Project 505.5000

Ontwikkeling en verbetering methoden van onderzoek voor tuinbouwprodukten

Projectleider: J.J.M. Driessen

Rapport 90.43 December 1990

Ontwikkeling van een HPLC-methode voor de bepaling van ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) en de zouten ervan in champignonconserven

A. van Polanen en J.J.M. Driessen

Medewerker: A. de Groot

Goedgekeurd door: dr J. de Jong

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-produkten.
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bron-vermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:
directeur
sectorhoofden
projectleider
afdeling Algemene Chemie (2x)
programmabeheer en informatieverzorging (2x)
circulatie
bibliotheek

EXTERN:
Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden
Directie Akker- en Tuinbouw
Produktschap voor Groenten en Fruit, ing. C.G.M. van Leeuwen
Algemene Inspectiedienst, A.J.A. Titulaer
Informatie en Kennis Centrum, Akker- en Tuinbouw
Instituut voor Agro Technologisch Onderzoek
CONEX, ing. B.D. de Vries
A. de Groot
De Ware(n)-Chemicus
Agralin

ABSTRACT

Ontwikkeling van een HPLC-methode voor de bepaling van ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) en de zouten ervan in champignonconserven

Development of an HPLC-method for the determination of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and its salts in canned mushrooms

Report 90.43 December 1990

A. van Polanen and J.J.M. Driessen

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

7 tables, 1 annex, 7 references, 11 figures

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is a complexing agent which may prevent enzymatic browning of canned mushrooms by sequestration.
The addition of EDTA to canned mushrooms produced in the Netherlands for the Dutch market is prohibited.
A method for the determination of EDTA in canned mushrooms based on reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography (HPLC) has been developed. Prior to HPLC the EDTA is complexed with copper(II). This complex is separated at a pH of 4.0 with a methanol-water mobile phase containing tetrabutylammonium as the counter-ion. The column temperature is held to 50°C and detection is performed by UV at 300 nm. Sample pretreatment simply consists of addition of cupric chloride and ascorbic acid to the surrounding liquid of canned mushrooms and filtration prior to HPLC-injection.
The method is not interfered by iron(III) concentrations up to 33 mg/l. Analyses of the surrounding liquid of the canned mushrooms showed a recovery of 105.6 $\pm$ 3.0 % at a level of 18 mg EDTA/l and 101.5 $\pm$ 0.8 % at a level of 178 mg EDTA/l. The method is linear in the range 7-178 mg EDTA/l. The repeatability of the procedure is 5 mg EDTA/l (n=20). The detection limit, based on a signal/noise ratio of 3, is 1.4 mg EDTA/l. The limit of determination is 10 mg EDTA/l. The day to day coefficient of variation is 2.3%.

The presence of EDTA may be confirmed by addition of iron(III) to the filtrate ready for HPLC-injection (including copper(II)). The stability constant of the Fe(III)EDTA complex is larger than the stability constant of the Cu(II)EDTA complex and consequently the Cu(II)EDTA peak in the chromatogram is replaced by a Fe(III)EDTA peak.

Keywords: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, enzymatic browning, canned mushrooms, HPLC, foods

INHOUD blz

ABSTRACT 1

SAMENVATTING 5

1 INLEIDING 7

2 EXPERIMENTEEL 8
2.1 Chemicaliën 8
2.2 Reagentia 9
2.3 Apparatuur/hulpmiddelen 10
2.4 Monstermateriaal 11

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE 12
3.1 Korte beschrijving van de literatuurmethode 12
3.2 Inleidende experimenten 12
3.2.1 Nawerking van de literatuurmethode met standaarden 12
3.2.2 Onderzoek van monsters gemeten bij verschillende eluenssamenstellingen en golflengten 13
3.2.3 Effect van toevoeging van koperchloride aan monsters en meting bij verschillende golflengten en kolomtemperatuur 15
3.2.4 Concentratie monsters afkomstig van het Sprenger Instituut 16
3.3 Conclusies inleidende experimenten 17
3.4 Onderzoek van verschillende reversed-phase kolommen 18

3.5 Nadere uitwerking gemodificeerde methode met behulp van de LiChrosorb 5-RP-18 kolom 18

3.5.1 Onderzoek naar de storende invloed van Fe^{3+}-ionen bij de complexvorming van EDTA met behulp van Cu^{2+}-ionen 18

3.5.2 Onderzoek naar de lineariteit 21

3.5.3 Onderzoek naar de herhaalbaarheid 22

3.5.4 Onderzoek naar de recovery van EDTA op een niveau van 18 mg en 178 mg EDTA/1 23

3.5.5 Bepaling van de aantoonbaarheidsgrens en de bepaalbaarheidsgrens 25

3.5.6 Bepaling van de onderste detectiegrens 26

3.5.7 Bepaling van de dag-tot-dag spreiding 26

3.5.8 Vervanging van het gevormde Cu(II)EDTA door Fe(III)EDTA 27

3.5.9 Conditie van de kolom gedurende het onderzoek 29

3.5.10 Bevestiging van positieve resultaten met behulp van een titrimetrische methode 29

4 CONCLUSIES 30

DANKWOORD 31

LITERATUUR

BIJLAGEN

A RSV nr. A0568: Champignonconserven- Bepaling van EDTA in opgiet-HPLC

SAMENVATTING

Vanwege de voorgenomen controle op de aanwezigheid van ethyleen-diaminetetra-azijnzuur (EDTA) en de zouten ervan in champignonconserven, heeft het RIKILT op verzoek van het Produktschap voor Groenten en Fruit (PGF) een HPLC-methode ontwikkeld voor de bepaling van EDTA en de zouten ervan in de opgiet van champignonconserven.
Deze methode berust op scheiding via reversed-phase ion-paar hoge druk vloeistof chromatografie van Cu(II)EDTA op een RP-18 kolom. De mobiele fase, gebufferd op pH 4, bestaat uit een water-methanol mengsel (10:1 v/v) en bevat tetrabutylammonium als tegenion. De kolom wordt gethermostreerd op 50°C en detectie vindt plaats bij 300 nm. De monstervoorbewerking is eenvoudig en snel en bestaat uit toevoeging van koper(II)chloride en ascorbinezuur aan de opgiet van champignonconserven, gevolgd door filtratie. Door toevoeging van ascorbinezuur vindt reductie plaats van eventueel aanwezige Fe^{3+}-ionen, welke door complexvorming met EDTA de bepaling kunnen storen.
Uit het onderzoek volgt dat er een lineair verband bestaat tussen de oppervlakte cq. de hoogte en de EDTA-concentratie in de range van 7 tot 178 mg/l. De onderste detectiegrens bedraagt 1,4 mg EDTA/l. De herhaalbaarheid van de methode bedraagt 5 mg EDTA/l. De recovery is 105,6 $\pm$ 3,0 % respectievelijk 101,5 $\pm$ 0,8 % voor toevoegingen aan de opgiet van champignonconserven van 18 respectievelijk 178 mg EDTA/l. Voor praktijkmonsters bedraagt de aantoonbaarheidsgrens 5 mg EDTA/l, terwijl voor de bepaalbaarheidsgrens 10 mg EDTA/l gevonden wordt. Voor een monster dat 79 mg EDTA/l bevat wordt een dag-tot-dag variatiecoëfficiënt gevonden van 2,3% (n=10 dagen).
Bevestiging van positieve monsters kan op eenvoudige wijze plaatsvinden door aan het voor HPLC-injectie gereedgemaakte filtraat ijzer(III)chloride toe te voegen. Hierdoor wordt het gevormde Cu(II)EDTA vervangen door Fe(III)EDTA, waardoor de Cu(II)EDTA piek uit het chromatogram verdwijnt.

1 INLEIDING

Enzymatische bruinkleuring van champignons kan een negatief kwaliteitsaspect zijn en is een indirect gevolg van de aanwezigheid van het enzym polyphenol oxidase (PPO). Ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA), toegevoegd in een concentratie van 250 mg/l, werkt remmend op deze verkleuring omdat het met het koper van het PPO koper-EDTA vormt (Mc Cord en Kilara). Volgens Verordening PGF 1981 Verduurzaamde Groenten mag EDTA of de zouten ervan niet aanwezig zijn in verduurzaamde champignons (uitgezonderd champignonconserven die bestemd zijn voor export naar de USA).

Vanwege de voorgenomen controle op de aanwezigheid van EDTA in champignonconserven, heeft het Produktschap voor Groenten en Fruit (PGF) het RIKILT verzocht een methode te ontwikkelen.

In de literatuur zijn diverse methoden beschreven voor de bepaling van EDTA.

Hamano et al. beschreven een colorimetrische bepaling van EDTA in voedingsmiddelen, waaronder champignonconserven. Het monstermateriaal werd gehomogeniseerd met behulp van 0,1 N NaOH, waarna een evenwichtsdialyse tegen 0,02 N NaOH werd uitgevoerd. Het EDTA in het dialysaat werd met behulp van kopersulfaat omgezet naar het Cu(II)EDTA, waarna de extinctie gemeten werd bij 477 nm.

Perfetti en Warner bepaalden EDTA in krabvlees en mayonaise door middel van reversed-phase ion-paar hoge druk vloeistofchromatografie (HPLC) van het kopercomplex, gebruikmakend van UV-detectie bij 254 nm.

Harmsen en van den Toorn bepaalden EDTA in water na toevoeging van ijzer(III)chloride, waarna het EDTA als ijzer(III)EDTA met behulp van anionenwisselings-HPLC met UV-detectie bij 258 nm bepaald werd.

Venezky en Rudzinski bepaalden EDTA in boiler-water. De methode is gebaseerd op de HPLC-bepaling van ijzer(III)EDTA gebruikmakend van een reversed-phase stationaire fase met tetrabutylammoniumbromide in acetaat buffer als mobiele fase. De detectie vond plaats bij 245 nm.

De Kleijn et al. bepaalden EDTA in mayonaise met behulp van reversed-phase ion-paar HPLC van het ijzer(III)-complex, gebruikmakend van UV-detectie bij 245 of 300 nm.

Rindertsma en Verhey beschreven een snelle en eenvoudige titrimetrische bepaling van sporen EDTA in afvalwater en melk. Deze methode

maakt gebruik van het principe, dat bij lage pH de binding tussen EDTA en de normaal in afvalwater en melk voorkomende ionen, zeer zwak is. Het is dan mogelijk het aanwezige EDTA met een geschikt metaalion te titreren. Er werd gekozen voor bismuthionen met xylenoloranje als indicator.
Na vergelijking van de bovenstaande methodieken werd, mede gezien het eenvoudige karakter van de methode en het goed aansluiten op de vraagstelling van het PGF in eerste instantie gekozen voor de colorimetrische methode van Hamano et al.. Nawerking van deze methode leidde tot zeer teleurstellende resultaten. Om deze reden werd besloten om een HPLC-methode te ontwikkelen, waarbij als uitgangspunt de methode van De Kleijn et al. werd gekozen, omdat deze het snelst door het RIKILT operationeel te maken was. Het principe is gebaseerd op het feit dat het EDTA na toevoeging van Fe^{3+}-ionen omgezet wordt in Fe(III)EDTA, dat vervolgens vloeistofchromatografisch (C18 kolom) met behulp van tetrabutylammoniumhydroxide gescheiden wordt. Dit rapport beschrijft de resultaten van het praktisch onderzoek.

