

Afdeling AM 1985-04-19
RAPPORT 85.43 Pr.nr. 505.0200
Onderwerp: Kwantitatieve bepaling van
BHT in melkpoeder.

Bijlage: Intern analysevoorschrift
nr. A 411 dd. 1985-04-19

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

RAPPORT 85.43

Pr.nr. 505.0200

Project: Ontwikkeling van methoden voor het aantonen en bepalen van
diverse additieven in levensmiddelen

Onderwerp: Kwantitatieve bepaling van BHT in melkpoeder

Bijlage: Intern analysevoorschrift nr. A 411 dd. 1985-04-19

Doel:

De ontwikkeling van een methode voor de bepaling van BHT in melkpoeder in verband met de controle op de toepassing van deze stof als tracer in melkpoeder.

Samenvatting:

Gezocht is naar een snelle eenvoudige methode voor de bepaling van BHT in melkpoeder. De bestaande multi-methode voor antioxidanten werd aangepast, waarbij de extractie vereenvoudigd werd en de chromatografische condities geoptimaliseerd werden in relatie tot BHT.

Conclusie:

- ~ BHT in melkpoeder kan snel en eenvoudig worden bepaald.
- ~ De recovery bij een gehalte van 80-160 mg/kg bedraagt gemiddeld 101%.
- ~ De recovery is sterk verbeterd door de vereenvoudigde extractie.

Verantwoordelijk: ir P. Hollman

Medewerker/Samensteller: J.J. van Oostrom

Projectleider: ir P. Hollman

1. Inleiding

Op basis van EEG Verordening 3714/84 kan steun toegekend worden voor gedeeltelijk ontroomd melkpoeder als dit verwerkt wordt in de diervoeding. In deze Verordening worden een aantal eisen gesteld aan het melkpoeder, zoals vetgehalte $\geq 10\%$, en wordt het gebruik van een tracer voorgeschreven. Als tracer wordt o.a. de rode kleurstof canthaxanthine voorgeschreven. De resultaten van dierproeven die pas beschikbaar kwamen na het tot stand komen van deze Verordening toonden echter aan dat er overdracht plaatsvindt van canthaxanthine naar spierweefsel. Gevolg hiervan is dat bijv. kalfsvlees donkerder van kleur wordt hetgeen, zoals bekend, ongewenst is. Er werd daarom in Brussel overeenstemming bereikt over een alternatief voor canthaxanthine nl. butylhydroxytolueen (BHT). In de Verordening zal voor BHT een minimumgehalte van 150 mg/kg vastgelegd worden. Voor de controle van melkpoeder op deze eis zal derhalve een analysemethode beschikbaar moeten zijn.

2. Opzet onderzoek

Voor de bepaling van antioxidanten is een methode voorhanden. Deze is gebaseerd op een literatuurvoorschrift van Gertz (1), waarbij 15 verschillende antioxidanten simultaan bepaald worden. De recovery van BHT volgens deze methode is echter sterk produktafhankelijk en in alle gevallen laag te noemen: botervet 13%, mayonaise 60%, paprikachips 75%. Gertz (1) corrigeert dan ook voor deze lage recovery's met behulp van een interne standaard. Hierdoor worden voor BHT waardes groter dan 85% gevonden.

De bepaling bevat een aantal stappen die de slechte recovery kunnen verklaren (2 maal extraheren, indampen, heroplossen). Ook de chromatografie is bij deze methode niet aantrekkelijk, vanwege de lange retentietijd ± 20 min voor BHT.

Getracht is dan ook om:

1. een eenvoudigere extractie toe te passen
2. de recovery sterk te verbeteren
3. een beter chromatografisch systeem te ontwikkelen.

3. Monsterpreparering

Aangezien nog geen melkpoeder met BHT voorhanden was zijn de gebruikte monsters geprepareerd op de volgende manier.

- Standaardoplossing BHT in ethanol toevoegen aan melkpoeder (gedeeltelijk ontroomd, vetgehalte > 10%).
- Homogeniseren in mortier.
- Drogen bij 40°C en 10 cm Hg-druk (vac. stoof).
- Halverwege en aan het eind van het droogproces (duur $\pm$ 20 min) nogmaals homogeniseren in mortier.

