

Project 505.3080

Ontwikkeling van analysemethoden voor de bepaling van etherische oliën in karwij.

Projectleider: dr J. de Jong

Rapport 90.58

December 1990

Ontwikkeling van een gaschromatografische methode voor de bepaling van carvon en limoneen in karwij

J.J. van Oostrom en H.J. van der Kamp

Afdeling: Algemene Chemie

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 tuinbouwprodukten.

Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

projectleider

afdeling Algemene Chemie (5x)

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

circulatie

bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Directie Akker- en Tuinbouw

Directie Verwerking en Afzet Agrarische Produkten

Centrum voor Plantenveredelings Onderzoek, dr J.P.F.G. Helsper

Instituut voor Agrotechnologisch Onderzoek, drs B.G. Muuse en

ir P. van Eijck

Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek, ir W. Meijer en

dr ir H.J. Bouwmeester

Agralin

ABSTRACT

Ontwikkeling van een gaschromatografische methode voor de bepaling van carvon en limoneen in karwij.

Development of a gaschromatographic method for the determination of carvone and limonene in caraway (*Carum carvi* L.).

Report 90.58

December 1990

J.J. van Oostrom and H.J. van der Kamp

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

1 figure, 7 tables, 4 references, 2 annexes

A gaschromatographic (GC) method is developed for determination of the essential oils carvone and limonene in caraway. After addition of methyldecanoate as the internal standard, the seeds are grinded in hexane in a ball-mill. In this way the total oil fraction is extracted. When directly injected, the non-volatile triglycerides from the oil fraction can pollute the GC column. For this reason the fatty acids in the triglycerides are converted in methylesters by methanolic potassium hydroxide. After a modification of the standard procedure in our laboratory for the preparation of the methylesters viz. the addition of water after transesterification, reproducible calibration factors were obtained for carvone and limonene which correspond well with the calibration factors obtained without this step.

Carvone and limonene are quantitatively extracted by the procedure described above. This could be concluded by subsequent Soxhlet extraction and repeated extraction of the meal obtained after ball-mill and Soxhlet extraction. Quantitative recovery of carvone and limonene was also obtained after standard addition of carvone and limonene to caraway seed. Applying the method described above, 26 samples of caraway were analysed. The carvone content varies from 1.13% to 3.24%, the limonene content varies from 0.99% to 2.47%. Both for carvone and limonene the standard deviation of the method is 0.04% and consequently the repeatability is 0.1%.

Keywords: caraway, *Carum carvi* L., limonene, carvone, determination, gaschromatography

()

()

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODEN	8
2.1 Materiaal	8
2.2 Methoden	8
3 ONTWIKKELING METHODE	9
3.1 Methylesterbereiding	9
3.2 Extractie	13
3.2.1 Vergelijkend onderzoek "direct" en "soxhlet"	13
3.2.2 Verliezen tijdens soxhletextractie	14
3.2.3 Controle op volledige extractie van carvon en limoneen	14
3.3 Standaardadditie	15
3.4 Herhaalbaarheid	16
4 CONCLUSIE	18
LITERATUUR	19
BIJLAGEN	
A WERKVOORSCHRIFT VOOR DE BEPALING VAN CARVON EN LIMONEEN IN KARWIJZAAD	
B GEGEVENS MONSTERS KARWIJZAAD CPO	

()

()

SAMENVATTING

In het kader van het "Onderzoeksprogramma ter verbetering van karwij als akkerbouwgewas en ter introductie van nieuwe afzetmogelijkheden" is een gaschromatografische methode ontwikkeld voor de bepaling van carvon en limoneen in karwijzaad. Karwijzaad wordt na toevoeging van methyldecanoaat als interne standaard, met een kogelschudmolen gemalen in hexaan. Hierbij worden zowel de etherische oliën waartoe carvon en limoneen behoren, als ook de overige olie geëxtraheerd. Deze overige olie die voornamelijk uit triglyceriden bestaat, kan bij directe injectie kolomvervuiling veroorzaken omdat het hier gaat om weinig vluchtige verbindingen. De vetzuren in de triglyceriden worden daarom omgezet in methylesters door herverestering van oliën en vetten met een methanolische kaliumhydroxide-oplossing zoals beschreven in NEN 6302. De invloed van het methyleren op carvon en limoneen is onderzocht. Hierbij bleek dat de kalibratiefactoren van gemethyleerde standaarden afwijken van en minder constant zijn dan de kalibratiefactoren van ongemethyleerde standaarden. Door toevoeging van water na het methyleren worden wel constante en vergelijkbare kalibratiefactoren gevonden.

Verder is onderzocht of na extractie in de kogelschudmolen een soxhletextractie noodzakelijk is om carvon en limoneen kwantitatief te bepalen. Uit het onderzoek bleek dat met en zonder soxhletextractie vergelijkbare gehalten worden gevonden.

