussen de 191 en 572 µg l⁻¹ wel getolereerd worden (Underwood & Suttle, 1999). Een waarde van 572-953 µg l⁻¹ bloedplasma is normaal (Underwood & Suttle, 1999).

Bij koper is de lever het belangrijkste opslagelement. Een eerste verandering bij tekorten is daar dan ook zichtbaar. De lever geeft daarom een waardevolle index van de koperstatus van het dier en de graad van uitputting - bij gehalten onder de 20 mg kg⁻¹ ds is er een mogelijk risico en bij gehalten onder de 6 mg kg⁻¹ ds is er een hoog risico op kopertekort -, maar het geeft de functionele koperstatus op de kritieke punten niet aan (Underwood & Suttle, 1999). Wanneer de reserves in de lever bijna uitgeput zijn, of niet snel genoeg gemobiliseerd kunnen worden, gaat de eiwitsynthese in het lichaam omlaag en de koperconcentraties in het plasma worden lager dan normaal, wat een tekort aangeeft. Koper in het bloed laat pas later een daling zien, omdat het even duurt voordat de erythrocyten te weinig CuZnSOD (belangrijkste koperhoudende component) hebben en in voldoende hoeveelheden ophopen om wat toe te voegen aan het effect op koper in het plasma (Underwood & Suttle, 1999). Serumgehalten zijn over het algemeen 10-20 procent lager dan plasma, omdat er ruw eiwit verloren gaat tijdens het samenklonteren (Underwood & Suttle, 1999).

Jodium

Gehalten van 10-25 µg l⁻¹ bloed geven aan dat het dier een tekort aan jodium heeft (gehalten van PBI = protein bound iodine, Underwood & Suttle, 1999). Dit is bovendien waar te nemen aan een vergrote schildklier. Het nadeel van meten van jodium in het plasma is dat de functie van de thyroidhormonen (T3 en T4) niet meegenomen wordt. Van deze hormonen kunnen de gehalten in het bloed echter wel gemeten worden. Bij een jodiumtekort zijn de gehalten aan T4 19,4-38,9 µg l⁻¹ en de gehalten aan T3 1,3-1,6 µg l⁻¹ (Underwood & Suttle, 1999). De jodiumgehalten en de T4-gehalten die een kritieke waarde aangeven, zijn wel normaal voor dieren in de eerste vier weken na afkalven. Met name de uitscheiding van T4 wordt door verschillende factoren beïnvloed. Deze is onder andere afhankelijk van seizoen, parasietenstatus van het dier en leeftijd. Het T3-gehalte in het bloed is minder variabel, maar is toch ook niet constant, bijvoorbeeld doordat concentraties in bloedstroom gereduceerd worden door stressoren (beperking voer en water, warmte, parasieten en eiwit en ijzertekorten).

Selenium

De gehalten in bloed of serum waarbij de seleniumstatus van het dier onvoldoende wordt geacht, zijn bij 11,8-19,7 µg l⁻¹ bloed en 7,9-9,5 µg l⁻¹ serum (Underwood & Suttle, 1999).

4.3 Conclusies

In Tabel 4.1 worden de marginale waarden van de verschillende vitamines en spoorelementen, voor zover bekend, samengevat.

Tabel 4.1. De gehalten van de verschillende vitaminen en sporelementen in het bloed, normale waarden, waarden waarbij de voedingsstatus marginaal is (Min bloed) en indien bekend de waarde waarbij er een overmaat is (Max bloed) (eventueel). Gehalten in $\mu\text{g l}^{-1}$.

Component	bloed	Min bloed	Max bloed	literatuurreferentie
α -tocoferol		3.000-3.500*		Weiss, 1998
vitamine E		3.400		Van Dongen <i>et al.</i> , 2003
α -tocoferol	3.250			Baldi <i>et al.</i> , 2000
α -tocoferol	4.850			Baldi <i>et al.</i> , 2000
B10		15-30		Girard & Matte, 1995
B12	0,34-0,68	0,05-0,11		Underwood & Suttle, 1999
kobalt		zie vit B12		Underwood & Suttle, 1999
koper (plasma)	572-953	191-286 **	1.271-1.589	Underwood & Suttle, 1999
jodium: PBI ¹	30-40 (normaal)	10-25		Underwood & Suttle, 1999
jodium: serum T4 ¹		19-39		Underwood & Suttle, 1999
jodium: serum T3 ¹		1,3-1,6		Underwood & Suttle, 1999
selenium		bloed: 12-20; serum: 8-10		Underwood & Suttle, 1999

* waarde vlak voor afkalven

** ook nog lagere gehalten dan dit kunnen voorkomen.

¹ jodium: gehalten geven marginale status aan. PBI = protein-bound iodine. Gehalten PBI en T3 zijn normaal voor eerste 4 weken na kalven.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies gehalten in de melk

Voor de meeste vitamines en spoorelementen was het niet bekend bij welke gehalten in de melk dieren deficiënt zijn. De gehalten van de verschillende vitamines en spoorelementen in de melk zijn over het algemeen niet constant, waardoor het wel waarschijnlijk is dat gehalten in de melk een indicatie geven over de voedingsstatus. Zowel voor de vitamines als voor de spoorelementen is een schatting gemaakt van de waarde van de gehalten in de melk bij een onvoldoende voedingsstatus. Bij vitamine E zullen de gehalten bij een onvoldoende voedingsstatus in elk geval onder de $350 \mu\text{g l}^{-1}$ liggen, bij vitamine B1 onder de 300, bij vitamine B3 onder de 500, bij vitamine B10 onder de 45, bij vitamine B12 onder de 3 en bij vitamine H onder de $20 \mu\text{g l}^{-1}$. Voor kobalt zouden gehalten waarbij tekorten optreden in elk geval onder de $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ liggen, voor koper onder de 120, voor jodium onder de 25 en voor selenium onder de $20 \mu\text{g l}^{-1}$. Voor zowel de vitamines als voor de spoorelementen geldt echter dat het niet bekend is bij welke gehalten de voedingsstatus daadwerkelijk marginaal zal zijn, maar bij gehalten die boven de geschatte marginale gehalten liggen zal de voedingsstatus in elk geval voldoende zijn. Harde gegevens uit de literatuur over een onvoldoende voedingsstatus van vitamines en spoorelementen in relatie tot gehalten in de melk zijn niet beschikbaar. In vervolgonderzoek moet een vergelijking tussen gehalten in bloed en melk daarom uitwijzen bij welke gehalten in de melk er tekorten optreden. Extra informatie over de voedingsstatus van enkele spoorelementen kan worden verkregen via het nemen van leverbiopten.