2 EXPERIMENTEEL

2.1 Chemicaliën

Alle chemicaliën waren van "pro analyse" kwaliteit. Met "water" wordt bedoeld water gereinigd over een Milli Q installatie met een minimale weerstand van 10 Megaohm per cm of water van vergelijkbare kwaliteit.

2.1.1 L(+)-ascorbinezuur

2.1.2 Ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natrium zout, 2 aq.

2.1.3 Koper(II)chloride, 2 aq.

2.1.4 Methanol

2.1.5 Natriumacetaat, watervrij

2.1.6 Fe(III)EDTA

2.1.7 Tetrabutylammoniumhydroxide (TBAOH), 20% waterige oplossing

2.1.8 IJsazijn

2.1.9 IJzer(III)chloride, 6 aq.

2.2 Reagentia

2.2.1 Bufferoplossing

Los 26 ml TBAOH (2.1.7) en 2,46 g natriumacetaat (2.1.5) op in 1 liter water. Breng de pH op 4,0 met behulp van ijsazijn (2.1.8).

2.2.2 HPLC-eluens

Meng 1 liter bufferoplossing (2.2.1) met 100 ml methanol (2.1.4). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het eluens over een eluensfilter (2.3.7).

2.2.3 Koperreagens

Los 110 mg koperchloride (2.1.3) op in 30 ml ijsazijn (2.1.8) en vul aan met water tot 100 ml.

2.2.4 Hoofdstandaardoplossing ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout, 2 aq.

Weeg 1 gram ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout, 2 aq. (2.1.2) op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan met water tot 100 ml.

2.2.5 Verdunde standaardoplossingen ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout, 2 aq.

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (2.2.4) met glazen volumepipetten respectievelijk 0,1, 0,5, 1,0 en 2,5 ml in maatkolven van 100 ml. Vul aan met water en meng. Deze oplossingen bevatten respectievelijk 7, 36, 71 en 178 mg ethyleendiaminetetra-azijnzuur/l.

2.2.6 IJzerreagens

Los 175 mg ijzer(III)chloride (2.1.9) op in 30 ml ijsazijn (2.1.8) en vul aan met water tot 100 ml.

2.3 Apparatuur/hulpmiddelen

2.3.1 Analytische balans met een nauwkeurigheid van 0,1 mg

2.3.2 pH-meter

2.3.3 HPLC-opstelling bestaande uit:
- Vloeistofleveringssysteem.
- Injectiesysteem geschikt voor volumina van 20-200 µl.
- Kolomoven.
- UV detector.
- Recorder.
- Personal Computer met integratiesoftware "Nelson".
- Cartridgehouder.

2.3.4 Analytische kolommen:

	Kolomspecificaties			
	Lengte x inwendige diameter (mm)	Deeltjes grootte (µm)	Kolom nummer	In gebruik sinds
Chromspher C18	100 x 3,0	5	878068/ 878245	01-05-1989
Chromspher C18	100 x 3,0	5	657797/ 657567	19-10-1989
LiChrosorb 5-RP-18	150 x 4,6	5	0103563	niet bekend
LiChrosorb 5-RP-18	150 x 4,6	5	0115238	28-11-1989
Zorbax protein-plus	250 x 4,6	niet bekend	884999-901 RN 1193	niet bekend
Chromspher PAH	100 x 3,0	5	niet bekend	02-11-1989

Van de Chromspher C18 kolommen en de Chromspher PAH kolommen werden er twee (van 10 cm) in serie geschakeld met behulp van een cartridgehouder.

2.3.5 Voorkolommen:

	Voorkolomspecificaties	
	Lengte x inwendige diameter (mm)	Deeltjes grootte (µm)
Chromspher C18	10 x 3,0	niet bekend
Chromguard C18	10 x 3,0	niet bekend

De Chromspher C18 voorkolom werd in combinatie met de Chromspher C18 kolom gebruikt, terwijl de Chromguard C18 voorkolom in combinatie met de Lichrosorb 5-RP-18 of de Chromspher PAH kolom werd gebruikt.

2.3.6 Acrodisc filters 0,45 µm (bijv. Gelman 4184)

2.3.7 Eluensfilter 0,45 µm HV (bijv. Millipore art. HVLP 047 00)

2.3.8 Normaal laboratoriumglaswerk

2.3.9 Schleicher en Schuell vouwfilters, doorsnede 150 mm, 595 1/2

2.4 Monstermateriaal

Het Sprenger Instituut, thans een onderdeel van het Instituut voor Agro Technologisch Onderzoek (ATO), heeft op verzoek van het RIKILT monsters champignonconserven vervaardigd. De champignons werden volgens de standaardprocedure geëvacueerd en geblancheerd. Vervolgens zijn de champignons afgevuld met opgiet en gesteriliseerd. Aan de opgiet is in verschillende concentraties Ca-EDTA toegevoegd, overeenkomend met respectievelijk 0, 7, 36 en 142 mg EDTA/l opgiet (3.2.4). Tevens werden praktijk monsters champignonconserven voor het onderzoek gebruikt. De opgiet van de monsters wordt gefiltreerd over een vouwfilter (2.3.9).

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Korte beschrijving van de literatuurmethode

De Kleijn et al. maakten gebruik van een HPLC-methode voor de bepaling van EDTA in mayonaise. Bij deze methode wordt 5,0 gram monster gemengd met 50,0 ml water gevolgd door een extractie met 100 ml dichloormethaan. De waterige bovenlaag en de geëmulgeerde tussenlaag worden gedurende 15 minuten gecentrifugeerd. In een maatkolfje van 25 ml wordt 1 ml ijzerchloride oplossing (175 mg $FeCl_3$ in 30 ml ijsazijn en aangevuld tot 100 ml water) gepipetteerd en aangevuld met de verkregen waterige extractoplossing. Tevens wordt een verdunde standaardoplossing, die 7,5 mg EDTA/l bevat, op dezelfde manier behandeld. Het aanwezige EDTA wordt met behulp van de ijzeroplossing omgezet in Fe(III)EDTA. De monster- en standaardoplossing worden met behulp van HPLC geanalyseerd.

De HPLC condities waren hierbij als volgt:

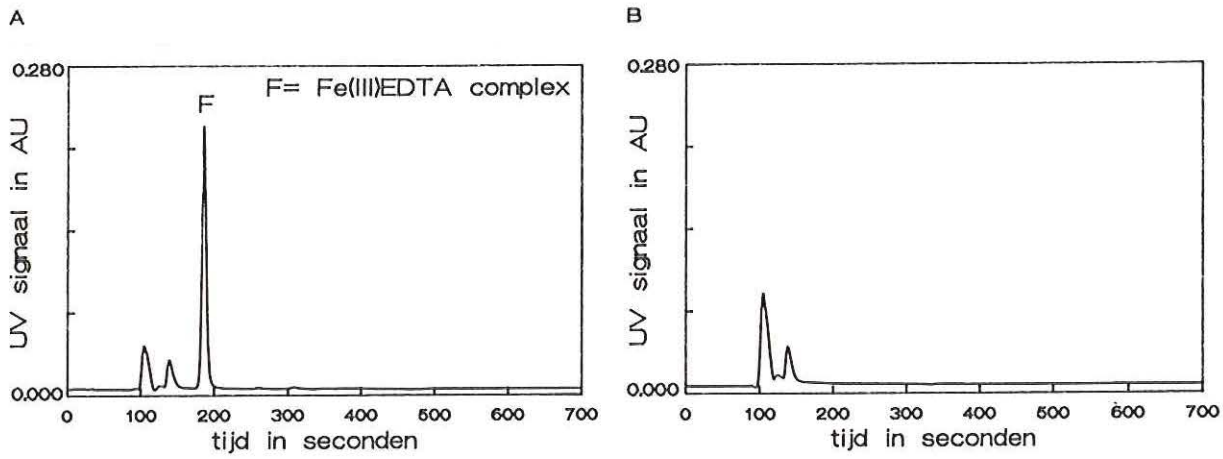
- injectievolume : 20 µl
- kolom : CP-SpherC-18, 200 x 3 mm (2 cartridges), deeltjesgrootte 8 µm
- detector : LC-UV 245 of 300 nm
- debiet : 0,8 ml/min
- bufferoplossing: 26 ml tetrabutylammoniumhydroxide (TBAOH) en 2,46 g natriumacetaat in 1 liter, op pH 4 gebracht met ijsazijn
- mobiele fase : bufferoplossing-methanol (10:1)

3.2 Inleidende experimenten

3.2.1 Nawerking van de literatuurmethode met standaarden

Met behulp van vier standaarden werd bovenstaande methode nagewerkt, waarbij gebruik werd gemaakt van een Chromspher C18 kolom (2.3.4) en gemeten bij een golflengte van 245 nm. De extractiestap werd overgeslagen. De standaarden bevatten respectievelijk 10, 50, 100 en 250 mg Ca-EDTA/l. Na wijziging van de hoeveelheid ijzerchloride oplossing van 1 ml in 2,5 ml werd een lineair verband vastgesteld tussen de vier standaarden.

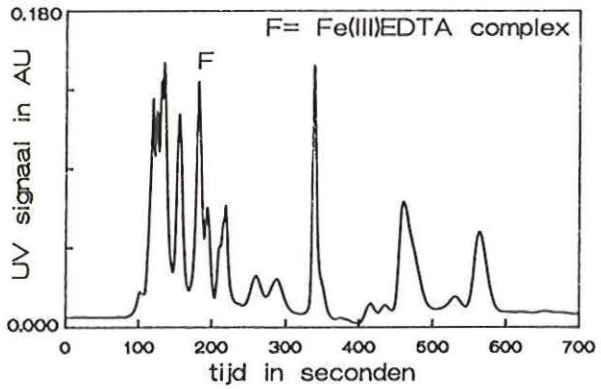
Met behulp van Fe(III)EDTA zijn ook rechtstreeks standaardoplossingen van respectievelijk 10, 50, 100 en 250 mg/l gemaakt. De chromatogrammen hiervan waren, rekening houdend met het verschil in molecuulmassa tussen Ca-EDTA (2.1.2) en Fe(III)EDTA (2.1.6), identiek aan die, welke werden verkregen na omzetting van Ca-EDTA in het Fe(III)EDTA complex. Hieruit kan worden geconcludeerd dat het Ca-EDTA volledig wordt omgezet in Fe(III)EDTA.
Tevens werd onderzocht of de $FeCl_3$-piek een storende invloed had op de piek van Fe(III)EDTA. Uit het onderzoek bleek een verschil in retentie tussen beide pieken (zie figuur 1), zodat de overmaat $FeCl_3$ de bepaling van EDTA niet stoort.



Figuur 1. Onderzoek naar de eventuele storende invloed van $FeCl_3$ op het Fe(III)EDTA complex. Kolom: 200 x 3,0 mm, Chromspher C18. Voorkolom: 10 x 3,0 mm, Chromspher C18. Eluens: bufferoplossing (2.2.1)-methanol (10:1, v/v). Debiet: 0,5 ml/min. Detectie: UV. Injectievolume: 20 µl. Kolomtemperatuur: kamertemperatuur.
A. Chromatogram van een standaardoplossing EDTA die 71 mg EDTA/l bevat; complexering met 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6); detectie bij 245 nm.
B. Chromatogram van een $FeCl_3$ oplossing die 175 µg $FeCl_3$, 6aq/ml bevat; detectie bij 245 nm.