Ook is onderzocht of in het schroot verkregen na kogelschudmolen en soxhletextractie nog carvon en limoneen aangetoond kan worden hetgeen veroorzaakt zou kunnen worden door onvoldoende malen van het zaad of door onvoldoende extractie met hexaan als oplosmiddel. Na potteren waarbij het schroot wordt vermalen tot op celniveau kon nog 0.03% carvon op zaadbasis worden aangetoond terwijl geen limoneen werd gevonden. Ook werd het schroot nog een tweede keer in de kogelschudmolen gebracht en geëxtraheerd met hetzij een mengsel van pentaan en diethylether hetzij met hexaan. Hierbij werden carvon en limoneen aangetoond in concentraties van resp. 0,01% en 0,02%.

Na standaardadditie van carvon en limoneen aan karwijzaad werden carvon en limoneen volledig teruggevonden. Met de ontwikkelde methode zijn 26 monsters karwijzaad van verschillende herkomsten, ras en

oogstjaar onderzocht. Het carvongehalte varieert in de 26 monsters van 1,13% tot 3,24%, het limoneen gehalte varieert van 0,99% tot 2,47%. De uit de duploverschillen berekende standaarddeviatie bedraagt voor carvon en limoneen 0,04% hetgeen neerkomt op een herhaalbaarheid van 0,1%.

1 INLEIDING

Karwij (*Carum carvi* L.) behoort tot de familie der Umbelliferae. Karwij staat vooral in de belangstelling omdat het carvon bevat. Carvon vormt samen met limoneen het hoofdbestanddeel van de etherische oliën in karwij. Karwijzaad wordt momenteel vooral gebruikt bij de bereiding van brood, worst, kruidenazijn e.d. terwijl carvon wordt gebruikt als smaak- en geurstof bij de produktie van o.a. zeep, tandpasta, parfums en kauwgum.

In Nederland wordt in het kader van het "Onderzoeksprogramma ter verbetering van karwij als akkerbouwgewas en ter introductie van nieuwe afzetmogelijkheden" door verschillende landbouwinstituten onderzoek gedaan naar karwij. Het onderzoeksprogramma heeft tot doel:

- het ontwikkelen van nieuwe afzetmogelijkheden voor karwij waarbij o.a. gekeken wordt naar de toepasbaarheid van het carvon in de agrarische sector (o.a. kiemremmingsmiddel voor aardappelen en granen, fungicide) en de farmaceutische industrie;
- het vergroten van de concurrentiepositie van karwijprodukten op de internationale markt door verbetering van de kwaliteit en opbrengst door veredeling en optimalisering van de teeltmethodiek.

Door het Centrum voor Plantenveredelings Onderzoek (CPO) is een veredelingsprogramma gestart voor karwij. Het CPO maakt voor de bepaling van het carvongehalte gebruik van Nabij Infrarood Reflectie Spectroscopie (NIRS). Als referentiemethode voor de ijking van de NIRS is gebruik gemaakt van een methode waarbij het etherisch oliegehalte door middel van stoomdestillatie wordt bepaald. Daarna wordt in deze fraktie refractometrisch het carvongehalte bepaald. Deze methode is erg tijdrovend en slecht reproduceerbaar. Er is derhalve behoefte aan een betrouwbare referentiemethode.

Het Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO) en het Proefstation voor de Akkerbouw op de Vollegrond (PAGV) zijn bezig met onderzoek naar de optimalisatie van de teeltmethodiek voor karwij. Ook hier bestaat behoefte aan analytische ondersteuning op het terrein van de bepaling van carvon. Er zijn afspraken gemaakt dat het RIKILT hierin zal participeren.

Voor de bepaling van het carvon- en limoneengehalte van het zaad wordt meestal eerst het gehalte aan etherische olie bepaald door stoomdestillatie (o.a. Koedam e.a., Betts, Schantz e.a.). Daarna kan in het

stoomdestillatie-extract het gehalte aan carvon o.a. spectrofotometrisch (Betts), gaschromatografisch (Koedam e.a.) of refractometrisch (bron CPO) bepaald worden. Door Koedam e.a. wordt een methode beschreven waarbij het zaad wordt gemalen na toevoeging van vast koolstofdioxide. Met een mengsel van pentaan en diethylether wordt vervolgens in een soxhletopstelling de olie geëxtraheerd. Nadeel is dat hierbij naast de etherische olie ook de overige olie (ca. 15% op produktbasis) wordt mee geëxtraheerd welke stoort bij directe injectie in een gaschromatografische kolom.

In dit rapport wordt een door het RIKILT ontwikkelde gaschromatografische methode beschreven voor de bepaling van carvon en limoneen. Met de ontwikkelde methode zijn 26 monsters karwij onderzocht op carvon- en limoneengehalte. In een later stadium zal onderzocht worden of deze monsters gebruikt kunnen worden voor het opstellen van een NIRS-ijklijn voor de bepaling van carvon en limoneen.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Materiaal

Het materiaal dat gebruikt is voor de ontwikkeling van de GC-methode bestond uit 2 monsters karwijzaad, afkomstig van het CPO, welke zijn geselecteerd op een "laag" en "hoog" carvongehalte.