5.2 Conclusies bepalingmethoden

Gebaseerd op de resultaten van deze literatuurstudie kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1. Er zijn geen analysemethoden in de literatuur beschreven waarmee gehalten aan vitamines en spoorelementen in koemelk snel en eenvoudig kunnen worden bepaald. Vooral matrixeffecten en relatief lage gehalten aan vitamines en spoorelementen in koemelk belemmeren toepassing van eenvoudige bepalingmethoden. Om matrixproblemen te verminderen moeten de monsters zeer sterk worden verdund, of de eiwitten neergeslagen worden. Dit leidt in vele gevallen tot verliezen van de doelstof. Daarnaast zijn efficiënte scheidingsmethoden en gevoelige detectoren nodig om de relatief lage gehalten aan vitamines en spoorelementen te kunnen bepalen. Bepaling van de gehalten aan vitamines en spoorelementen in koemelk is op boerderijschaal niet mogelijk, op laboratoriumschaal wel.
2. Voor bepaling van het gehalte aan vitamine E, B1, B3, B10, B12 en H in melk zijn HPLC-technieken met elektrochemische, fluorescentie- of UV-detectie het meest geschikt. In Tabel 5.1 staan de meest geschikte bepalingmethoden voor de geselecteerde vitamines in melk weergegeven.
3. Voor bepaling van het gehalte aan Co, Cu en Se in melk is één en hetzelfde type analysemethode toepasbaar: ICP-AES. Met behulp van deze methode kunnen 10 verschillende spoorelementen in één analyserun simultaan worden geanalyseerd. ICP-AES is niet geschikt om het gehalte aan jodium te bepalen. De internationaal gestandaardiseerde HPLC-methode met elektrochemische detectie is het meest geschikt voor bepaling van het jodiumgehalte in koemelk. In Tabel 5.2 staan de meest geschikte bepalingmethoden voor de geselecteerde spoorelementen in melk weergegeven.
4. De momenteel beschikbare analysemethoden voor bepaling van het gehalte aan de geselecteerde vitamines en spoorelementen in melk zijn gebaseerd op analytisch-chemische technieken, voornamelijk HPLC en ICP-AES. De hoge kosten van de apparatuur en een bewerkelijke en

Vaststellen voedingsstatus aan vitamines en spoorelementen bij melkvee via gerichte bepalingen in koemelk

langdurige monstervoorbewerking zijn beperkende factoren voor routinematige bepalingen. Indien enkele tientallen monsters geanalyseerd worden, kunnen de kosten bij benadering geschat worden op € 1.500 per 10 monsters voor Co, Cu en Se en op € 2.500 per 10 monsters voor jodium. Voor het bepalen van vitamines in melk gelden vergelijkbare prijzen, enige honderden euro's per vitamine en per monster.

Voor een pilotstudy zou de uitvoering van deze bepalingen in principe financieel haalbaar moeten zijn. Voor routinematig testen in de dagelijkse praktijk is dit echter te kostbaar, maar wanneer er vanuit de praktijk echter een grote vraag naar dit soort analyses zal komen, zal de prijs van de analyses waarschijnlijk wel dalen.

5. Gebaseerd op nieuwe ontwikkelingen zijn HPLC-MS en ICP-MS het meest geschikt om gehalten aan respectievelijk vitamines en spoorelementen in melk te bepalen. Op dit moment zijn deze bepalingsmethoden nog niet operationeel. Voor spoorelementen is ICP-MS bij een aantal gespecialiseerde laboratoria operationeel. HPLC-MS voor het meten van vitamines wordt nog vrijwel niet toegepast. Verwacht wordt dat deze methoden op relatief korte termijn beschikbaar kunnen zijn en dan een lagere detectiegrens hebben. Ontwikkelingen naar snelle en goedkope analysemethoden zijn denkbaar als er een markt voor ontstaat. Op dit moment worden er echter nog maar weinig van dit soort analyses uitgevoerd, waardoor deze ontwikkelingen nog geen prioriteit hebben.

Tabel 5.1. Samenvatting van de meest geschikte bepalingsmethoden voor de geselecteerde vitamines in melk.

Vitamine	voorbewerking	scheidings- methode	detectie	bepaalbaarheids- grens (monster- hoeveelheid), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk	reproduceerbaarheid, relatief in %	totale analysestijd (per monster of simultaan x monsters), minuten	bereik van gehalten in melk (NMI), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk
vetoplosbaar							
E (tocoferolen)	extractie (L/L)	HPLC	elektrochemisch	0,2	0,74-5,7	20 -30	0,6-1,6
wateroplosbaar							
B1 (thiamine)	derivatisering	HPLC	fluorescentie	5	-	55+8	340-430
B3 (niacine)		HPLC		1.000	12		680-950 (nicotinezuur)
B10 (foliumzuur)	hydrolyse	HPLC	fluorescentie	1,7	6,4	>120?	46,2-59,0
B12 (cobalamine)	SPE ¹	HPLC	UV	0,2	-	100+10	3-7
H (biotine)	SPE en derivatisering	HPLC	fluorescentie	5	<7,0	?	30-40

¹ SPE: solid phase extraction

Tabel 5.2. Samenvatting van de meest geschikte bepalingsmethoden voor de geselecteerde sporelementen in melk.