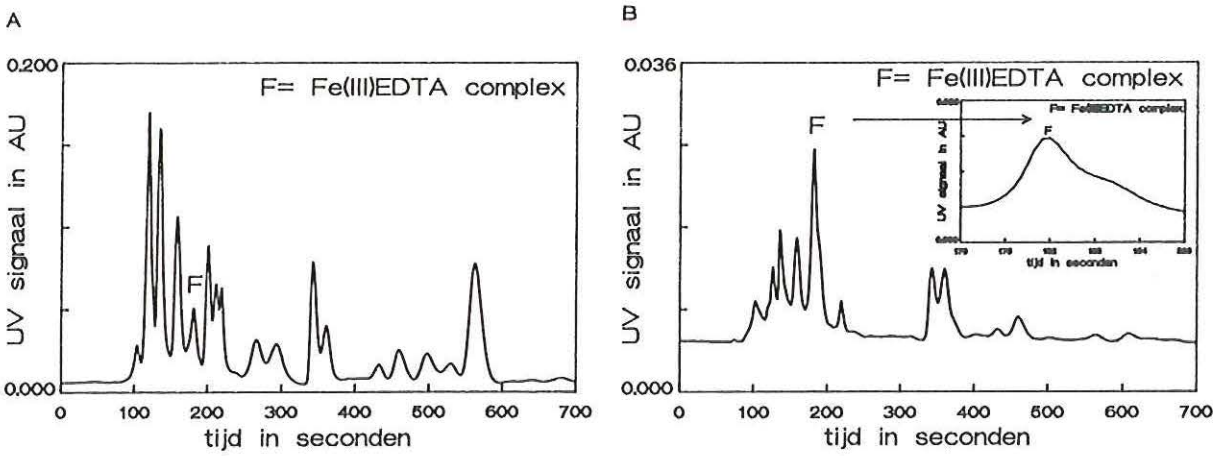
3.2.2 Onderzoek van monsters gemeten bij verschillende eluenssamenstellingen en golflengten

Van een door het Sprenger Instituut bereid monster champignonconserven waaraan 142 mg EDTA/l (zie 3.2.4) was toegevoegd werd met boven beschreven methode het gehalte aan EDTA bepaald. De Fe(III)EDTA piek was slecht gescheiden van de matrix (zie figuur 2).



Figuur 2. Chromatogram van een door het Sprenger Instituut bereid monster champignonconserven met een concentratie van 142 mg EDTA/l (zie 3.2.4); complexering met 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6); detectie bij 245 nm. Voor de HPLC condities zie figuur 1.

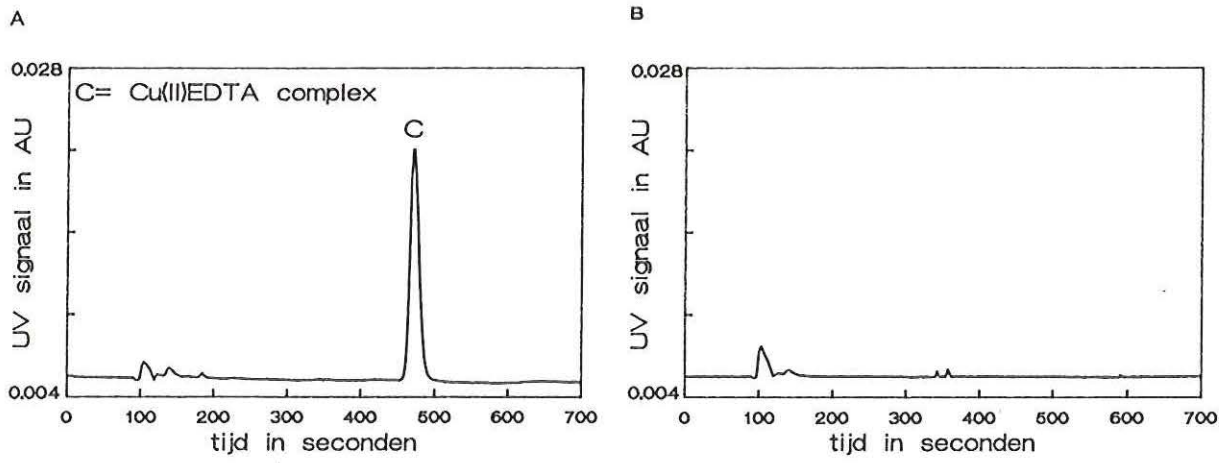
Om de scheiding te verbeteren werd de eluenssamenstelling veranderd: in plaats van de verhouding bufferoplossing-methanol van 10:1 werd 10:0,25 gebruikt. Hierdoor veranderde in geringe mate de retentietijd van Fe(III)EDTA. De scheiding ten opzichte van de matrix werd echter niet beter. Een verhoging van de TBAOH-concentratie met 50% had slechts een verhoging van de basislijn vóór elutie van de Fe(III)EDTA piek tot gevolg. Verbetering van de scheiding werd ook hier niet waargenomen. Om te onderzoeken of het Fe(III)EDTA in de monsters met EDTA-toevoeging bij andere golflengten selectiever kon worden gedetecteerd werd ook bij 270 nm en 300 nm gemeten. Bij 300 nm wordt de detectie van de Fe(III)EDTA piek beduidend minder gestoord door matrixpieken dan bij 245 nm en 270 nm (zie figuur 3), er is echter sprake van een schouder achter de Fe(III)EDTA piek (zie figuur 3b). Overigens is bij 300 nm de absorptie van het Fe(III)EDTA complex lager dan bij 245 nm.



Figuur 3. Onderzoek naar de scheiding van het Fe(III)EDTA complex van de matrix bij verschillende golflengten.
Chromatogrammen van een door het Sprenger Instituut bereid monster champignonconserven met een concentratie van 36 mg EDTA/l (zie 3.2.4); complexering met 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6); detectie bij 270 nm (A) en 300 nm (B). Voor de HPLC condities zie figuur 1.

3.2.3 Effect van toevoeging van koperchloride aan monsters en meting bij verschillende golflengten en kolomtemperatuur

Gezien de slechte scheiding tussen het Fe(III)EDTA en de matrix, werd onderzocht of de complexering met Cu^{2+}-ionen een verbetering van de scheiding opleverde. Hieruit bleek dat Cu(II)EDTA een veel grotere retentietijd heeft dan Fe(III)EDTA en dat de overmaat $CuCl_2$ de Cu(II)EDTA piek niet stoort (zie figuur 4).

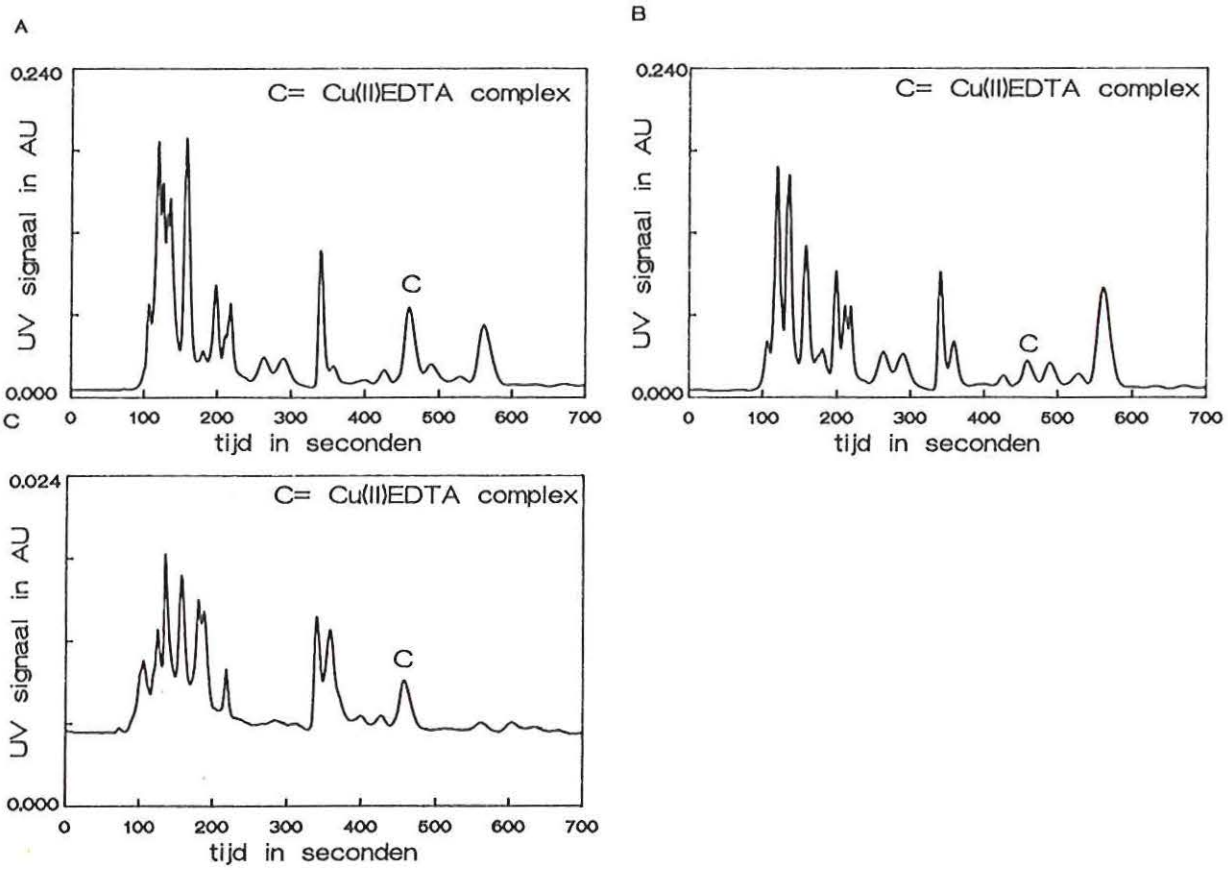


Figuur 4. Onderzoek naar de eventuele storende invloed van $CuCl_2$ op het Cu(II)EDTA complex.
A. Chromatogram van een standaardoplossing EDTA die 71 mg EDTA/l bevat; complexering met 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3); detectie bij 300 nm. B. Chromatogram van een $CuCl_2$ oplossing die 110 µg $CuCl_2$, 2 aq./ml bevat; detectie bij 300 nm. Voor de HPLC condities zie figuur 1.

In monstermateriaal bleek de Cu(II)EDTA piek aanzienlijk beter gescheiden van de matrix dan de Fe(III)EDTA piek; dit geldt zowel voor meting bij 245, 270 en 300 nm (zie figuur 5). Met name bij 300 nm werd een goede scheiding verkregen zodat gekozen werd voor meting bij deze golflengte, dit ondanks het feit dat de respons lager is dan bij 245 of 270 nm (zie figuur 5). Uit onderzoek naar het effect van de kolomtemperatuur bleek dat, voor sommige monsters de scheiding tussen Cu(II)EDTA en omliggende matrixpiekjes enigszins verbeterde indien de kolom gethermostreerd werd op 50°C zodat gekozen werd voor thermostrering bij 50°C.