De 26 monsters karwijzaad waarin het carvon- en limoneengehalte werd bepaald, waren ook afkomstig van het CPO. Deze monsters zijn aldaar met NIR voorspeld en geselecteerd op een zo groot mogelijke spreiding in carvongehalten. De monstergegevens zijn verzameld in bijlage 2.

2.2 Methoden

Bij het ontwikkelen van de methode is onderzoek gedaan naar de bereiding van methylesters van de vetzuren in de triglyceriden en de extractie van carvon en limoneen uit het zaad. Als basis voor de bereiding van de methylesters ("methyleren") is NEN 6302 methode 5 genomen waarbij gebruik wordt gemaakt van methanolische KOH. De invloed van het methyleren op de kalibratiefactoren is onderzocht.

Voor de extractie van carvon en limoneen uit karwijzaad is het zaad gemalen in hexaan in een prolabo (kogelschudmolen). Vervolgens is het zaad rechtstreeks geanalyseerd ("direkte" extractie) of geëxtraheerd met hexaan in een soxhletethuls (soxhletextractie). Tevens is onderzocht of tijdens de soxhletextractie verliezen optreden aan carvon en limoneen en/of de extractie van carvon en limoneen volledig is. Carvon en limoneen zijn gaschromatografisch bepaald onder de volgende omstandigheden:

Apparaat : Varian 3700 (uitgerust met autosampler 8000)
Kolom : CP Sil 5 CB, 25 m x 0.22 mm ID, Df 0.11 µm
Oventemp. : 90°C (3 min), gevolgd door een temperatuurprogramma van 15°C/min naar 180°C.
Draaggas : Helium, druk 0.8 bar
Injectie : gesplit 1:100, injectietemp. 280°C
Detector : FID, 280°C

Opmerking: Voor de bepaling van carvon en limoneen is de kolomkeuze van ondergeschikt belang. Er worden ook goede scheidingen verkregen met polaire (CP Sil 88) en medium polaire (CP Wax 57 CB) kolommen.

Het gehalte aan carvon en limoneen wordt bepaald aan de hand van een interne standaard die voor het malen wordt toegevoegd. De interne standaard mag niet veranderen tijdens het methyleren. Daarom is gekozen voor de methylester van een vetzuur nl. methyldecanoaat mede omdat de retentietijd van deze komponent niet veel verschilt van die van carvon en limoneen.

3 ONTWIKKELING METHODE

3.1 Methylesterbereiding

Bij de extractie van carvon en limoneen uit karwijzaad met organische oplosmiddelen zoals hexaan, wordt tevens olie geëxtraheerd die hoofdzakelijk bestaat uit triglyceriden. Injectie van de triglyceriden kan kolomvervuiling veroorzaken waardoor de scheiding en de levensduur van de kolom sterk afneemt. Methylering van de vetzuren die gebonden zijn

in de triglyceriden kan hiervoor een oplossing zijn. Om de invloeden van de methylering op carvon en limoneen te onderzoeken is een standaardoplossing die limoneen, carvon en methyldecanoat bevat (ca 0,2 mg/ml per komponent in hexaan) een aantal keren gemethyleerd en zijn de kalibratiefactoren (KF's) van carvon en limoneen t.o.v. methyldecanoat vergeleken met die van de ongemethyleerde standaard (zie tabel 1).

Tabel 1: KF's van carvon en limoneen t.o.v. methyldecanoat met en zonder methylering.

GEMETHYLEERD			ONGEMETHYLEERD	
	CARVON	LIMONEEN	CARVON	LIMONEEN
	0.8751	0.7119	0.8450	0.8450
	0.8704	0.6840	0.8448	0.7096
	0.8598	0.6766	0.8415	0.7073
	0.8629	0.6832	0.8427	0.7084
	0.8555	0.6724	0.8437	0.7101
	0.8521	0.6730	0.8468	0,7095
	0.8442	0.6678	0.8437	0.7083
	0.8433	0.6705	0.8417	0.7067
	0.8219	0.6622	0.8470	0.7104
	0.8195	0.6614	0.8463	0,7119
			0.8430	0.7079
Gem.Kf	0.8505	0.6736	0.8442	0.7093
SD	0.0187	0.0085	0.0019	0.0017

Uit de resultaten blijkt dat de KF's van carvon en limoneen gevonden met en zonder methylering verschillen. Ook verlopen de KF's na methylering hetgeen vooral voor carvon geldt. Dit kan veroorzaakt worden doordat limoneen, carvon en de IS zich verschillend verdelen over de twee fasen (hexaan- en methanol-laag) of doordat carvon en limoneen niet stabiel zijn in basisch milieu.