Spoor- element	voorbewerking	scheidingsmethode / meettechniek	detectie	bepaalbaarheids- grens (monster- hoeveelheid), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk	reproduceer- baarheid, relatief in %	totale analysestijd (per monster of simultaan x monsters), minuten	bereik van gehalten in melk (NMI), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk
kobalt	droge verassing	ICP	AES ($\lambda = 238,892 \text{ nm}$)	0,5	2-5	± 120 (10 elementen, 1 monster) ¹	0,5-0,9
koper	droge verassing	ICP	AES ($\lambda = 327,396 \text{ nm}$)	0,6	2-5	± 120 (10 elementen, 1 monster) ¹	150
jodium	membraanfiltratie	HPLC	elektrochemisch	10	8,2	40-55? (extractie: 30 min)	294-302
selenium	droge verassing	ICP	AES ($\lambda = 196,026$)	5,0	2-5	± 120 (10 elementen, 1 monster) ¹	4,95-18,1

¹ monsters zijn simultaan geanalyseerd.

6 Vervolgonderzoek

Uit de gerapporteerde gehalten aan vitamines en spoorelementen in melk blijkt dat de spreiding zeer groot is. Vaak is niet duidelijk welke gehalten een deficiënte voedingsstatus van de koe aanduiden. Om een beter beeld van de situatie in Nederland te verkrijgen is een beperkte bemonstering op praktijkbedrijven nodig. Voor een goede beeldvorming is een vergelijking van de gehalten van verschillende vitamines en spoorelementen in de melk met de gehalten in het bloedserum en daar waar mogelijk in combinatie met het nemen van leverbiopten aan te bevelen. Het praktijkonderzoek zal in de volgende onderzoeksfase in samenwerking met NIZO food research en de Gezondheidsdienst voor Dieren plaatsvinden. Met behulp van de dan verkregen resultaten kan een afweging voor het verder praktijkrijp maken van de bepalingen worden gemaakt en ontstaat er meer zicht op de huidige voedingstoestand van het melkvee.

7 Literatuur

Opmerking: Getallen tussen rechte haken zijn gebruikt voor de referentieverwijzing in de bijlagen.

- Albalá-Hurtado S, Veciana-Nogués MT, Izquierdo-Pulido M & Mariné-Font A (1997) Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 778 (1-2), 247-253. [9]
- Aleixo PC & Norbrega JA (2003) Direct determination of iron and selenium in bovine milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 83 (3), 457-462. [32]
- Aljawaheri F (2001) Validatie van de bepalingmethode van mineralen en spoorelementen in zuivelproducten m.b.v. ICP-AES. NIZO food research B.V., Ede. [22]
- Allison RD & Laven RA (2001) Vitamin E for milk production: a review. *Nutrition abstracts and reviews. Series B, Livestock Feeds and Feeding* 71, 43R-52R.
- Alm L (1982) Effects of fermentation on B-vitamin content of milk in Sweden. *Journal of Dairy Science* 65, 353-359.
- Amann IG (1999) Determination of cobalamine, folate and biotin in milk using competitive enzyme-immuno-assay tests. MSc thesis. University of Vienna, Austria. [30]
- Anonymous (1997) Handboek melkveehouderij. Praktijkonderzoek rundvee, schapen en paarden. Lelystad.
- Anonymous (2000) Iodine in milk. *Food Surveillance Information Sheet* 198.
- Areekul S, Vongyuthitham M, Yamarat P & Sunthornthum S (1978) Folic acid and folic acid binding proteins in milk. *Journal of the medical association of Thailand* 61, 81-86.
- Atwal M, Hidiroglou, Kramer JKG & Bins MR (1990) Effects of feeding alpha-tocopherol and calcium salts of fatty acids on vitamin E and fatty acid composition of cow's milk. *Journal of Dairy Science* 73, 2832-2841.
- Baldi A, Savoini G, Pinotti L, Monfardini E, Cheli F & Dell'Orto V (2000) Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status, milk quality and reproduction in transition cows. *Journal of veterinary medicine* 47, 599-608.
- Baoxiang H (1993) Determination and evaluation of selenium concentrations in cow's milk on some dairy farms in Xining area. *Qinghai Xumu Shouyi Zazhi* 23, 17-18. In Chinees met Engels samenvatting.
- Baucells M, Lacort G, Roura M, Barbera R & Farre R (1988) Determination of cobalt. *Nahrung* 32 (4), 409-411. [17]
- Bergsma FA (2000) Mineralen en spoorelementen in zuivelproducten m.b.v. ICP-AES. Afstudeerverslag. NIZO food research B.V., Ede. [21]
- Bieber Wlaschny M (1988) Vitamin requirements of the dairy cow. *Nutrition and lactation in the dairy cow. Proceedings of the 46th University of Nottingham Easter School in Agricultural Science*, London, 135-156.
- Brzoska F, Pyska H, Brzoska B & Wiewiora W (2000) Effects of iodine intake in daily rations on iodine content in milk and iodine status of dairy cows. *Annals of Animal Science Roczniki Naukowe Zootechniki* 27, 103-116.
- Cava-Montesinos P, Cervera M, Pastor A., De la Guardia M (2003) Hydride generation atomic fluorescence spectrometric determination of ultratracés of selenium and tellurium in cow milk. *Analytica Chimica Acta* 481 (2), 291-300. [33]
- Conrad HR & Moxon AL (1979) Transfer of Dietary Selenium to milk. *Journal of dairy Science* 62, 404-411.
- Dabeka RW (1989) Graphite-furnace atomic absorption spectrometric determination of lead, cadmium,