3.2.4 Concentratie monsters afkomstig van het Sprenger Instituut

In de door het Sprenger Instituut vervaardigde monsters champignonconserven (2.4) werden in de opgiet lagere EDTA concentraties vastgesteld dan de opgave, namelijk 50 respectievelijk 11 mg EDTA/l in de monsters met een opgegeven gehalte van 142 respectievelijk 36 mg EDTA/l.
Een verklaring voor de lager gevonden EDTA-gehalten zou kunnen zijn dat een gedeelte van het EDTA in de champignons trekt cq. aan de champignons adsorbeert. Nader onderzoek ter bevestiging/ontkrachting van deze veronderstelling heeft niet plaatsgevonden.



Figuur 5. Onderzoek naar de scheiding van het Cu(II)EDTA complex van de matrix bij verschillende golflengten. Chromatogrammen van een door het Sprenger Instituut bereid monster champignonconserven met een concentratie van 36 mg EDTA/1 (zie 3.2.4); complexering met 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3); detectie bij 245 nm (A), 270 nm (B) en 300 nm (C). Voor de HPLC condities zie figuur 1.

3.3 Conclusies inleidende experimenten

Uit het bovengenoemde inleidend onderzoek blijkt dat de methode van De Kleijn et al., na enige essentiële modificaties, voor het onderzoek van champignonconserven te gebruiken is. Om een goede scheiding te bewerkstelligen moet het EDTA gecomplexeerd worden met Cu^{2+}-ionen in plaats van met Fe^{3+}-ionen. Door de absorptie bij 300 nm te meten in plaats van bij 245 nm kan het Cu(II)EDTA complex selectiever gedetecteerd worden. De scheiding kan nog enigszins verbeterd worden door de kolomtemperatuur op $50^{o}C$ in te stellen.

3.4 Onderzoek van verschillende reversed-phase kolommen

De geschiktheid van verschillende kolommen met reversed-phase materiaal (2.3.4) voor de bepaling van EDTA in champignonconserven werd onderzocht. De resulaten zijn samengevat in tabel 1.

Tabel 1. Retentietijd van Cu(II)EDTA op diverse kolommen

Kolom	Lengte X diameter (mm)	Kolomnummer	In gebruik sinds	Debiet (ml/min)	Retentietijd (min)
Chromspher C_{18}	100 x 3,0	878068/878245	01-05-1989	0,5	8,8
Chromspher C_{18}	100 x 3,0	657797/657567	19-10-1989	0,5	2,0
LiChrosorb 5-RP-18	150 x 4,6	0103563	niet bekend	1,0	8,4
LiChrosorb 5-RP-18	150 x 4,6	0115238	28-11-1989	1,0	9,0
Zorbax protein-plus	250 x 4,6	884999-901 RN 1193	niet bekend	0,7	7,6
Chromspher PAH	100 x 3,0	niet bekend	02-11-1989	0,5	2,0

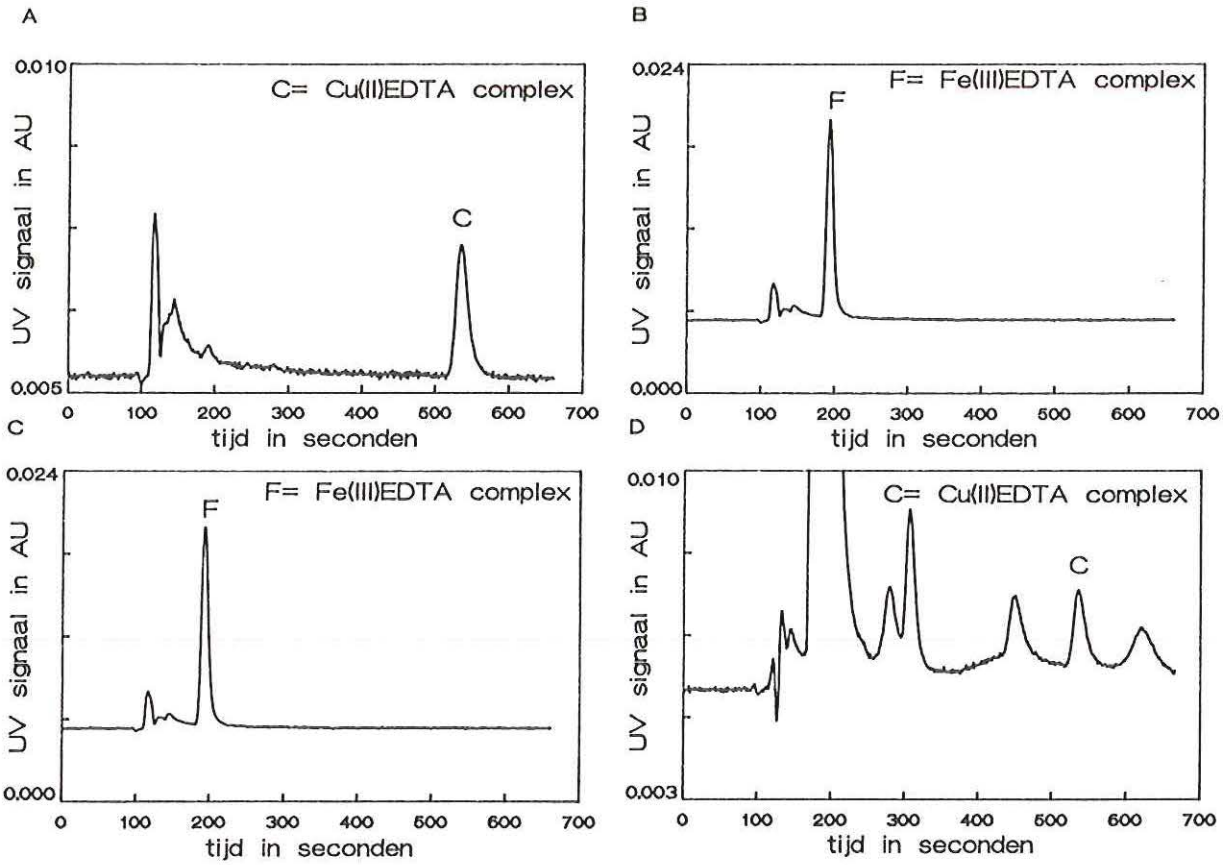
De Chromspher PAH kolommen en één van de twee sets Chromspher C18 kolommen gaven een te lage retentie, waardoor de Cu(II)EDTA piek niet voldoende van de matrixpieken werd gescheiden. De twee LiChrosorb 5-RP-18 kolommen vertoonden dezelfde retentie als de bruikbare Chromspher kolom. De Zorbax protein-plus kolom gaf een retentie van 7,6 minuten. Omdat de Chromspher PAH kolom en één van de twee sets Chromspher C18 kolommen een slechte retentie vertoonden en vanwege de hogere aanschafkosten van een Zorbax protein-plus kolom werd voor de nadere uitwerking van de methode gekozen voor de LiChrosorb 5-RP-18 kolom.

3.5 Nadere uitwerking gemodificeerde methode met behulp van de LiChrosorb 5-RP-18 kolom

3.5.1 Onderzoek naar de storende invloed van Fe^{3+}-ionen bij de complexvorming van EDTA met behulp van Cu^{2+}-ionen

Bij de complexvorming met behulp van Cu^{2+}-ionen wordt, indien in de oplossing ook Fe^{3+}-ionen aanwezig zijn, zowel Fe(III)EDTA als Cu(II)EDTA gevormd. De stabiliteitsconstante van het Fe(III)-complex is namelijk groter dan van het Cu(II)-complex (zie bijlage A).

Dit betekent in de praktijk dat er lagere EDTA-gehalten vastgesteld worden bij de aanwezigheid van Fe^{3+}-ionen. De stabiliteitsconstante voor het Fe(II)-complex is kleiner dan van het Cu(II)-complex. Door reductie van de Fe^{3+}-ionen tot Fe^{2+}-ionen kan de storing dus worden opgeheven en worden er geen lagere waarden gevonden. Uit oriënterend onderzoek in een aantal praktijkmonsters (n=20) is gebleken dat het ijzergehalte in de opgiet van champignonconserven varieert van 0,2 mg/l tot 6,7 mg/l. De reductie van Fe^{3+}-ionen wordt verkregen door aan de opgiet een overmaat L(+)-ascorbinezuur toe te voegen, namelijk 20 mg per 22,5 ml opgiet. Om dit te verifiëren werd aan een standaard EDTA van 18 mg/l 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3) toegevoegd (zie figuur 6a). Tevens werd aan een standaard EDTA van 18 mg/l 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6) toegevoegd (zie figuur 6b). Voorafgaande aan de toevoeging van L(+)-ascorbinezuur werd aan een standaard van 18 mg/l zowel $FeCl_3$ als $CuCl_2$ toegevoegd (zie figuur 6c). Hierdoor ontstaat uitsluitend het Fe(III)EDTA complex, omdat de stabiliteitsconstante van het Fe(III)-complex groter is dan van het Cu(II)-complex. Na toevoeging aan deze oplossing van L(+)-ascorbine- zuur ontstaat het Cu(II)EDTA complex in een concentratie die overeenkomt met 18 mg EDTA/l (zie figuur 6d). Hieruit blijkt dat L(+)-ascorbinezuur in de genoemde concentratie het Fe^{3+}, aanwezig in een concentratie van 33 mg/l, volledig reduceert en zodoende de storende invloed van het ijzer opheft.
Het verdwijnen van de Fe(III)EDTA piek is niet te zien omdat dit gemaskeerd wordt door absorptie van het L(+)-ascorbinezuur.



Figuur 6. Onderzoek naar de storende invloed van Fe^{3+}-ionen bij de complexvorming van EDTA met behulp van Cu^{2+}-ionen. Kolom: 150 x 4,6 mm, LiChrosorb 5-RP-18. Voorkolom: 10 x 3,0 mm, Chromguard C18. Eluens: bufferoplossing (2.2.1)-methanol (10:1 v/v). Debiet: 1,0 ml/min. Detectie: UV 300 nm. Injectievolume: 20 µl. Kolomtemperatuur: $50^{o}C$.

Chromatogrammen van een standaardoplossing EDTA (18 mg/l), waarbij aan 22,5 ml werd toegevoegd: 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3) (A); 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6) (B), achtereenvolgens 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3) en 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6) (C); achtereenvolgens 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3), 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6) en 20 mg L(+)-ascorbinezuur (D).