Om te onderzoeken of door aanpassing van de experimentele condities constante en met "ongemethyleerd" vergelijkbare KF's te verkrijgen zijn, zijn de volgende methyleringen uitgevoerd met de standaardoplossing:

- a. methyleren met 200 ul KOH/MeOH (normale manier);
- b. methyleren met slechts 50 ul KOH/MeOH;
- c. na methyleren volgens a. met Na-bisulfaat neutraliseren;
- d. na methyleren volgens a. Na-sulfaat toevoegen;
- e. na methyleren volgens a. 200 ul water toevoegen en schudden;
- f. na methyleren volgens a. 1 ml water toevoegen en schudden.

Deze proeven zijn er op gericht om na methyleren het fasenevenwicht te beïnvloeden of de gebruikte loog te neutraliseren.

De ongemethyleerde standaardoplossing is 4 maal aan het begin, een maal tussen de verschillende methyleringen en 4 maal aan het eind geanalyseerd. Ieder experiment bestond uit 6 onafhankelijke monsteropwerkingen en GC-analysen.

De resultaten zijn vermeld in tabel 2.

Tabel 2: Invloed van verschillende methyleringen op de kalibratiefactoren (resultaten van 6 onafhankelijke analyses).

	GEM		MIN		MAX		SD	
	carvon limoneen		carvon limoneen		carvon limoneen		carvon limoneen	
ONGEMETHYLEERD	.8410	.7109	.8374	.7054	.8486	.7184	.0025	.0030
a. GEMETHYLEERD MET 200 UL KOH	.8679	.6932	.8552	.6860	.8752	.6980	.0072	.0043
b. GEMETHYLEERD MET 50 UL KOH	.8308	.6935	.8222	.6832	.8438	.7122	.0101	.0131
c. GENEUTR. MET BISULFAAT	.8582	.6955	.8514	.6829	.8638	.7125	.0048	.0138
d. GENEUTR. MET NA-SULFAAT	.8411	.6711	.8220	.6573	.8717	.7104	.0170	.0198
e. WATER 200 UL	.8476	.7076	.8432	.7049	.8518	.7098	.0032	.0018
f. WATER 1 ML	.8462	.7092	.8436	.7069	.8484	.7109	.0019	.0016

Er van uitgaande dat de ongemethyleerde standaardoplossing de juiste KF's oplevert kan het volgende worden geconcludeerd:

1. methyleren alleen of methyleren gevolgd door neutralisatie met bisulfaat of door toevoeging van Na-sulfaat geeft afwijkende KF's en grotere standaardafwijkingen;
2. het toevoegen van water na de methylering geeft met "ongemethyleerd" vergelijkbare KF's, de SD is zelfs in enkele gevallen kleiner.

Om te onderzoeken of de aanwezigheid van de overige olie, zoals het geval is wanneer met karwijzaad gewerkt wordt, invloed heeft op de KF's is aan de standaardoplossing raapolie toegevoegd zodat de oplossing tien keer zoveel raapolie als carvon en limoneen bevat. Deze oplossing is 6 maal gemethyleerd en na methyleren is 1 ml water toegevoegd. De oplossingen zijn om en om met ongemethyleerde standaardoplossingen (zonder olie) geanalyseerd met de GC. De verkregen KF's staan in tabel 3.

Tabel 3: Kalibratiefactoren van ongemethyleerde standaarden en van gemethyleerde standaarden in aanwezigheid van raapolie.

Ongemethyleerd		gemeth. + olie	
CARVON	LIMONEEN	CARVON	LIMONEEN
0.8408	0.7133	0.8458	0.7053
0.8381	0.7065	0.8487	0.7075
0.8443	0.7123	0.8473	0.7094
0.8412	0.7095	0.8480	0.7068
0.8396	0.7070	0.8459	0.7050
Gem. Kf:	0.8408 0.7097	0.8469	0.7069
Min. :	0.8381 0.7065	0.8458	0.7050
Max. :	0.8443 0.7133	0.8487	0.7094
SD :	0.0023 0.0030	0.0012	0.0016

Uit dit experiment blijkt dat de aanwezigheid van olie geen nadelige invloed heeft op de KF's.

Uit het onderzochte in 3.1 kan geconcludeerd worden dat het methyleren door toevoegen van 200 µl 2N methanolische KOH aan 5 ml hexaanextract (20 sec. schudden) gevolgd door het toevoegen van 1 ml water (krachtig schudden) en centrifugeren geen invloed heeft op de kalibratiefactoren van carvon en limoneen. Het methyleren is in de volgende experimenten dan ook op deze manier uitgevoerd.

3.2 Extractie

3.2.1 Vergelijkend onderzoek "direct" en "soxhlet".

Er is een vergelijkend onderzoek gedaan naar de zg. directe- en de soxhletextractiemethode zoals beschreven in 2.2. Als monstermateriaal is gekozen voor twee monsters nl. "laag" en "hoog" (zie 2.1 Materiaal). In beide monsters is in viervoud gedurende vier dagen het carvon- en limoneengehalte bepaald met beide methoden. De resultaten staan in tabel 4. Het gemiddelde, minimum, maximum en de standaarddeviatie zijn berekend uit de resultaten van de vier dagen.