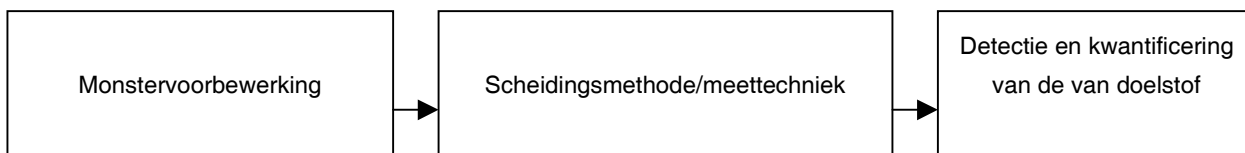
- cobalt and nickel in infant formulas and evaporated milks after nitric-perchloric acid digestion and coprecipitation with ammonium pyrrolidine. *Science of the total environment* 89 (3), 271-277. [31]
- De Araujo-Nogueira AR, Mockiuti F, De Souza GB & Primavesi O (1998) Flow Injection Spectrophotometric Catalytic Determination of Iodine in Milk. *Analytical Sciences* 14, 559-564. [26]
- De Leenheer AP, Lambert WE & Nelis HJ (1992) *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. State University of Ghent, Belgium. Marcel Dekker, Inc. New York/Basel/Hong Kong, 153-195; 261-354, 411-513. [2]
- Delgado-Zamarreno MM, Sanchez-Perez A, Gomez-Perez C & Hernandez-Mendez J (1992) High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for the simultaneous determination of vitamin A, D3 and E in milk. *Journal of Chromatography* 623(1), 69-74. [3]
- Donley SA, Ilagan BJ, Rim H & Linder MC (2002) Copper transport to mammary gland and milk during lactation in rats. *American Journal of Physiology* 283, E 667-E675.
- Eitenmiller RR & Landen Jr WO (1999) *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. Department of Food Science and Technology, University of Georgia. CRC Press LLC, Boca Raton/London/New York/Washington DC, 109-148; 271-297; 339-367; 411-487. [5]
- Ellen G, Tüdös AJ & Te Giffel MC (2004) Inventarisatie van commercieel verkrijgbare sneltesten voor het aantonen van antibiotica residuen in melk. NIZO-rapport E 2004/09. NIZO food research, Ede.
- FAO & WHO (2002) *Human vitamin and mineral requirements*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand.
- Fecher PA, Goldmann I & Nagengast A (1998) Determination of iodide in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. [23]
- Fennema OR (1996) *Food Chemistry*. University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin. Marcel Dekker, Inc. New York/Basel, 532-616, 632. [1]
- Gauch R, Leuenberger U & Müller U (1992) Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine B1, B2, B6 und B12 in Milch durch HPLC. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* 195, 312-315. [27]
- Girard CL (1998) B-complex vitamins for dairy cows: a new approach. *Canadian Journal of Animal Science* 78 (Suppl.), 71-90.
- Girard CL & Matte JJ (1998) Dietary supplements of folic acid during lactation: effects on the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81, 1412-1419.
- Girard CL, Matte JJ & Tremblay GF (1995) Gestation and lactation of dairy cows: a role for folic acid? *Journal of Dairy Science* 78, 404-411.
- Grace ND, Ankenbauer-Perkins K, Alexander AM & Marchant RM (2001) Relationship between blood selenium concentrations or glutathione peroxidase activity, and milk selenium concentrations in New Zealand dairy cows. *New Zealand Veterinary Journal* 49, 24-28.
- Gregory ME (1975) Reviews of the progress in Dairy Science. Water-soluble vitamins in milk and milk products. *Journal of dairy Research* 42, 197-216.
- Herrero C, Granado F, Blanco I & Olmedilla B (2002) Vitamin A and E content in dairy products: their contribution to the recommended dietary allowances for elderly people. *Journal of Nutrition, Health and Aging* 6, 57-59.
- Hewavitharana AK & Van Brakel AS (1998) A rapid saponification procedure for the simultaneous HPLC determination of the natural levels of vitamin A, E and beta-carotene in milk. *Milchwissenschaft*. 53(1), 11-15. [7]
- Higuchi H, Maeda T, Kawai K, Kuwano A, Kasamatsu M & Nagahata H (2003) Physiological changes in the concentrations of biotin in the serum and milk and in the physical properties of the claw horn in

- Holstein cows. *Veterinary Research Communications* 27, 407-413.
- Holt DL, Wehling RL & Zeece MG (1988) Determination of native folates in milk and other dairy products by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 449, 271-279. [35]
- Inam R & Somer G (2000) A direct method for the determination of selenium and lead in cow's milk by differential pulse stripping voltammetry". *Food Chemistry* 69 (3), 345-350. [34]
- Indyk HE, Evans EA, Bostrom Caselunghe MC, Persson BS, Finglas PM, Woollard DC & Filonzi EL (2000) Determination of Biotin and Folate in Infant Formula and Milk by Optical Biosensor-Based Immunoassay. *Journal of AOAC International* 83 (5), 1141-1148. [11]
- Indyk HE, Persson BS, Caselunghe MCB, Moberg A, Filonzi EL & Woollard DC (2002) Determination of vitamin B12 in milk products and selected foods by optical biosensor protein-binding assay: method comparison. *Journal of AOAC International* 85 (1), 72-81. [12]
- International Dairy Federation (1992) *Bulletin of the IDF* 278, 16-23, 64-72. [29]
- Jorhem L (2000) Determination of Metals in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after Dry Ashing: NMKL Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 83 (5), 1204-1211. [14]
- Jorhem L & Engman J (2000) Determination of Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after Microwave Digestion: NMKL Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 83 (5), 189-1203. [15]
- Konings EJM (1999) A validated LC method for the determination of folates in vegetables, milk powder, liver and flour". *Journal of AOAC International* 82, 119-127. [36]
- Koops J & Klomp H (1991) Cobalt in Dutch milk powder. Determination by differential pulse adsorptive cathodic-stripping voltammetry. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 45 (2), 127-138. [28]
- Lahély S, Ndaw S, Arella F & Hasselmann C (1999) Determination of biotin in foods by high performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Food Chemistry* 65 (2), 253-258. [10]
- Laukkanen M, Antila P, Antila V & Salminen K (1988) The water-soluble vitamin contents of Finnish liquid milk products. *Meijeritieteellinen Aikakauskirja* 46, 7-24. [8]
- Leslie KL, Kelton DF, Wagter LC, Day KJ, Storey DL, Melicherick J, Godkin MA & Smith RA (1999) Milking management and bulk milk iodine concentrations in Ontario dairy herds. *Proceedings of the Thirty-second Annual Conference American Association of Bovine Practitioners, Nashville, Tennessee, USA, 23-26 September, 1999.*
- Linder (1985) *Nutritional biochemistry and metabolism: with clinical applications.* Elsevier, New York.
- Mackey AD & Picciano MF (1999) Maternal folate status during extended lactation and the effect of supplemental folic acid. *American Journal of Clinical Nutrition* 69, 285-292.
- Magdub AB & Johnson HD (1978) Plasma and milk thyroxine of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 61, suppl. 1, 156-157.
- Magdub AB, El Nouty FD & Johnson HD (1979) Effects of milking and milk level on thyroxine in plasma and milk. *Journal of Dairy Science* 62, suppl. 1, 114-115.
- Miller-Ihli NJ (1996) Trace element determinations in foods and biological samples using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (9), 2675-2679. [16]
- Mock DM, Mock NI & Dankle JA (1992) Secretory patterns of biotin in human milk. *Journal of Nutrition* 122, 546-552.
- NEN (2000) *Melk en gedroogde melk; Bepaling van het iodidegehalte; Hoge-prestatie vloeistofchromatografische methode.* ISO-EN-ISO 14378:2000. [25]
- Rajiv C, Harjit K, Chawla R & Kaur H (2000) Prevention of oxidized flavour of milk by vitamin E. *Indian dairyman* 52, 43-46.