4. Extractie

De extracties werden uitgevoerd met het extractiemiddel iso-propanol-ethanol-acetonitril 1-1-2 en 0,2 gram oxaalzuur/100 ml. Volgens Gertz (1) worden met dit extractiemiddel zeer weinig matrixcomponenten meegeëxtraheerd; oxaalzuur wordt toegevoegd om oxidatie van anti-oxidanten tegen te gaan.

Van de op bovengenoemde manier verkregen melkpoeder werd 5 gram in een centrifugebuis gebracht tezamen met 1 gram watervrij-natriumsulfaat en 25 ml extraktievloeistof.

Op een magneetroerder werd gedurende een bepaalde tijd geroerd, waarna de buis met inhoud 1 uur bij -18°C gekoeld werd. De heldere oplossing verkregen na filtreren over een microfilter werd gebruikt voor de chromatografische bepaling.

5. Chromatografische condities

Bij de bepaling van antioxidanten is tot op heden gebruik gemaakt van een 10 μ m C18 (25 cm x 4,6 mm I.D.) kolom waarbij de retentietijd van BHT ongeveer 15 minuten is, bij gebruik van methanol/water/azijnzuur (70/29/1) als eluens. Aangezien in melkpoeder alleen BHT bepaald moet worden zijn de chromatografische condities hieraan aangepast. Als kolom is gebruikt het z.g. cartridgesysteem van Chrompack (2 cartridges 7 μ m C18 (10 cm x 3 mm I.D.) en een voorkolom). De fractie methanol in de loopvloeistof werd verhoogd zodat de retentietijd van BHT verkort werd tot $\pm$ 5 min. Zie voor de exacte condities de bijlage (intern voorschrift A 411).

6. Resultaten

Melkpoeder met toegevoegd BHT (zie 3) werd onderzocht volgens de bovenbeschreven methode, waarbij de extractieduur (roertijd) gevarieerd werd. De resultaten van de analyses in enkelvoud zijn vermeld in onderstaande tabel.

Roertijd	5 min.	15 min.	30 min.
toegevoegd	recovery	recovery	recovery
BHT (mg/kg)	%	%	%
80	94,9	99,0	101,2
100			101,1 102,8
160	99,8	103,8	102,8

Een roertijd van 15 min is dus voldoende voor een volledige extractie. Bijlage 1 geeft een voorbeeld van de verkregen chromatogrammen en ijklijnen.

7. Conclusies

Op de in dit verslag beschreven manier kan BHT in melkpoeder snel en exact worden bepaald. Door een eenvoudige extractie en zuivering en een "snelle" chromatografie is de analysetijd sterk verkort.

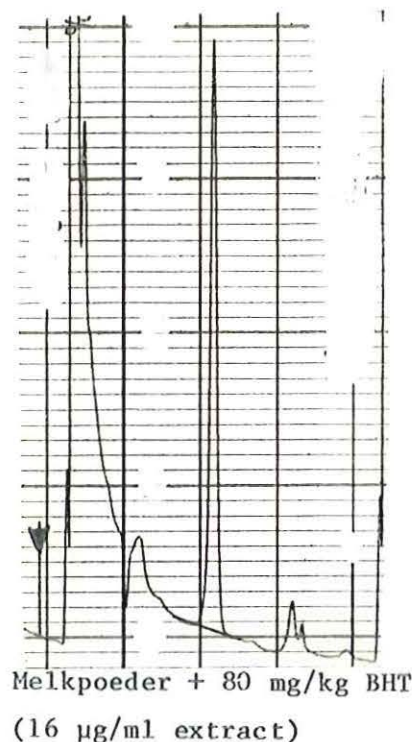
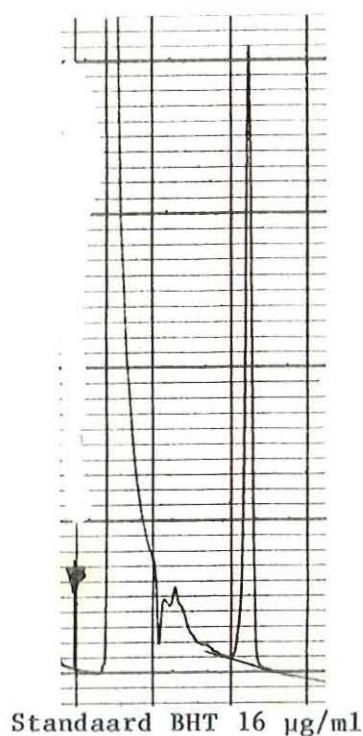
De gemiddelde recovery is, vergeleken met eerdere resultaten en literatuurgegevens, zeer sterk verbeterd. Dit zal zeker mede te danken zijn aan een uit minder stappen bestaande extractie.