Tabel 4: Carvon- en limoneengehalten in massaprocenten van twee monsters karwijzaad (laag en hoog) verkregen met directe extractie en met soxhletextractie.

	CARVON Gehalte				LIMONEEN Gehalte				CARVON LIMONEEN		
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4			
direct hoog	2.38	2.32	2.42	2.43	1.63	1.60	1.66	1.66	GEN	2.41	1.66
direct hoog	2.42	2.41	2.44	2.44	1.68	1.68	1.67	1.67	MIN	2.32	1.56
direct hoog	2.46	2.34	2.48	2.46	1.72	1.67	1.70	1.68	MAX	2.48	1.72
direct hoog	2.43	2.43	2.35	2.38	1.69	1.63	1.56	1.66	SD	.045	.039
direct laag	1.32	1.45	1.47	1.38	1.16	1.26	1.25	1.24	GEN	1.37	1.20
direct laag	1.38	1.25	1.38	1.33	1.21	1.12	1.23	1.18	MIN	1.25	1.12
direct laag	1.31	1.36	1.37	1.39	1.15	1.18	1.21	1.19	MAX	1.47	1.26
direct laag	1.42	1.35	1.40	1.30	1.25	1.17	1.24	1.18	SD	.056	.042
soxlet hoog	2.50	2.48	2.43	2.45	1.68	1.63	1.63	1.64	GEN	2.46	1.64
soxlet hoog	2.52	2.42	2.54	2.37	1.67	1.62	1.66	1.61	MIN	2.37	1.59
soxlet hoog	2.48	2.41	2.48	2.48	1.62	1.59	1.64	1.69	MAX	2.54	1.69
soxlet hoog	2.45	2.45	2.47	2.41	1.62	1.64	1.64	1.61	SD	.044	.026
soxlet laag	1.31	1.37	1.32	1.35	1.13	1.12	1.12	1.13	GEN	1.38	1.16
soxlet laag	1.30	1.24	1.46	1.48	1.15	1.01	1.21	1.20	MIN	1.24	1.01
soxlet laag	1.36	1.51	1.38	1.45	1.12	1.23	1.18	1.21	MAX	1.51	1.23
soxlet laag	1.35	1.43	1.40	1.40	1.10	1.23	1.21	1.19	SD	.072	.058

Uit de resultaten blijkt dat er nagenoeg geen verschil is tussen de resultaten verkregen met directe extractie en extractie met soxhlet. Dit betekent dus dat een soxhletextractie na malen met de kogelschudmolen niet nodig is.

3.2.2 Verliezen tijdens de soxhletextractie

Aangezien carvon en limoneen vluchtige etherische oliën zijn is gecontroleerd of tijdens een soxhlet extractie, waarbij enkele uren gekookt wordt, geen verliezen optreden. De standaardoplossing is hiertoe ca 3 uur gekookt in een soxhletopstelling waarna de oplossing 6 maal geanalyseerd is. Ter vergelijking is een ongekookte standaardoplossing 6 maal geanalyseerd. De resultaten staan in tabel 5.

Tabel 5: Kalibratiefactoren van een ongemethyleerde standaardoplossing met en zonder koken.

ongemethyleerd		soxhlet koken	
CARVON	LIMONEEN	CARVON	LIMONEEN
0.8401	0.7120	0.8445	0.7160
0.8395	0.7054	0.8455	0.7184
0.8425	0.7142	0.8382	0.7139
0.8395	0.7090	0.8420	0.7150
0.8486	0.7184	0.8452	0.7162
0.8408	0.7109	0.8462	0.7205
Gem. Kf :	0.8418 0.7116	0.8436	0.7167
Min. :	0.8395 0.7054	0.8382	0.7139
Max. :	0.8486 0.7184	0.8462	0.7205
SD :	0.0035 0.0045	0.0030	0.0024

Uit de resultaten blijkt dat de Kf's na koken nauwelijks afwijken t.o.v. de Kf's van de ongekookte standaardoplossing. Dit betekent dat er tijdens het koken in de soxhlet geen verliezen optreden van carvon en limoneen.

3.2.3 Controle op volledige extractie

Om na te gaan of de extractie van carvon en limoneen volledig is, is materiaal dat met soxhlet geëxtraheerd was, nog een tweede maal gemalen in de kogelschudmolen. Na een tweede soxhletextractie met hexaan of met een mengsel van pentaan/di-ethylether (1:2) wordt voor zowel carvon als voor limoneen nog max. 0,02% gevonden. Een tweede keer malen in de kogelschudmolen of het gebruik van een polairder oplosmiddel is derhalve niet noodzakelijk.