- Roth-Maier DA, Trubswetter N, Stangl GI & Kirchgessner M (1997) Dietary thiamin supply during lactation influences thiamin status in lactating rats and their offspring and the thiamine level in milk. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 36, 169-175.
- Schingoethe DJ, Parsons JG, Ludens FC, Tucker W & Shave HJ (1978) Vitamin E status of dairy cows fed stored feeds continuously or pastured during summer. *Journal of Dairy Science* 61, 1582-1589.
- Sertl D & Malone W (1993) Liquid Chromatographic Method for Determination of Iodide in Milk: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 76 (4), 711-719. [24]
- Shaver RD & Bal MA (2000) Effect of Dietary Thiamin Supplementation on milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83, 2335-2340.
- Túdös A, Ellen G, Van den Bos E, Aljawaheri F & Te Giffel MC (2002) Vitaminebepalingen in rauwe melk met de Biacore-methode. NIZO-rapport I 2002/05. NIZO food research B.V., Ede. [19]
- Underwood EJ & Suttle NF (1999) The mineral nutrition of livestock, third edition. CAB Publishing, Wallingford, UK.
- Van Dongen CFJ, Oerlemans JF, Túdös A & Ellen G (2003) Vaststellen voedingsstatus aan vitaminen bij melkvee via gerichte bepalingen in koemelk (fase 1). Nutriënten Management Instituut NMI, Wageningen, rapport 893.03, 42 pp. [4]
- Van Leeuwen S (1998) HPLC-bepalingen voor vitaminen in rauwe melk. NIZO food research B.V., Ede. [18]
- Vidal-Valverde C & Diaz-Pollan C (2000) Comparison of capillary electrophoretic and high performance liquid chromatographic thiamin determination in milk. *Milchwissenschaft* 55(6), 307-309. [6]
- Walker CK & Elliot JM (1972) Lactational trends in vitamin B12 status on conventional and restricted roughage rations. *Journal of Dairy Science* 55, 474-479.
- Weiss JR (1998) Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. *Journal of Dairy Science* 81, 2493-2501.
- Wiewiora W, Brzoska F & Brzoska B (2003) Effect of selenium in daily rations on cows' yield and selenium concentrations in milk and blood. *Annals of Animal Science* 3, 67-79.
- Woollard DC & Indyk HE (2002) Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, and nicotinamide in infant formulas by liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 85 (4), 945-951. [13]

Bijlage 1a. Werkingsprincipe van de verschillende bepalingsmethoden voor organische stoffen

Hieronder wordt van de meeste in dit rapport genoemde analysetechnieken summier en sterk vereenvoudigd beschreven hoe deze werken. De principes van de atoomspectrometrische methoden voor sporelementen zijn beschreven in Hoofdstuk 3.



Voorbewerking

Extractie: scheidingsmethode waarbij gebruik wordt gemaakt van verschil in oplosbaarheid van de componenten in een bepaald oplosmiddel. Dit kan zijn vloeistof/vloeistof extractie, bijvoorbeeld het uitschudden van slecht in water oplosbare stoffen met een organisch oplosmiddel als ether of hexaan. Bij Solid Phase Extractie (SPE) wordt de oplossing met daarin de doelstof op een kolommetje met absorptiemateriaal gebracht. De stoffen hechten zich aan dit materiaal. Door te spoelen met verschillende oplosmiddelen na elkaar kan de doelstof gescheiden worden van de andere, bij de bepaling storende, stoffen.

Derivatisering: van de te scheiden doelstof wordt “pre- of post-column” een afgeleide stof gevormd door bijvoorbeeld oxidatie of additie van een fluorescerende groep. Het resultaat is het ontstaan van een sterk fluorescerende verbinding die makkelijk te detecteren is met fluorescentie detectie.

Hydrolyse: ontleden van complexe, vaak grote moleculen in hun onderdelen door reactie met water, gekatalyseerd door zuur, base of enzymen.