8. Literatuur

1. Gertz, C., Herrmann, K.

Identifizierung und Bestimmung antioxidativ wirkender Zusatzstoffe in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 177 (1983), 186-192.

Bijlage 1



I	X(I)	Y(I)
1	0.0000	0.0000
2	8.0000	39.7000
3	16.0000	80.3500
4	32.0000	155.4000

LINEAR REG: * Y=A+B.X *

SOURCE/DF	SS	MS	F
TOTAL 3	13213.2		
REG 1	13208.5	13208.5	999.9
RESID 2	4.7	2.3	
R SQUARE =		0.9996	

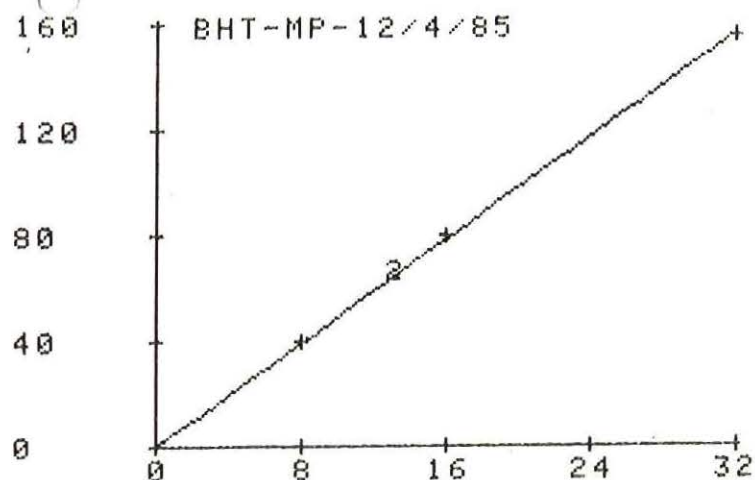
$$Y = 0.8700 + 4.8566 X$$

$$T = 0.734 \quad T\text{-KRIT.5\%} = 4.303 \quad T\text{-KRIT.1\%} = 9.925$$

A WIJKT NIET SIGNIFIKANT AF VAN 0 (P=5%)

*** YKLYN ***

$$Y = 4.8929 X$$



x(I) = conc. BHT (µg/ml)

y(I) = piekhoogte (mm)

Melkpoeder - Bepaling van butylhydroxytolueen (BHT) - HPLC/UV

1. Toepassingsgebied

Deze methode is toepasbaar op (halfvolle) melkpoeder voor de kwantitatieve bepaling van BHT. De detectiegrens ligt bij 1 mg/kg.

2. Beginsel

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van iso-propanol, ethanol en acetonitril, gekoeld om eventueel meegeëxtraheerde storende componenten (vet, eiwit) zoveel mogelijk te verwijderen, gecentrifugeerd en gefiltreerd. Het verkregen extract wordt met behulp van Reversed Phase HPLC gechromatografeerd, BHT wordt gedetecteerd bij 277 nm.

3. Reagentia

Alle reagentia moeten van analyse kwaliteit (p.a.) zijn, tenzij anders is vermeld. Gebruik dubbel gedestilleerd water of water van gelijkwaardige kwaliteit.