Bij het CPO wordt voor het malen van zaden gebruik gemaakt van een potterapparaat. Het malen van karwijzaad als zodanig in hexaan bleek niet uitvoerbaar omdat het apparaat regelmatig vast loopt. Na ca 15 minuten was nog lang niet die fijnheid bereikt die met de kogelschudmolen verkregen wordt. Wel kon een poeder wat vooraf met de kogelschudmolen was gemalen en met soxhlet was geëxtraheerd d.m.v. potteren nog fijner worden gemalen in hexaan. In het extract werd 0,03% carvon en geen limoneen aangetoond.

3.3 Standaardadditie

Aan de monsters "laag" en "hoog" (zie 2.1 Materiaal) is voor het malen op twee niveaus (0,7 en 1,4%) carvon en limoneen toegevoegd. De monsters zonder en met toevoeging zijn in duplo onderzocht conform de ontwikkelde methode, dus via "directe kogelschudmolen extractie" en toevoeging van 1 ml water na methyleren. In tabel 6 zijn de verkregen resultaten verzameld, de twee toevoegingsniveaus worden aangegeven met resp. + en ++.

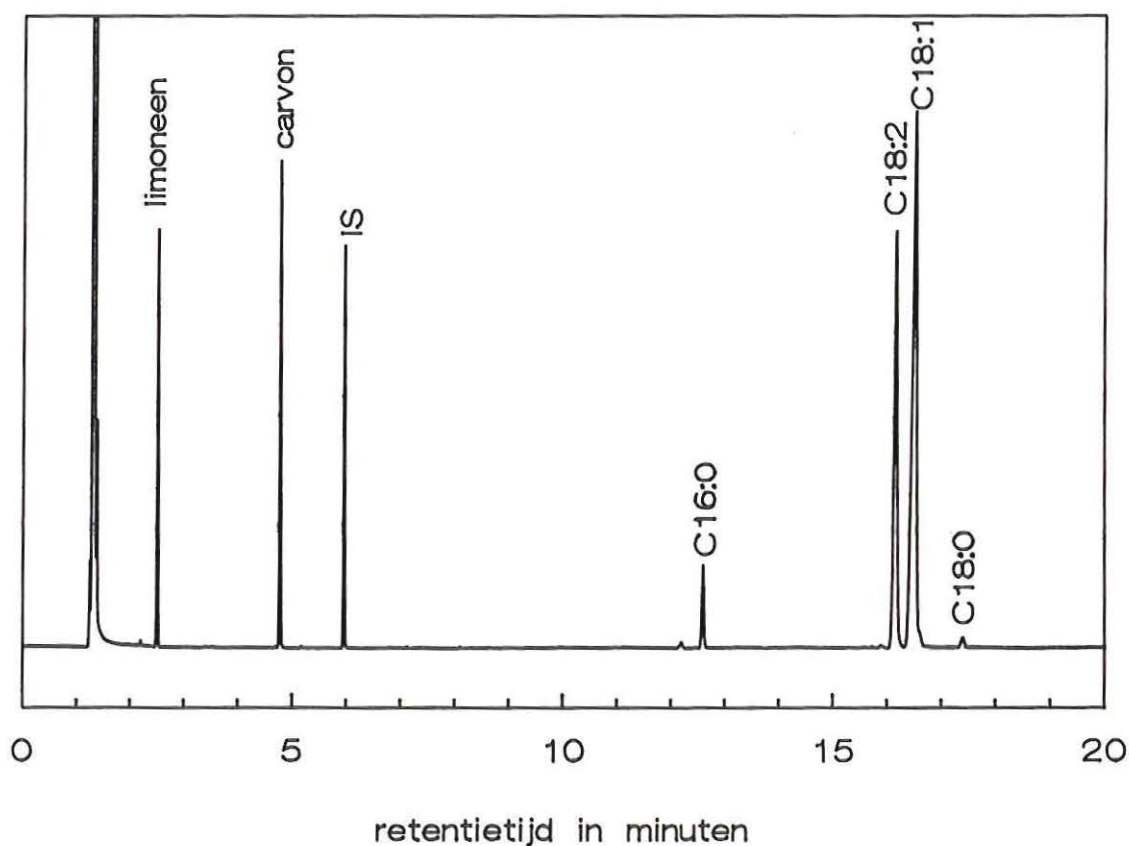
Tabel 6: Recovery van carvon en limoneen toegevoegd aan het monster "hoog" en "laag".

	CARVON %	LIMONEEN %	Recovery (%)	
			CARVON	LIMONEEN
=====	=====	=====	=====	=====
HOOG	2.43	1.66		
HOOG	2.41	1.69		
HOOG +	3.10	2.38	98.2	101.6
HOOG +	3.14	2.37	103.9	100.3
HOOG ++	3.88	3.10	105.1	102.4
HOOG ++	3.76	2.95	96.4	92.0
LAAG	1.44	1.22		
LAAG	1.35	1.21		
LAAG +	2.04	1.91	94.1	100.2
LAAG +	2.08	1.95	100.0	106.2
LAAG ++	2.77	2.62	99.7	101.0
LAAG ++	2.80	2.63	101.6	101.8
			-----	-----
			99.9	100.7

De gemiddelde terugvindingspercentages van carvon en limoneen bedragen resp. 100,7 en 99,9%. Dit bewijst dat tijdens de analyse geen verliezen optreden.