Scheidingsmethode / meettechniek

Analytisch-chemische methoden: principe is meestal gebaseerd op scheiding van de componenten in een kolom (HPLC/GC, capillaire elektroforese), gevolgd door bijvoorbeeld spectroscopische detectie (UV/MS). Scheiding kan op verschillende typen kolommen plaatsvinden: voor HPLC: “normal-phase”, “reversed-phase” of “ion-pair”; bij GC zijn dit meestal capillaire kolommen, gecoat met een polaire of apolaire laag (stationaire fase).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): principe berust op het verschil in verdeling van de te scheiden componenten over twee fasen, waarvan de ene stationair (stilstaand) en de andere mobiel (bewegend) is. Het specifieke kenmerk van deze vorm van chromatografie is dat de mobiele fase (een vloeistof) onder hoge druk langs een stationaire fase in een stalen kolom wordt geleid (stationaire fase is meestal vloeistof gehecht aan drager). Deze hoge druk is nodig om de vloeistof door de kolom te persen omdat de inerte drager van de stationaire fase uit zeer kleine deeltjes bestaat (3-10 µm). Detectie en kwantificering van de stoffen die de kolom verlaten wordt gedaan met UV, fluorescentie, lichtverstrooiing, brekingsindexmeting of elektrochemisch.

Gas Chromatografie (GC): de mobiele fase is een inert gas. Door dit gas worden de moleculen getransporteerd wanneer ze niet in de stationaire fase verblijven. De doelstoffen moeten in tegenstelling

tot HPLC wel vluchtig zijn of gemaakt worden. Detectie en kwantificering van de stoffen die de kolom verlaten wordt gedaan met verschillende typen detectoren, vlamionisatie, elektroneninvang, vlamfotometer, warmtegeleidbaarheid of met een massaspectrometer (GC-MS).

Capillaire Zone Electroforese (CZE): het principe is gebaseerd op het scheiden van ionen in een mengsel door middel van een elektrisch veld op basis van hun mobiliteit. De scheiding wordt uitgevoerd in een capillair, tussen de uiteinden waarvan een potentiaalverschil wordt aangebracht. Detectie en kwantificering van de stoffen die de kolom verlaten wordt gedaan met UV, fluorescentie, lichtverstrooiing, brekingsindexmeting, elektrochemisch of met een massaspectrometer (LC-MS).

Microbiologische assays: vaststellen van groeiremming of groeibevordering van micro-organismen door de aanwezigheid van de doelstof (bijvoorbeeld antibioticum of vitamine).

Biochemische (immunochemische) methoden (ELISA, Biacore): de te bepalen component (in dit geval vitamine) reageert in competitie met dezelfde doelstof waaraan een label is gehecht met een bioactieve component (antilichaam, receptor). Detectie en kwantificering vinden plaats via het aantal actieve plaatsen te meten dat bezet is door de gelabelde stoffen. De overige actieve plaatsen zijn bezet door de doelstof. Het label is meestal een enzym of een radioisotoop (ELISA of RIA).

Detectie van doelstof

Ultraviolette absorptie (UV): stoffen die UV-licht absorberen doen dit vooral bij een specifieke golflengte, die vaak per soort stof verschilt. De mate van lichtabsorptie bij deze golflengte is evenredig met de concentratie van de doelstof. Door het verschil tussen invallend en doorgelaten licht van deze golflengte te meten kan de concentratie worden berekend.

Fluorescentie: het licht van een lichtbron wordt gebruikt om fluorescerende moleculen die aanwezig zijn, aan te slaan. Hierdoor zenden deze moleculen licht uit van een langere golflengte (andere kleur) dan het ingestraalde licht. Door gebruik te maken van filters wordt alleen de intensiteit van het licht bij deze golflengte gemeten. De intensiteit van het fluorescentielicht is evenredig met de concentratie van de doelstof.

Elektrochemie: de vloeistof die de kolom verlaat (HPLC of CZE) wordt langs een elektrode geleid die een zodanige potentiaal heeft dat de doelstof kan worden geoxideerd of gereduceerd. Als oxidatie of reductie optreedt, dus doelstof aanwezig, gaat een stroompje lopen door de elektrode. De sterkte van het stroompje is evenredig met de concentratie van de doelstof.

Massaspectrometrie (MS): het gas dat of de vloeistof die van de kolom komt wordt onder zeer hoog vacuüm in een bron gebracht waar het wordt gebombardeerd met elektronen. Hierdoor vallen de moleculen van de doelstof in grote en kleine elektrisch geladen brokstukken uiteen. Deze brokstukken worden in een sterk elektrisch en magnetisch veld geleid, waardoor ze worden versneld en afgebogen. Doordat vrijwel alle brokstukken dezelfde elektrische lading hebben, maar verschillende massa's, krijgen ze verschillende snelheid en wordt hun baan meer of minder afgebogen. Met een geschikte detector worden de geladen deeltjes gemeten, dat wil zeggen hun massa en het aantal bepaald. Het aantal brokstukken van een bepaalde massa is evenredig met de concentratie van de doelstof. Uit de massa's van de gevormde brokstukken (het afbraakpatroon) kan de structuur van de stof worden bepaald.

Elektronen vang detector (ECD): selectieve detectie voor elektro-negatieve componenten, vooral halogenen. In de detector bevindt zich een radioactieve bron, meestal nikkel-63, die in staat is om het draaggas (stikstof of een argon-methaan mengsel) te ioniseren. Hierbij vormt zich een elektronenstroom, bestaande uit laagenergetische elektronen, tussen twee elektroden die geregistreerd wordt als een continue achtergrondstroom. Op het moment dat er in het draaggas elektro-negatieve componenten aanwezig zijn, vermindert de achtergrondstroom doordat er elektronen worden ingevangen. De grootte van de stroomvermindering is afhankelijk van de hoeveelheid elektro-negatieve component en de aard ervan. Andere detectoren die veel worden gebruikt bij GC zijn vlamionisatiedetectoren en vlamfotometers. Hierbij wordt het gas dat uit de GC-kolom komt verbrand. Afhankelijk van de doelstoffen wordt de geleidbaarheid van de vlamgassen of de lichtemissie ervan gemeten, die evenredig zijn met de concentratie van de doelstoffen.

Surface Plasmon Resonance (SPR): detectie berust op een verandering in brekingsindex veroorzaakt door ligandbinding (ion of molecuul dat bindt met een metaalatoom via een covalente binding). Deze techniek wordt toegepast in de Biacore.