3.5.2 Onderzoek naar de lineariteit

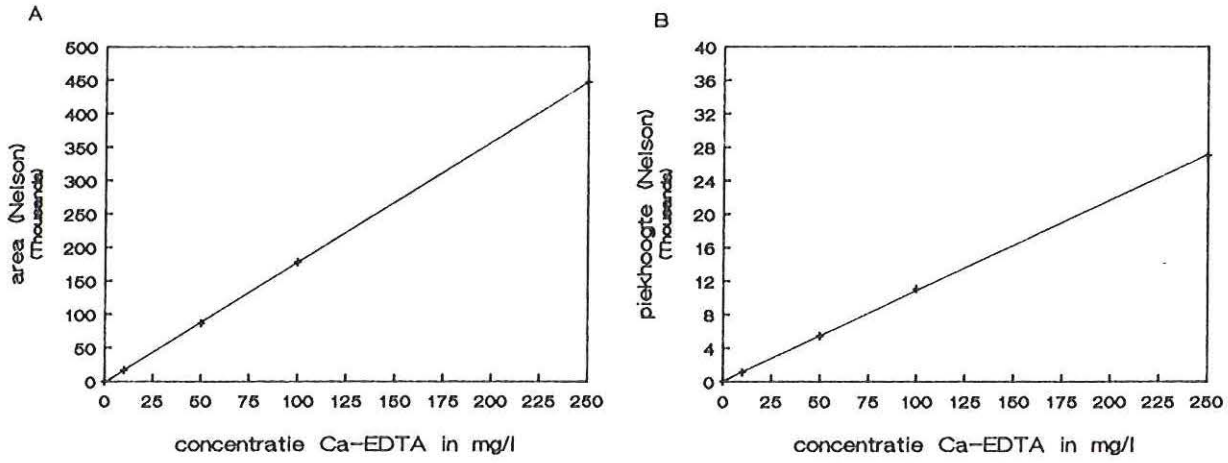
Met behulp van 4 standaardoplossingen die respectievelijk 10, 50, 100 en 250 mg/l Ca-EDTA bevatten, overeenkomend met 7, 36 , 71 en 178 mg EDTA/l, werden de piekoppervlakten en de piekhoogten (zie tabel 2) berekend en grafisch uitgezet tegen de concentratie (zie figuur 7). In tabel 3 worden de uit de analyseresultaten berekende statistische gegevens voor de oppervlakte respectievelijk hoogte versus de concentratie gegeven.

Tabel 2. Analysegegevens betreffende de bepaling van de lineariteit

Standaardoplossing	Analysegegevens		
	Retentie	Oppervlakte	Hoogte
mg/l	tijd(min)		
7	9,27	17335	1116
36	9,28	87088	5460
71	9,32	178316	11062
178	9,32	447373	27006

Tabel 3. Statistische gegevens betreffende de lineariteitsbepaling

		Conc/opp	Conc/hoogte
aantal waarnemingen	:	4	4
standaarddeviatie	:	182490	11001
standaardfout	:	81612	4920
95% betrouwbaarheidsinterval	:	159960	9643
99% betrouwbaarheidsinterval	:	210560	12694
richtingscoëfficiënt	:	1792	108
intercept	:	-924	70
correlatiecoëfficiënt	:	0,999987	0,999951



Figuur 7. Onderzoek naar de lineariteit met behulp van 4 standaard-oplossingen die respectievelijk 7, 36, 71 en 178 mg EDTA/1 bevatten; complexering met 2,5 ml $CuCl_2$; A. piekoppervlakte versus concentratie; B. piekhoogte versus concentratie. Voor de HPLC condities zie figuur 6.

Uit de statistische gegevens volgt dat er een lineair verband bestaat tussen de oppervlakte cq. de hoogte en de concentratie in de range van 7 tot 178 mg EDTA/1.

3.5.3 Onderzoek naar de herhaalbaarheid

Het onderzoek naar de herhaalbaarheid van de methode werd verricht met behulp van 20 monsters champignonconserven. De gehalten aan EDTA werden in duplo bepaald.
Uit het onderzoek volgt dat de herhaalbaarheid van de methode 5 mg EDTA/1 bedraagt. De resultaten worden vermeld in tabel 4.

Tabel 4. Resultaten van het onderzoek naar de herhaalbaarheid

Monsternummer	EDTA (mg/l) 1	2	Verschil (mg/l)
1	8,5	8,5	0
2	33,5	33,5	0
3	64,8	70,5	5,7
4	66,2	70,0	3,8
5	54,8	55.5	0,7
6	54,1	53,4	0,7
7	15,7	12,1	3,6
8	96,8	98,3	1,5
9	112,5	115,3	2,8
10	67,6	66,9	0,7
11	70,5	69,8	0,7
12	14,2	15,7	1,5
13	48,4	49,1	0,7
14	73,3	74,8	1,5
15	63,4	65,5	2,1
16	47,0	49,1	2,1
17	45,6	47,7	2,1
18	14,2	15,0	0,8
19	79,0	82,6	3,6
20	97,5	100,4	2,9

$n = 20$
$s = 1,6746$
$r^r = 5$ mg/l

3.5.4 Onderzoek naar de recovery van EDTA op een niveau van 18 mg en 178 mg Ca-EDTA/l

Met behulp van de opgiet van een blancomonster en Ca-EDTA werden oplossingen vervaardigd met gehalten van 25 en 250 mg Ca-EDTA/l, overeenkomend met respectievelijk 18 en 178 mg EDTA/l. Op deze niveau's werden 10 respectievelijk 9 analyses verricht. Het gehalte aan Ca-EDTA werd berekend met behulp van een standaardoplossing van 100 mg Ca-EDTA/l. Bij de berekening van de recoveries werd gecorrigeerd voor het Ca-EDTA gehalte in het blanco monster zonder toevoeging. In tabel 5 worden de retentietijden, de oppervlakten en het gehalte aan Ca-EDTA weergegeven van de onderzochte monsters.

Uit het onderzoek kan het volgende geconcludeerd worden:

- De recovery van het monster met een toevoeging van 25 mg/1 bedraagt 105,6 $\pm$ 3,0 % gecorrigeerd voor het aanwezige Ca-EDTA in het blanco monster.
- De recovery van het monster met een toevoeging van 250 mg/1 bedraagt 101,5 $\pm$ 0.8 % gecorrigeerd voor het aanwezige Ca-EDTA in het blanco monster.
- De retentietijd van de standaard ligt tussen 6,87 en 6,92 minuten.
- De retentietijd van het monster met 25 mg/1 Ca-EDTA toevoeging ligt tussen 6,82 en 6,87 minuten.
- De retentietijd van het monster met 250 mg/1 Ca-EDTA toevoeging ligt tussen 6,82 en 6,87.

Tabel 5. Onderzoekresultaten van de bepaling van de recovery

Monster	Retentietijd (min)	Opp.	Ca-EDTA (mg/1)	Recovery (%)
standaard 100 mg Ca-EDTA/1	6,87	110084	100	-
standaard 100 mg Ca-EDTA/1	6,87	110155	100	-
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,83	32434	26,4	105,9
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,83	30934	25,1	100,3
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,83	31947	26,0	104,1
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,83	31516	25,6	102,5
monster 25 mg Ca-EDTA/1	8,82	32127	26,2	104,7
standaard 100 mg Ca-EDTA/1	6,87	106858	97	-
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,83	32433	27,4	109,5
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,83	32197	27,1	108,6
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,85	32380	27,3	109,3
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,87	31507	26,5	106,0
monster 25 mg Ca-EDTA/1	6,85	31227	26,2	104,9
standaard 100 mg Ca-EDTA/1	6,90	102934	96	-
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,82	263661	253,8	101,5
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,82	261190	251,4	100,6
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,83	259468	249,7	99,9
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,82	264919	255,1	102,0
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,82	264634	254,8	101,9
standaard 100 mg Ca-EDTA/1	6,92	101871	99	-
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,85	264838	256,3	102,5
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,83	263499	255,0	102,0
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,82	262826	254,3	101,7
monster 250 mg Ca-EDTA/1	6,87	260930	252,5	101,0
blancomonster	6,85	3720	3,7	-

3.5.5 Bepaling van de aantoonbaarheidsgrens en de bepaalbaarheidsgrens

Met behulp van de opgiet van 20 blanco monsters werden de aantoonbaarheidsgrens en bepaalbaarheidsgrens bepaald volgens de in het RIKILT Standaard Voorschrift (RSV) F 003 gehanteerde definities:

Aantoonbaarheidsgrens = $\bar{x}\ b_1$ + 3 sigma

waarbij $\bar{x}\ b_1$ = de gemiddelde uitslag van de analyse van een serie blanco monsters

sigma = de standaardafwijking van deze serie blanco monsters.

Bepaalbaarheidsgrens = $\bar{x}\ b_1$ + 6 sigma

waarbij $\bar{x}\ b_1$ = de gemiddelde uitslag van de analyse van een serie blanco monsters

sigma = de standaardafwijking van deze serie blanco monsters.

Uit de in tabel 6 vermelde resultaten werd een gemiddeld gehalte aan EDTA berekend van 0,865 mg/l en een standaardafwijking van 1,4622. Uit deze gegevens werd een aantoonbaarheidsgrens van 5 mg EDTA/l berekend en een bepaalbaarheidsgrens van 10 mg EDTA/l.
Bij dit onderzoek werd voor een standaard, die 71 mg EDTA/l bevatte, een retentietijd gevonden van 8,65 minuten.

Tabel 6. Onderzoekresultaten van de bepaling van de aantoonbaarheidsgrens en de bepaalbaarheidsgrens

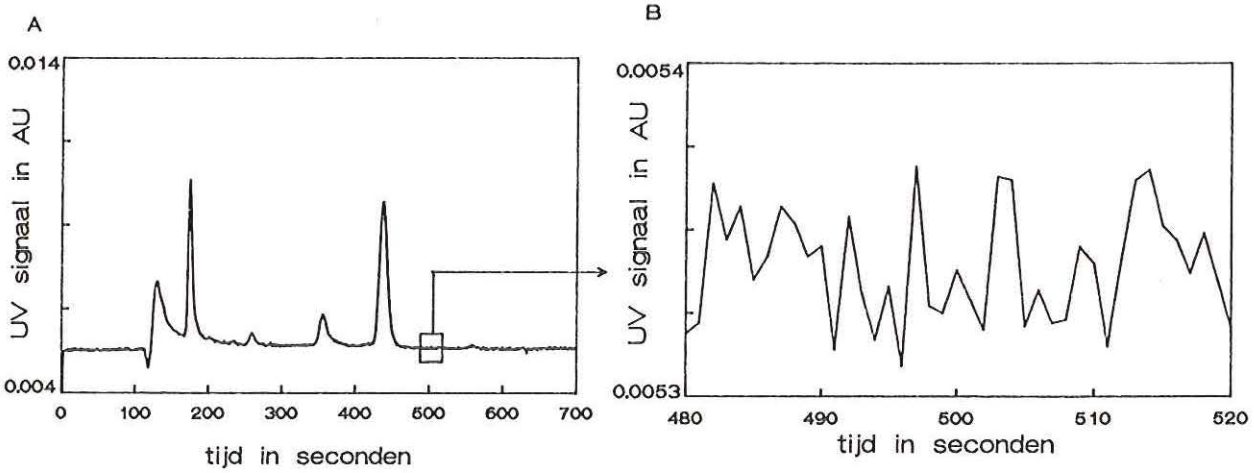
Monster	Retentietijd (min)	Oppervlakte	Gehalte EDTA (mg/l)
21	-	-	0
22	9,12	6363	2,6
23	-	-	0
24	-	-	0
25	-	-	0
26	-	-	0
27	8,68	3048	1,3
28	-	-	0
29	-	-	0
30	-	-	0
31	-	-	0
32	8,95	7661	3,4
33	-	-	0
34	-	-	0
35	8,60	14178	3,5
36	-	-	0
37	-	-	0
38	-	-	0
39	8,60	11042	4,3
40	8,77	5769	2,2

3.5.6 Bepaling van de onderste detectiegrens

Met behulp van een standaard EDTA van 71 mg/l werd de onderste detectiegrens bepaald. De ruis werd met behulp van het integratiesoftware gekwantificeerd, door het hoogteverschil tussen de top en het dal van de basislijn (sterk vergroot) te meten (zie figuur 8).