3.1 Iso-propanol.

3.2 Ethanol.

3.3 Acetonitril.

3.4 Oxaalzuur.

3.5 Extractievloeistof.

Meng iso-propanol (3.1), ethanol (3.2) en acetonitril (3.3) in de verhouding 1:1:2.

Voeg per 100 ml extractievloeistof 0,2 g oxaalzuur (3.4) toe en los op.

3.6 Natriumsulfaat watervrij.

3.7 Acetonitril chrom. kwaliteit (Lichrosolv).

3.8 Azijnzuur 100%.

3.9 Loopvloeistof:

Acetonitril (3.7)/water/azijnzuur (3.8) in de verhouding 80:19:1. De loopvloeistof dient gefiltreerd te worden over een microfilter van 0,45 µm met behulp van het filtreersysteem (4.9).

3.10 Perisorb RP-18 30-40 µm Merck nr. 10437.

3.11 2,6-Di-tert.-butyl-4-hydroxytolueen (standaard BHT).

4. Apparatuur en glaswerk

4.1 Centrifuge (Heraeus Varifuge S).

4.2 Centrifugebuizen 50 ml.

4.3 Magnetische roerder.

4.4 Microfilters 0,45 µm, resistent tegen organische oplosmiddelen b.v. Gelman Acrodisc-CR nr. 4219.

4.5 Injectiespuiten 10 ml (passend op microfilter 4.4).

4.6 Diepvriezer, temperatuur $\pm$ -18°C.

4.7 HPLC pomp met variabele UV-detector.

4.8 HPLC kolom:

2 HPLC cartridges 100 x 3 mm CP-TM-Spher C18 plus 1 guard column cartridge gevuld met Perisorb (3.10) Chrompack nrs.

cartridge 28290

guard column 28140

cartridge housing 28162

cartridge coupling 28243

4.9 Filtreersysteem voor loopvloeistof, b.v. Waters solvent clarification kit.

4.10 Huishoudfolie.

5. Werkwijze, extractie en zuivering

5.1 Weeg af in een centrifugebuis (4.2) 5,00 g gehomogeniseerd monster en 1 g natriumsulfaat (3.6).

5.2 Pipetteer hierbij 25,00 ml extractievloeistof (3.5) breng in de buis een roervlo en sluit af met een stukje huishoudfolie.

5.3 Roer intensief gedurende 15 min op een magnetische roerder (4.3).

5.4 Plaats de buis gedurende tenminste 1 uur in een diepvriezer (4.6).

5.5 Centrifugeer de nog koude buis 5 min bij ± 4000 rpm (4.1).

5.6 Filtreer onmiddellijk de bovenstaande vloeistof door een microfilter (4.4) en gebruik de heldere oplossing voor de vloeistofchromatografie.

6. Werkwijze, chromatografie

6.1 Chromatografische condities

eluens	3.9
kolom	4.8
debiet	1 ml/min
detectie	277 nm
injectievolume	10 μ l
ret.tijd	4-5 min.

7. IJklijn

7.1 Weeg af 25 mg standaard BHT (3.11).

7.2 Breng kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml met behulp van ethanol (3.2), los op, vul aan met ethanol (3.2) en meng.

Deze oplossing bevat 250 µg BHT per ml.

7.3 Maak een verdunningsreeks aan de hand van het verwachte gehalte BHT in het monster.

7.4 Injecteer deze oplossingen en chromatografeer volgens de onder 6.1 genoemde condities.

7.5 Registeer de piekhoogten en zet deze uit tegen de concentraties van de standaardoplossingen.

8. Berekening

Bepaal met behulp van de ijklijn 7.5 de concentratie BHT in het monster in mg/kg.

9. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van een bepaling in duplo, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd door dezelfde analist, mag niet groter zijn dan

10. Literatuur

- Christian G. en Herrmann K.; Identifizierung und Bestimmung antioxidativ wirkender Zusatzstoffe in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 177 (1983) 186.
- RIKILT-rapport 85.43.

Verantwoordelijk: ir P. Hollman *PH*

Samensteller : J.J. van Oostrom *JO*