3.4 Herhaalbaarheid

Het onderzoek beschreven in 3.1 heeft geleid tot een intern voorschrift (zie bijlage 1). De 26 monsters karwijzaad zijn volgens dit voorschrift op carvon- en limoneengehalte onderzocht. De duplo's zijn onafhankelijk van elkaar op verschillende dagen en met verschillende hoeveelheden interne standaard onderzocht. De resultaten zijn verzameld in tabel 7. Een chromatogram van een van de monsters is opgenomen in figuur 1.



Figuur 1: Chromatogram van de carvon- en limoneebepaling in karwij.
Gaschromatografische condities: zie Materiaal en Methoden.

Tabel 7: Gevonden carvon- en limoneegehalten van 26 monsters karwij zaad in massaprocenten.

RIKILT nr	CPO nr	CARVON		LIMONEEN		Gemiddelde %	
		A Geh. %	B Geh. %	A Geh. %	B Geh. %	Carvon	Limoneen
52731	1	2.30	2.39	1.61	1.67	2.34	1.64
52732	2	1.56	1.57	1.48	1.49	1.57	1.49
52733	3	2.41	2.34	2.14	2.06	2.37	2.10
52734	4	1.74	1.74	1.18	1.17	1.74	1.17
52735	5	2.34	2.34	2.35	2.32	2.34	2.33
52736	6	2.09	1.99	1.93	1.87	2.04	1.90
52737	7	2.28	2.21	2.48	2.45	2.24	2.47
52738	8	2.16	2.15	1.81	1.85	2.16	1.83
52739	9	1.34	1.33	1.14	1.15	1.33	1.14
52740	10	2.77	2.92	1.96	2.03	2.85	2.00
52741	11	2.80	2.91	1.90	1.99	2.86	1.95
52742	12	2.32	2.28	1.92	1.88	2.30	1.90
52743	13	2.30	2.30	2.10	2.18	2.30	2.14
52744	14	1.11	1.16	.96	1.02	1.13	.99
52745	15	1.69	1.75	1.56	1.51	1.72	1.54
52746	16	1.44	1.44	1.37	1.40	1.44	1.39
52747	17	1.89	1.88	1.68	1.59	1.88	1.64
52748	18	1.41	1.39	1.38	1.45	1.40	1.41
52749	19	1.42	1.38	1.38	1.35	1.40	1.36
52750	20	1.51	1.47	1.39	1.33	1.49	1.36
52751	21	1.72	1.68	1.52	1.51	1.70	1.51
52752	22	2.34	2.29	2.05	1.97	2.31	2.01
52753	23	1.98	2.07	1.80	1.85	2.02	1.83
52754	24	2.90	2.81	2.41	2.41	2.85	2.41
52755	25	3.25	3.24	2.41	2.37	3.24	2.39
52756	26	2.46	2.50	2.43	2.46	2.48	2.45

Het carvongehalte in de 26 monsters karwij varieert van 1,13% tot 3,24%, het limoneen gehalte varieert van 0,99% tot 2,47%,. Uit de duploverschillen kan de standaarddeviatie van de bepaling uitgerekend worden. Deze bedraagt voor carvon en limoneen 0,04% hetgeen neerkomt op een herhaalbaarheid van 0,1%.

4 CONCLUSIE

Carvon en limoneen kunnen kwantitatief bepaald worden in karwijzaad. Het zaad wordt hiertoe in hexaan gemalen na toevoeging van de interne standaard methyldecanoaat in een kogelschudmolen. Vervolgens wordt een gedeelte van het extract gemethyleerd door toevoeging van methanolische kaliumhydroxide. Na het methyleren wordt water toegevoegd om carvon en limoneen volledig in de hexaanlaag te brengen. Een gedeelte van de hexaanlaag wordt geïnjecteerd in een gaschromatografische kolom waarna het gehalte aan carvon en limoneen berekend kan worden. De herhaalbaarheid van de methode is 0,1% voor zowel carvon als limoneen. Soxhletextractie na malen in de kogelschudmolen leidt niet tot hogere gehalten voor carvon en limoneen en is derhalve niet noodzakelijk. Ook is er in het gemalen en met soxhlet geextraheerde zaad na een tweede keer malen in de kogelschudmolen of d.m.v. potteren nagenoeg geen carvon en limoneen aangetoond.

Carvon en limoneen dat wordt toegevoegd aan het begin van de bepaling wordt volledig teruggevonden. Dit duidt erop dat er geen verliezen optreden van carvon en limoneen tijdens de analyse.

Met de ontwikkelde methode zijn 26 geselecteerde monsters karwijzaad van verschillende herkomst, ras en oogstjaar onderzocht. Het carvongehalte van deze monsters ligt tussen 1,13 en 3,24% terwijl het limoneengehalte ligt tussen 0,99 en 2,27%.