Verschil top/dal van de basislijn:		60 Nelson eenheden
Hoogte Cu(II)EDTA piek	:	9120 Nelson eenheden
Concentratie EDTA	:	71 mg/l

Uitgaande van een signaal/ruis-verhouding van 3 volgt uit de bovengenoemde grootheden dat de onderste detectiegrens 1,4 mg EDTA/1 bedraagt.



Figuur 8. Onderzoek naar de onderste detectiegrens. Chromatogram van een standaardoplossing EDTA (71 mg/l) (A); 100 x vergrote afbeelding van een stuk van de basislijn (B). Voor de HPLC condities zie figuur 6.

3.5.7 Bepaling van de dag-tot-dag spreiding

Gedurende 10 dagen is van een positief praktijkmonster het gehalte aan EDTA in duplo bepaald. In tabel 7 worden de resultaten van het onderzoek vermeld.

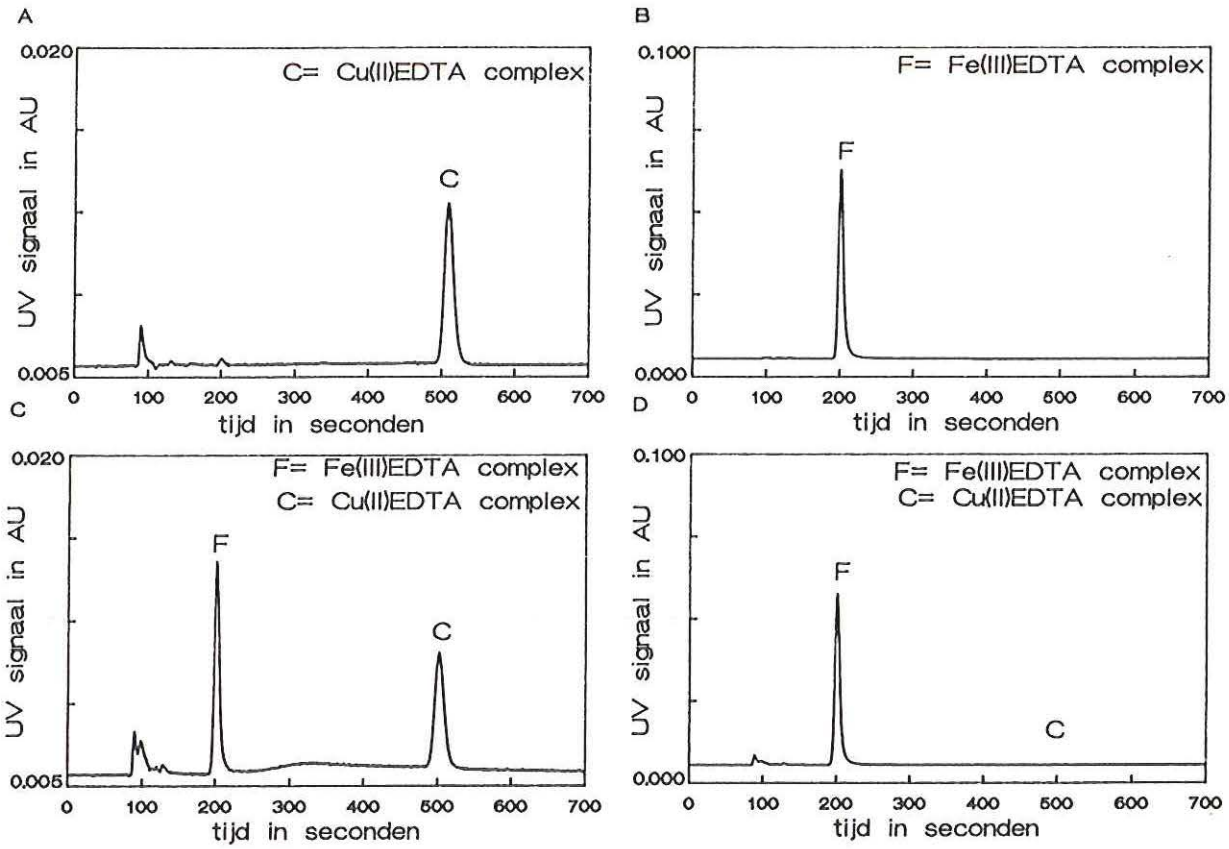
Tabel 7. Onderzoekresultaten duplo bepaling EDTA in een monster champignonconserven gedurende 10 dagen.

Dag	Retentietijd (min)		Gehalte EDTA (mg/l)		
	1	2	1	2	gemiddelde
1	6,10	6,08	81	81	81
2	5,98	5,95	79	79	79
3	5,92	5,93	80	80	80
4	5,87	5,87	78	78	78
5	5,83	5,83	76	76	76
6	5,83	5,82	75	76	76
7	5,72	5,73	79	82	80
8	5,68	5,68	78	86	82
9	5,65	5,65	78	78	78
10	5,63	5,63	78	78	78

Uit de resultaten volgt een gemiddelde waarde van 78,8 mg EDTA/1, een standaardafwijking van 2,01 en een dag-tot-dag variatiecoëfficiënt van 2,3%.

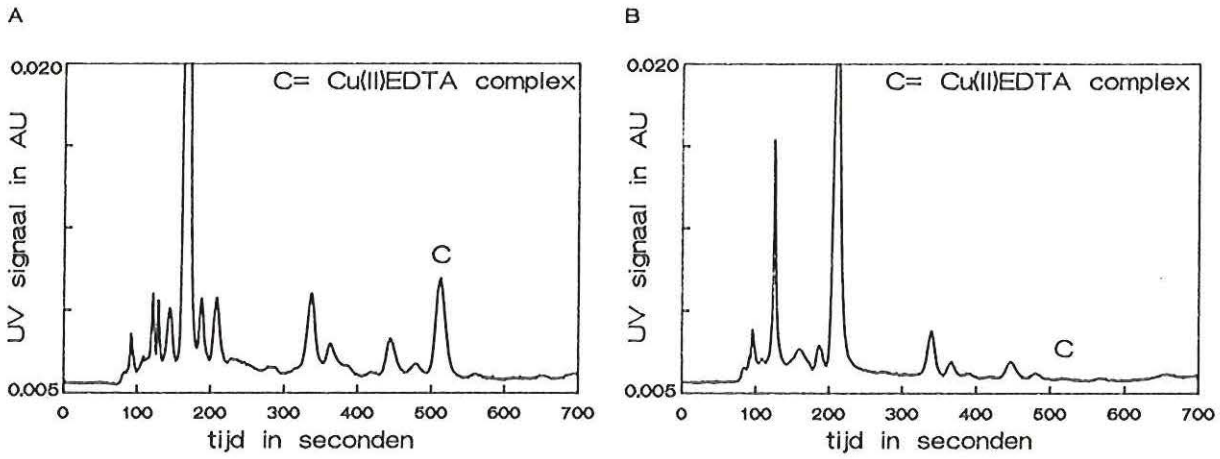
3.5.8 Vervanging van het gevormde Cu(II)EDTA door Fe(III)EDTA

Aan een standaard EDTA oplossing van 71 mg/1 werd $CuCl_2$ toegevoegd. Vervolgens werd onderzocht of door toevoeging van ijzer(III)chloride het gevormde Cu(II)EDTA zou verdwijnen en daarvoor in de plaats Fe(III)EDTA zou ontstaan. Uit het onderzoek bleek dat na 20 minuten het Cu(II)EDTA volledig was vervangen door Fe(III)EDTA (zie figuur 9).



Figuur 9. Onderzoek naar de vervanging van het gevormde Cu(II)EDTA door Fe(III)EDTA met behulp van Fe^{3+}-ionen. Chromatogrammen van een standaardoplossing EDTA (71 mg/l), waarbij aan 22,5 ml werd toegevoegd: 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3) (A); 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6) (B); achtereenvolgens 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3) en 2,5 ml $FeCl_3$ (2.2.6) (C en D) waarbij de HPLC-injectie direct (C) respectievelijk 20 minuten (D) na toevoeging van het $FeCl_3$ plaatsvond. Voor de HPLC condities zie figuur 6.

Het onderzoek werd herhaald met behulp van positieve monsters. Uit dit onderzoek bleek dat na toevoeging van 5 ml $FeCl_3$ (2.2.6) ook bij positieve monsters het Cu(II)EDTA door het Fe(III)EDTA wordt vervangen (zie figuur 10). Het toevoegen van het dubbele volume $FeCl_3$ is noodzakelijk omdat een deel van het Fe^{3+} gereduceerd wordt door het eerder toegevoegde L(+)-ascorbinezuur.
Met behulp van deze test kan dus aangetoond worden dat de gevormde piek inderdaad afkomstig is van EDTA. Omdat vóór toevoeging van $FeCl_3$ in het chromatogram al een piek aanwezig is met een vergelijkbare retentietijd als Fe(III)EDTA (retentietijd ongeveer 200 seconden, zie figuur 10b) is het echter niet mogelijk het EDTA te kwantificeren aan de hand van de Fe(III)EDTA piek.



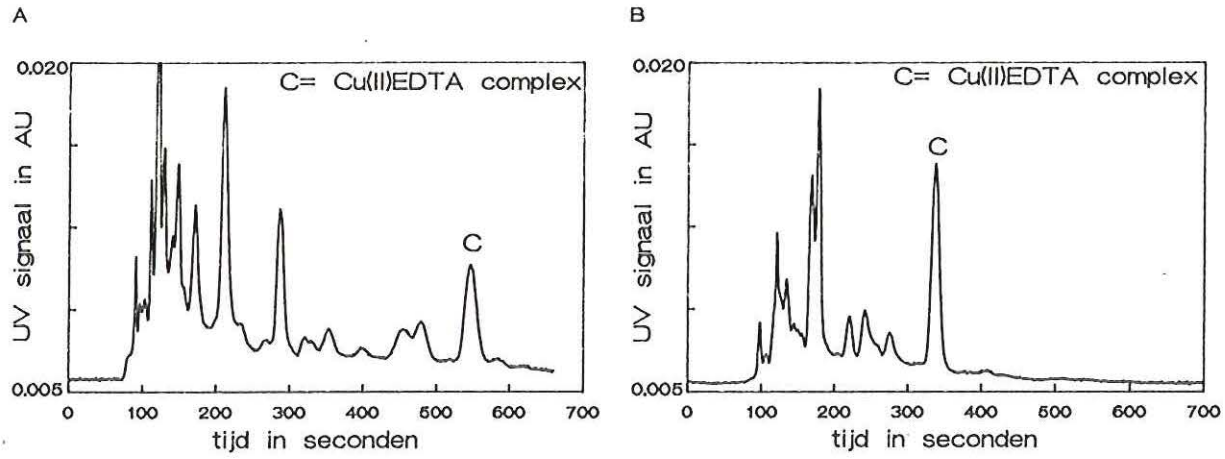
Figuur 10. Onderzoek naar de vervanging van het gevormde Cu(II)EDTA door Fe(III)EDTA met behulp van Fe^{3+}-ionen. Chromatogrammen van een door het Sprenger Instituut bereid monster champignonconserven met een concentratie van 142 mg EDTA/l (zie 3.2.4), waarbij aan 22,5 ml opgiet achtereenvolgens 2,5 ml $CuCl_2$ (2.2.3) (A) en 5,0 ml $FeCl_3$ (2.2.6) (B) werd toegevoegd. Oplossing B werd 20 minuten na toevoeging van $FeCl_3$ gemeten. Voor de HPLC condities zie figuur 6.