Bijlage 1b. Werkingsprincipe van de verschillende bepalingsmethoden voor kobalt, koper en selenium

Voor de bepaling van kobalt, koper en selenium in melk is in de meeste gevallen één en hetzelfde type aanpak toepasbaar. Het principe hiervan berust op verassing van het voedingsmiddel, het oplossen van de as in verdund zuur en meting van de concentratie aan spooreslement in de ontstane oplossing (Fennema, 1996). Voor het destrueren van de organische matrix komen twee technieken in aanmerking: geprogrammeerde droge verassing tot maximaal 450-500°C of natte destructie met H_2SO_4 / HNO_3 / HClO_4 . Beide technieken hebben zowel voordelen als nadelen. Droge verassing geeft lage bepaalbaarheidsgrenzen en behoeft weinig aandacht, maar de methode is tijdrovend en gevoelig voor contaminatie. Natte destructie is snel en doorgaans niet gevoelig voor contaminatie, maar is arbeidsintensief en resulteert in tamelijk verdunde oplossingen en daardoor hoge bepaalbaarheidsgrenzen (Jorhem, 2000).

Atoomspectrometrie is een verzamelnaam van kwantitatieve instrumentele analysemethoden die zijn gebaseerd op het feit dat bij atomen en ionen energieopname (excitatie) en energieafgifte (relaxatie) slechts plaats kan vinden in discrete stappen, die karakteristiek zijn voor het desbetreffende element. Bij atomaire-emissiespectrometrie (AES) wordt het atoom of ion thermisch geëxciteerd en worden tijdens de relaxatie (terugvallen naar een lagere energietoestand) geëmitteerde fotonen gemeten. De identificatie van het element vindt plaats aan de hand van de golflengte van deze straling, terwijl de concentratie van het element evenredig is met de intensiteit van de straling. Doordat alle aanwezige elementen tegelijk worden geëxciteerd en daardoor simultaan straling uitzenden, is het met een geschikte detector mogelijk meerdere elementen tegelijk te bepalen.

In het geval van AES met inductief gekoppelde plasma spectrometrie (ICP-AES) vindt excitatie plaats in een plasma (Bergsma, 2000). Dit plasma wordt gemaakt en in stand gehouden door gas (meestal argon) door de windingen van een spoel met een hoogfrequente wisselstroom te leiden. Het opgewekte plasma heeft een temperatuur van 6 000-10.000 °K. Indien een oplossing in het plasma wordt gebracht, zal in eerste instantie het oplosmiddel verdampen, waarna de aanwezige verbindingen afgebroken zullen worden en de elementen in atoomvorm vrijkomen. Deze elementen zullen al dan niet via een ionisatiestap worden geëxciteerd. De geëxciteerde deeltjes vallen terug tot een lagere energietoestand (relaxatie), waarbij de opgenomen energie, onder meer door uitzending van fotonen, weer wordt afgestaan. De identificatie van het element vindt plaats aan de hand van de golflengte van de uitgezonden straling, terwijl de concentratie van het element in principe evenredig is met de netto-intensiteit, waarbij een correctie voor de achtergrondstraling wordt uitgevoerd (Aljawaheri, 2001).

Atomaire absorptie spectrometrie (AAS) is wereldwijd een veel gebruikte methode. Het is een betrouwbare techniek, maar kan slechts de concentratie van één element tegelijkertijd meten. Het principe berust op vernevelen van het waterige extract in een vlam (vlam-AAS of FAAS, circa 2.000°C) of in een verhitte grafietbuis (vlamloze of GFAAS tot 2800°C), waarbij een lichtbundel door de vlam of grafietbuis wordt geleid met een golflengte die selectief kan worden geabsorbeerd door de atomen van het te meten element. De afname van de lichtintensiteit is evenredig met de concentratie. Vlamloze AAS is veel gevoeliger dan FAAS. ICP heeft de laatste jaren aan populariteit gewonnen, voornamelijk omdat deze techniek in staat is de concentratie van verschillende spooreslementen in een monster gelijktijdig te meten (Fennema, 1996).

Bijlage 2. Bestaande, relevante bepalingsmethoden voor vitamines in melk

Vitamine	component	voorbewerking	scheidingsmethode ¹	detectie	bepaalbaarheids- grens (monster- hoeveelheid), µg l ⁻¹ melk	reproduceer- baarheid, relatief in %	totale analysetijd (per monster of simultaan x monsters), minuten	referentie	bereik van gehalten in melk (NMI), µg l ⁻¹ melk
vetoplosbaar									
E (tocopherolen)	vitamine E	extractie (L/L)	HPLC	elektrochemisch	0,2	0,74-5,7	20-30	[2, 3]	0,6-1,6
wateroplosbaar									
B1 (thiamine)	thiamine	derivatisering	HPLC	fluorescentie	5	-	55+8	[27]	340-430
	thiamine in urine	derivatisering	HPLC	fluorescentie	0,2	1-5	40-55	[2]	
	thiamine in zuigelingen- voeding	ontsluiting van de matrix (aanzuren om eiwitten en vet neer te laten slaan, gevolgd door centrifuge en filtratie)	HPLC	UV	20-100	-	55 ²	[9, 13]	
B3 (niacine)	niacine (som van nicotinamide en nicotinezuur)		HPLC		1000	12		pers. com., TNO Voeding, Zeist	680-950 (nicotinezuur)
	nicotinamide in zuigelingen- voeding	ontsluiting van de matrix (aanzuren om eiwitten en vet neer te laten slaan, gevolgd door centrifuge en filtratie)	HPLC	UV	20-100	-	55 ²	[9, 13]	

Vaststellen voedingsstatus aan vitamines en sporelementen bij melkvee via gerichte bepalingen in koemelk
(NMI, 2004)