3.5.9 Conditie van de kolom gedurende het onderzoek

Op de LiChrosorb 5-RP-18 kolom werden gedurende het onderzoek ongeveer 350 injecties gepleegd. De retentietijd nam in deze periode van 3 maanden af van 9,3 naar 5,6 minuten. Door deze afname werd de scheiding tussen Cu(II)EDTA en de matrix niet nadelig beïnvloed (zie figuur 11).

3.5.10 Bevestiging van positieve resultaten met behulp van een titrimetrische methode

Met behulp van de titrimetrische methode van Rindertsma en Verhey is, na enige modificaties, het EDTA-gehalte bepaald van een aantal praktijk monsters. Hieruit is gebleken dat de resultaten in het algemeen vergelijkbaar zijn met die van de HPLC-methode.
De uitwerking van deze methode wordt in een apart rapport weergegeven.



Figuur 11. Onderzoek naar de afname van de retentie van het Cu(II)EDTA complex tijdens het onderzoek. Chromatogrammen van praktijkmonsters die respectievelijk 26 (A) en 60 mg EDTA/1 (B) bevatten. Chromatogram A begin onderzoek en chromatogram B 3 maanden later. Voor de HPLC condities zie figuur 6.

4 CONCLUSIES

De in dit rapport beschreven methode is geschikt voor de kwantitatieve bepaling van EDTA en de zouten ervan in de opgiet van champignonconserven. Er bestaat een lineair verband tussen de piekoppervlakte cq. de piekhoogte en de concentratie in de range van 7 tot 178 mg EDTA/1. De herhaalbaarheid van de methode bedraagt 5 mg EDTA/1. De recovery is 105,6 $\pm$ 3,0% respectievelijk 101,5 $\pm$ 0.8 % voor toevoegingen aan de opgiet van 18 en 178 mg EDTA/1. De aantoonbaarheidsgrens bedraagt 5 mg EDTA/1 terwijl er voor de bepaalbaarheidsgrens 10 mg EDTA/1 gevonden werd. De onderste detectiegrens bedraagt 1,4 mg EDTA/1. Wanneer een positief monster (niveau 79 mg EDTA/1) gedurende 10 dagen wordt geanalyseerd, wordt een dag-tot-dag variatiecoëfficiënt gevonden van 2,3%.

Bevestiging van positieve monsters kan plaatsvinden door het gevormde Cu(II)EDTA te vervangen door Fe(III)EDTA door toevoeging van Fe^{3+}-ionen. Ter bevestiging van de aanwezigheid van EDTA kan ook een snelle titrimetrische methode worden toegepast. De uitwerking van deze methode en de vergelijking van de resultaten ervan ten opzichte van de HPLC-methode zullen in een apart RIKILT rapport worden vermeld.
De methode van onderzoek is beschreven in een RIKILT Standaard Voorschrift (RSV) nr. A0568 (bijlage A).

DANKWOORD
Tijdens het onderzoek is gebruik gemaakt van monstermateriaal, dat door het voormalige Sprenger Instituut* beschikbaar is gesteld. Hiervoor zijn wij zeer erkentelijk.

* In 1989 opgegaan in het Instituut voor Agro Technologisch Onderzoek (ATO)

LITERATUUR

McCord, J.D. and A. Kilara. Control of Enzymatic Browning in processed Mushrooms (Agaricus Bisporus).
J. Food Sci., 48 (1983), 1479.

Hamano, T., Y. Mistuhashi, K. Tanaka, Y. Matsuki, Y. Oji and S. Okamoto. Colorimetric Determination of Ethylenediaminetetra-acetic Acid in Foods.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180 (1985), 280-283.

Harmsen, J. and A. van den Toorn. Determination of EDTA in water by High Performance Liquid Chromatography.
J. Chromatogr. 249 (1982), 379-384.

De Kleyn, J.P., P.G. de Koster en K. Hoven. De bepaling van EDTA in Mayonaise met behulp van HPLC.
De Ware(n) Chemicus, 15 (1985), 26-30.

Perfetti, G.A. and C.R. Warner. Reverse Phase Ion Pair High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Ethylenediaminetetra-acetic Acid in Crabmeat an Mayonaise.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62 (1982), 1092-1095.

Rindertsma, C. en J.G.P. Verhey. Een snelle en eenvoudige bepaling van sporen EDTA.
Voedingsmiddelentechnologie 11 (1978) nr 19, 17.

Venezky, D.L. and W.E. Rudzinski. Determination of Ethylenediaminetetra-acetic Acid in Boiler Water by Liquid Chromatography.
Anal. Chem. 56 (1984), 315-317.

KOPIE

RIKILT

BORNSESTEEG 45

WAGENINGEN

Titel RSV:
Champignonconserven - Bepaling van EDTA in opgiet - HPLC

RSV nr	: A0568
DAM code	: 0700404
Uitgiftedatum	: 1990-12-05
Editie nr.	: 2
Aantal pag.	: 9 + 4

	NAAM	HANDTEKENING
Opgesteld door	A. van Polanen	
Goedgekeurd door	dr J. de Jong	
Uitgegeven door	drs P.H.U. de Vries	

VERZENDLIJST

	Naam afdeling	Opmerking		Naam afdeling	Opmerking
1	AC	3x	7		
2	ASA	1x	8		
3	CKV	1x	9		
4	Conex	1x	10		
5			11		
6			12		

OVERZICHT VAN WIJZIGING IN DIT RSV

	Datum	Pag.nrs.	Par.nrs.		Datum	Pag.nrs.	Par.nrs.
1				5			
2				6			
3				7			
4				8			

Lijst: F001/1
Datum: 27/05/88

KOPIE

RIKILT
BORNSESTEEG 45
WAGENINGEN

RSV nr A0568
Uitgiftedatum 1990-12-05

Titel: Champignonconserven - Bepaling van ethyleendiaminetetra - azijnzuur (EDTA) en de zouten ervan - HPLC

Opgesteld door : A. van Polanen	Datum 1990-12-05 DAM code 0700404 Editie nr. 2 Aantal pag. 9 + 4
Akkoord Directie:	

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt van 7 mg EDTA/l tot 178 mg EDTA/l in de opgiet van champignonconserven. Het toepassingsgebied geldt niet voor de metaal-EDTA-complexen welke een grotere stabiliteitsconstante hebben dan die van het Cu(II)-EDTA-complex (log k = 18.8) (bijlage 4).
Het terugvindingspercentage van de methode is 105,6 $\pm$ 3,0% (VC = 2,79%; n = 10) bij toevoeging van 18 mg/l, het terugvindingspercentage van de methode is 101,5 $\pm$ 0,8% (VC = 0,82%; n = 9) bij toevoeging van 178 mg/l (bepaald onder herhaalbaarheidscondities).

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 5 mg EDTA/l.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 10 mg EDTA/l.

2 DEFINITIE

Het voorschrift beschrijft de methode voor de bepaling van het gehalte aan ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) en de zouten ervan in de opgiet van champignonconserven. Het gehalte wordt uitgedrukt als ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) in mg/l.

89.50.041

KOPIE

3 BEGINSEL

Aan de opgiet van champignonconserven wordt koper(II)chloride toegevoegd waardoor de in de opgiet aanwezige EDTA wordt omgezet naar het Cu(II)-EDTA-complex. Tevens wordt aan de opgiet L(+)-ascorbinezuur toegevoegd om de eventueel aanwezige Fe(III)-ionen te reduceren naar Fe(II)-ionen, zodat er geen Fe(III)-complex gevormd kan worden. Het Cu(II)-EDTA-complex wordt geanalyseerd met behulp van "reversed-phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 300 nm.

4 PRECISIE

De onderstaande gegevens zijn gebaseerd op resultaten van praktijkmonsters.

4.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen in hetzelfde laboratoriummonster gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon dient niet groter te zijn dan 5 mg/l.

4.2 Reproduceerbaarheid

Niet bekend.

5 CHEMICALIËN EN REAGENTIA

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van hogere kwaliteit indien dat vermeld is. Met "water" wordt bedoeld water gereinigd over een Milli Q installatie met een minimale weerstand van 10 Megaohm-cm of water van vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Chemicaliën

5.1.1 L(+)-ascorbinezuur (b.v. Merck art. 127)

5.1.2 Ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. (b.v. Sigma art. ED2SC)

5.1.3 Koper(II)chloride 2 aq. (b.v. Merck art. 2732)

89.50.041

KOPIE

5.1.4 Methanol (b.v. Merck art. 6007)

5.1.5 Natriumacetaat, watervrij (b.v. Merck art. 6264)

5.1.6 Tetrabutylammoniumhydroxide (TBAOH), 20% waterige oplossing (b.v. Merck art. 818759)

5.1.7 IJsazijn (b.v. Merck art. 63.2500)

5.1.8 IJzer(III)chloride 6 aq. (b.v. Merck art. 3943)

5.2 Reagentia

5.2.1 Bufferoplossing
Los 26 ml TBAOH (5.1.6) en 2,46 g natriumacetaat (5.1.5) op in 1 liter water. Breng de pH op 4,0 met behulp van ijsazijn (5.1.7).

5.2.2 HPLC-eluens
Meng 1 liter bufferoplossing (5.2.1) met 100 ml methanol (5.1.4). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcylinders afgemeten. Filtreer het eluens over een gecombineerd filter (6.5). Maak voor iedere serie metingen vers eluens.

5.2.3 Koperreagens
Los in een maatkolf van 100 ml 110 mg koperchloride (5.1.3) op in 30 ml ijsazijn (5.1.7) en vul aan met water tot 100 ml.

5.2.4 Hoofdstandaardoplossing ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq.
Weeg 1 gram ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. (5.1.2) op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan met water tot 100 ml. Registreer de exacte standaardconcentratie, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof. Maak voor iedere serie bepalingen verse standaardoplossingen.

5.2.5 Verdunde standaardoplossingen ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq.
Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.4) met glazen volumepipetten respectievelijk 0,1; 0,5; 1 en 2,5 ml in maatkolven van 100 ml. Vul aan met water en meng. Deze oplossingen bevatten respectievelijk 10; 50; 100 en 250 mg ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. per liter. De oplossingen voor iedere serie bepalingen vers bereiden.

5.2.6 IJzerreagens
Los in een maatkolf van 100 ml 175 mg ijzer(III)chloride (5.1.8) op in 30 ml ijsazijn (5.1.7) en vul aan met water tot 100 ml.

6 APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

6.1 Analytische balans met een nauwkeurigheid van 0,1 mg (b.v. Mettler HL 32)

6.2 HPLC-opstelling bestaande uit:
- Vloeistofleveringssysteem (b.v. Waters 6000A)
- Injectiesysteem geschikt voor volumina van 20-200 µl (b.v. Waters WISP 710b)
- Kolomoven (b.v. Waters TCM)
- UV detector (b.v. PU 4020)
- Recorder (b.v. Kipp BD-41)
- Voorkolom: Chromguard C18, 10 x 3,0 mm, (Chrompack art. 28186)
- Analytische kolom: LiChrosorb 5-RP-18, 150 x 4,6 mm, deeltjesgrootte 5 µm (Chrompack art. 28810).

6.3 Vouwfilter, doorsnede 150 mm, 595 1/2 (b.v. Schleicher en Schuell)

6.4 Acrodisc filters 0,45 µm (b.v. Gelman 4184)

6.5 Eluensfilter 0,45 µm (b.v. Millipore art. HVLP 047 00)

6.6 Normaal laboratoriumglaswerk

KOPIE

7 WERKWIJZE

7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in tweevoud te beginnen bij de monsterextractie. Neem bij elke serie monsters een blanco monster, een blanco monster met toevoeging van ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco monster is een mengsel van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyses geen EDTA is gevonden. Voor een toevoeging aan het blanco monster van 100 mg ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. per liter wordt 1 ml van de hoofdstandaardoplossing (5.2.4) met behulp van een glazen volumepipet in een maatkolf van 100 ml gepipetteerd en met behulp van de opgiet van het blanco monster aangevuld tot de maatstreep.
Het blanco monster, het blanco monster met toevoeging en het eventuele referentiemonster worden diepgevroren bewaard en zijn bij normaal gebruik een half jaar houdbaar.
Voor controle van deze oplossingen wordt verwezen naar de batchcontrolestaat volgens F0016.

7.2 Voorzorgsmaatregelen

7.2.1 Neem voorzorgen om inhalatie en huidcontact met het eluens en oplosmiddelen te voorkomen. Werk waar mogelijk in een afzuigkast en gebruik handschoenen. Dit geldt met name voor TBAOH (5.1.6) en ijsazijn (5.1.7).

7.3 Voorbehandeling van het monster

Filtreer het monster over een papierfilter (6.3).

7.4 Monsterextractie

Pipetteer in een maatkolfje van 25 ml 2,5 ml koperreagens (5.2.3). Voeg minimaal 20 mg (L+)-ascorbinezuur (5.1.1) toe, vul aan met de champignonopgiet en meng. Filtreer de oplossing door een 0,45 µm filter (6.5) en gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.6).

KOPIE

7.5 Voorbewerking standaarden

Pipetteer in vier maatkolfjes van 25 ml 2,5 ml koperreagens (5.2.3). Voeg aan elk 20 mg (L+)-ascorbinezuur (5.1.1) toe en vul aan met de verdunde standaardoplossingen (5.2.5) en meng. Filtreer elke oplossing door een 0,45 µm filter (6.4) en gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.6).

7.6 HPLC-analyse

7.6.1 Meetcondities

Parameter	instelling/keuze
Kolomoven	50 °C
Pompdebiet	1,0 ml/min
Injectievolume	20 µL
Meetgolflengte	300 nm
Gevoeligheid	0,01 - 0,04 Aufs
Recorder	10 mV; 5 mm/min.

7.6.2 Conditioneren HPLC-kolom

De HPLC-kolom (6.2) dient gedurende 12 uur gespoeld te worden met eluens (5.2.2), om de kolom te conditioneren.
Voorafgaande aan het conditioneren met eluens dient eerst een uur gespoeld te worden met water. Indien de kolom na een analyserun voor langere tijd niet gebruikt zal worden, wordt tenminste 4 uur gespoeld met water en daarna gedurende 1 uur met methanol (5.1.4).
Het debiet moet bij deze handelingen steeds 1,0 ml/min zijn.

7.6.3 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de voorbewerkte standaardoplossingen (7.5) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De asymmetriefactor (f_{as}) van de Cu (II)-EDTA-piek moet kleiner zijn dan 2. De ijklijn wordt bepaald door middel van de methode van de kleinste kwadraten. Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de standaardoplossingen, met dien verstande dat iedere individuele waarneming van de standaardoplossingen

89.50.041

bij toetsing aan de ijklijn, geen grotere afwijking mag hebben dan 5% relatief; voor de laagste standaard geldt 2 mg/l absoluut. Het intercept van de ijklijn mag omgerekend niet meer dan 5 mg/l bedragen. Bij een grotere afwijking bij de individuele waarnemingen en van het intercept worden de verdunde standaardoplossingen opnieuw bereid. Injecteer daarna het extract van het volgens 7.4 voorbewerkte blanco monster en blanco monster met toevoeging. Indien de asymmetriefactor van de Cu-(II)-EDTA-piek groter of gelijk is dan 2 of als deze piek niet van de matrix is gescheiden, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.
Injecteer daarna achtereenvolgens de verdunde standaardoplossing ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. (5.2.5) van 100 mg/l, maximaal 5 monsterextracten en vervolgens weer de verdunde standaardoplossing. Herhaal deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.
Bereken volgens 8.1 het gehalte ethyleendiaminetetra-azijnzuur van de opgiet door vergelijking van de piekhoogte en/of piekoppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogten en/of piekoppervlakten van de verdunde standaardoplossing van 100 mg ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. per liter die voor en na het monsterextract geïnjecteerd is.
Enkele karakteristieke chromatogrammen zijn gegeven in bijlage 1.

8 RESULTATEN

8.1 Berekening

Het gehalte ethyleendiaminetetra-azijnzuur in de opgiet wordt met de volgende formule berekend:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times c_{st} \times 100 \times 0,712$$

G = gehalte ethyleendiaminetetra-azijnzuur in mg/l
h_m = piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
h_{st} = piekhoogte (mm) of oppervlakte van de verdunde standaardoplossing

c_{st} = concentratie van de verdunde standaardoplossing ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. in mg/l (5.2.5)

0,712 = omrekeningsfactor van ethyleendiaminetetra-azijnzuur calcium-di-natriumzout 2 aq. naar ethyleendiaminetetra-azijnzuur.

Het uiteindelijke gehalte is het gemiddelde van de duplo analyse.

8.2 Bevestiging

- Indien het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen in hetzelfde laboratoriummonster gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon groter is dan 5 mg/l of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 98% of hoger dan 108% dient de analyse te worden herhaald.
- Aan monsters met een berekend gehalte groter dan 10 mg/l wordt aan 2,5 ml extract, voorbehandeld volgens 7.4, 5 ml ijzerchloride (5.2.6) toegevoegd. Injecteer na 20 minuten het extract. Indien het Cu-EDTA-complex verdwenen is worden de monsters als "positief" aangemerkt.
- De titrimetrische bepaling van ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) wordt aangewend voor bevestiging van het gehalte van met de HPLC-methode positief bevonden monsters (RSV A0569).

8.3 Registratie

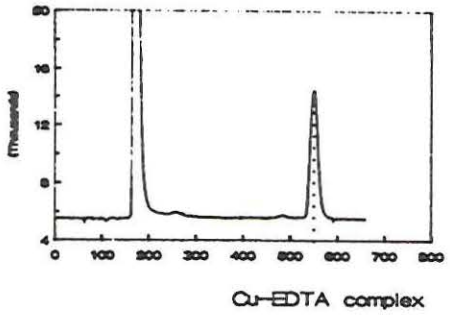
Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters en de gevonden gehalten worden weergegeven op het waarnemingsformulier overeenkomstig bijlage 2 van dit voorschrift.

In bijlage 3 worden de resultaten van de verdunde standaardoplossingen, blanco monster, blanco monster met toevoeging en het eventuele referentiemonster weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van het terugvindingspercentage en het referentiemonster vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

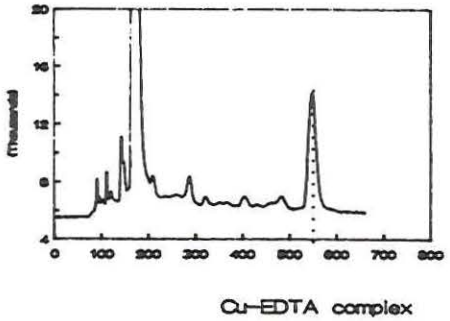
LITERATUUR

Kleijn J.P. de et al., De Ware(n)-Chemicus 15 (1985), 26-33.

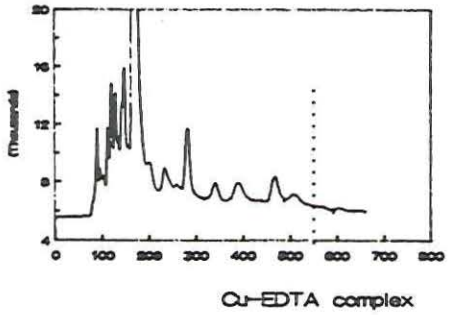
Bijlage 1 bij RSV nr. A 0568



a= standaard Ca-EDTA 100 mg/l



b= positief monster met een gehalte van 91 mg/l



c= blanco monster

lijst : A 0568/1
datum : 1990-02-02

KOPIE

Waarnemingsformulier
Afdeling : Algemene chemie
Bepaling : EDTA

Bijlage 2 bij RSV nr: A 0568
lijst: A 0568/2
datum : 1990-02-02

datum	monster nr.	soort monster	verwacht gehalte	piekhoogte mm	gehalte mg/kg	analist	opm

KOPIE

Resultatenformulier controles
Afdeling : Algemene chemie
Bepaling : EDTA in Champignon-opgiet.

Bijlage 3 bij RSV nr A 0568
lijst : A 0568/3
datum : 1990-02-02

		standaard EDTA					blanco	recovery		referentie		conclusie
batch	datum	conc. ug/ml	piek opp	range Aufs	piek hgt	symm	gehalte mg/kg	toegev mg/kg	gevond %	verwacht mg/kg	gevond mg/kg	hfd lab ass.

KOPIE

KOPIE

Overzicht van bij het RIKILT bekende stabiliteitsconstanten, uitgedrukt als log k, van metaal EDTA-complexen.

Soort	log k
Na-EDTA	1,7
Li-EDTA	2,8
Ag-EDTA	7,3
Ba-EDTA	7,8
Sr-EDTA	8,6
Mg-EDTA	8,6
Ca-EDTA	10,7
Mn(II)-EDTA	13,6
Fe(II)-EDTA	14,3
La(III)-EDTA	15,7
Ce(III)-EDTA	15,9
Co(II)-EDTA	16,2
Al(III)-EDTA	16,3
Zn-EDTA	16,3
Cd-EDTA	16,6
Pd-EDTA	18,0
Y(III)-EDTA	18,2
Ni-EDTA	18,6
Cu(II)-EDTA	18.8
Lu(III)-EDTA	20,0
Ga(III)-EDTA	20,5
Hg(II)-EDTA	21,8
Sc(III)-EDTA	23,1
Th(IV)-EDTA	23,2
Cr(III)-EDTA	24,0
In(III)-EDTA	24,9
Fe(III)-EDTA	25,1

Lijst: A0568/4

Datum: 1990-02-01

89.50.041