Vitamine	component	voorbewerking	scheidingsmethode	detectie	bepaalbaarheids- grens (monster- hoeveelheid), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk	reproduceer- baarheid, relatief in %	totale analysetijd (per monster of simultaan x monsters), minuten	referentie	bereik van gehalten in melk (NMI), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk
B10 (foliumzuur)	foliumzuur	hydrolyse	immunochemisch (Biacore)	SPR	1,0	< 8,1	30	[11]	
	foliumzuur	hydrolyse	HPLC	fluorescentie	1,7	6,4	>120?	[35, 37]	46,2-59,0
	foliumzuur	hydrolyse	HPLC	fluorescentie en diode array	1,0	3,3-21,0	300+30?	[36]	
	foliumzuur in zuigelingen- voeding	ontsluiten van de matrix (aanzuren om eiwitten en vet neer te laten slaan, gevolgd door centrifuge en filtratie)	HPLC	UV	20-100	-	55 ²	[9]	
B12 (cobalamine)	cobalamine	ontsluiten van de matrix (aanzuren om eiwitten en vet neer te laten slaan, gevolgd door centrifuge en filtratie)	microbiologisch	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i>	5,0	-	1-2 dagen?	[1, 5]	
	cobalamine	behandelen met NaCN, gevolgd door hydrolyse	immunochemisch (Biacore)	SPR	0,08-2,40	4,9	30	[12]	
	cobalamine	SPE ³	HPLC	UV	0,2	-	100+10	[27]	3-7
	cobalamine in zuigelingen- voeding	ontsluiten van de matrix (aanzuren om eiwitten en vet neer te laten slaan, gevolgd door centrifuge en filtratie)	HPLC	UV	20-100	-	55 ²	[9]	

Vitamine	component	voorbewerking	scheidingsmethode	detectie	bepaalbaarheids- grens (monster- hoeveelheid), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk	reproduceer- baarheid, relatief in %	totale analysestijd (per monster of simultaan x monsters), minuten	referentie	bereik van gehaltes in melk (NMI) , $\mu\text{g l}^{-1}$ melk
H (biotine)	biotine	ontsluiten van de matrix (aanzuren om eiwitten en vet neer te laten slaan, gevolgd door centrifuge en filtratie)	microbiologisch	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	0,1 ng per assay	-	1-2 dagen ?	[1, 2, 5]	
	biotine	extractie (L/L)	immunochemisch (Ridascreen ⁶)	spectrofoto- metrisch	0,3	3	113+100	[29]	
	biotine	hydrolyse	immunochemisch (Biacore)	SPR	0,5	9,1	30	[11]	
	biotine	SPE en derivatisering	HPLC	fluorescentie	5	<7	?	[10]	30-40

¹ cursief gedrukte bepalingmethoden zijn het meest geschikt.

² monsters zijn simultaan geanalyseerd.

³ SPE: solid phase extraction

Bijlage 3. Bestaande, relevante bepalingsmethoden voor spoorelementen in melk

Spoor- element	component	voorbewerking	scheidingsmethode / meettechniek ¹	detectie	bepaalbaarheids- grens (monster- hoeveelheid), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk	reproduceer- baarheid, relatief in %	totale analysetijd (per monster of simultaan x monsters), minuten	referentie	bereik van gehalten in melk (NMI), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk
kobalt	kobalt	droge verassing	ICP	AES ($\lambda = 238,892 \text{ nm}$)	0,5	2-5	± 120 (10 elementen, 1 monster) ²	[22]	0,5-0,9
kobalt geëvaporeer- de melk	kobalt in	natte destructie	GFAAS	$\lambda = 238,892 \text{ nm}$	0,04-0,2	18,8		[31]	
kobalt	kobalt	natte destructie	"differential pulse adsorptive cathodic stripping voltammetry"	elektrochemisch	0,4	?		[28]	
koper	koper	droge verassing	ICP	AES ($\lambda = 327,396 \text{ nm}$)	0,6	2-5	± 120 (10 elementen, 1 monster) ²	[22]	150
	koper	droge verassing	FAAS	$\lambda = 324,7 \text{ nm}$	11,0	11		[14]	
	koper	ontsluiting van de matrix met zwavelzuur	GFAAS	$\lambda = 324,7 \text{ nm}$	0,04			[29]	
jodium	jodium	droge verassing	ontkleuring van het FeSCN^{2+} complex, door katalytische werking van I	$\lambda = 460,0 \text{ nm}$	1,0	5	160 (1,5 min voor analyse)	[26]	
	jodium	loogextractie (destructie van het monster met TMAH)	ICP	MS	?	-	± 120 (10 elementen, 1 monster) ²	[23]	
	jodium	membraanfiltratie	HPLC	elektrochemisch	10	8,2	40-55? (extractie: 30 min)	[24]	294-302

Vaststellen voedingsstatus aan vitaminen en spoorelementen bij melkvee via gerichte bepalingen in koemelk

Spoor- element	component	voorbewerking	scheidingsmethode / meettechniek	detectie	bepaalbaarheids- grens (monster- hoeveelheid), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk	reproduceer- baarheid, relatief in % x monsters)	totale analysetijd (per monster of simultaan x monsters), minuten	referentie	bereik van gehalten in melk (NMI), $\mu\text{g l}^{-1}$ melk
	jodium	joderingsreactie met broomaceton	GC	ECD	20	10		[29, pers. com. COKZ, Leusden]	
selenium	selenium	verduunning van monster met wateroplosbare tertiaire aminen	GFAAS	$\lambda = 196,026$	2,5	< 5		[32]	
	selenium	microgolfdestructie	hydride	fluorescentie	0,005			[33]	
	selenium	natte destructie	atoomfluorescentie "differential pulse cathodic stripping voltammetry"	elektrochemisch	1,2	10		[34]	
	selenium	droge verassing	ICP	AES ($\lambda = 196,026$)	5,0	2-5	± 120 (10 elementen, 1 monster) ²	[22]	4,95-18,1

¹ cursief gedrukte bepalingmethoden zijn het meest geschikt.

² monsters zijn simultaan geanalyseerd.