LITERATUUR

Betts T.J.

Carvone in the developing fruit of *Anethum graveolens* L. and *Carum carvi* L.

J. Pharm. Pharmacol. 17, 1982, Suppl., 41S-43S.

Koedam A., Scheffer J.C., Svendsen A.B.

Comparison of Isolation Procedures for Essential Oils. II Ajowan, Caraway, Coriander and Cumin.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 168, 1979, 106-111.

NEN 6302, 1980: Onderzoeksmethoden voor plantaardige en dierlijke oliën en vetten. Bereiding van methylesters van vetzuren voor gaschromatografie en infraroodspectrofotometrie. Nederlands Normalisatie-instituut Delft.

Schantz M. v., Ek B.S.

Über die Bildung van ätherischen Öl in Kümmel, *Carum carvi* L.

Sci. Pharm., 39, 1971, 82-101.

Werkvoorschrift voor de bepaling van carvon en limoneen in karwijzaad.

OLIEZADEN - BEPALING VAN HET CARVON- EN LIMONEENGEGHALTE IN KARWIJZAAD
- GASCHROMATOGRAPHISCH

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Deze methode beschrijft de bepaling van carvon en limoneen in karwijzaad. De methode is bruikbaar voor het bepalen van gehalten vanaf 0,2 %.

1.2 Bepaalbaarheidsgrens

Vanaf 0,2 %.

2 Definitie

n.v.t.

3 Beginsel

Het zaad wordt geëxtraheerd met hexaan in een kogelschudmolen (Prolabo). Na bereiding van de methylesters van de vetzuren in de triglyceriden worden het carvon en limoneen gaschromatografisch gemeten. De gehalten worden berekend aan de hand van een interne standaard.

4 Precisie

4.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon, dient niet groter te zijn dan 0,1 % voor zowel limoneen als carvon.

4.2 Reproduceerbaarheid

Niet bekend

5 Reagentia en hulpstoffen

Alle reagentia dienen van p.a. kwaliteit te zijn, tenzij anders vermeld.

5.1 Hexaan

5.2 Interne Standaard (IS): Methyldecanoat

5.2.1 Interne standaardoplossing in hexaan (5.1) 4mg/ml.

5.3 (+)-Carvon

5.4 (+)-Limonen

5.5 Standaardoplossing: Weeg af 80.0 mg interne standaard (5.2), 80.0 mg carvon (5.3) en 80.0 mg limonen (5.4) in een maatkolf van 100 ml. Los op in hexaan en vul aan.

5.6 2N KOH in methanol (methyleringsreagens)

6 Apparatuur

6.1 Prolabo of gelijkwaardige kogelschudmachine.

6.1.1 Hulzen met kogels behorend bij de kogelschudmachine (6.1).

6.2 Gaschromatograaf (bv. Varian 3700) met vlamionisatiedetector.

6.3 Glazen buisjes van ca. 15 ml met ingeslepen stop

6.4 Integratie : PC met software voor chromatografie (bv Nelson model 2600 chromatography software).

7 Werkwijze

7.1 Extractie.

Weeg 1,000 g van het monster in een prolabohuls. Pipetteer 5 ml van de interne standaardoplossing (5.2.1) in de huls. Vul aan met hexaan tot 25 ml en schud 15 min.

7.2 Bereiding van de methylesters

Pipetteer 5 ml van de bovenstaande hexaan uit de prolabohuls in een buisje (6.3). Voeg toe 0,2 ml methyleringsreagens (5.6). Schud 20 seconden intensief en voeg 1 ml water toe. Schud opnieuw 20 sec en centrifugeer het buisje 2 min bij ca 2000 rpm of wacht tot de hexaanlaag helder is. Gebruik de hexaanlaag voor de gaschromatografische analyse.

7.3 Gaschromatografie

Gaschromatografische omstandigheden:

Kolom : CP Sil 5 CB, 25 m x 0.22 mm ID, Df 0.11 μ m

Oventemp. : 3 min 90°C, met 15°C/min naar 180°C

Draaggas : Helium, druk 0.8 bar

Injectie : gesplit 1:100, injectietemp. 280°C

Detector : FID, 280°C

Injecteer zowel de standaardoplossing (5.5). als de hexaanlaag (7.2) in de gaschromatograaf.

8 Standaardisatie

Bereken uit de gaschromatografische analyse van de standaardoplossing (5.5) de kalibratiefactoren t.o.v. de interne standaard:

$$Kf_i = b_i/b_{IS} * C_{IS}/C_i$$

waarin:

Kf_i = Kalibratiefactor komponent i;

b_i = aantal mg komponent i in het standaardmengsel;

b_{IS} = aantal mg interne standaard in het standaardmengsel;

C_{IS} = piekoppervlak interne standaard;

C_i = piekoppervlak komponent i;

i = carvon of limoneen.

Berekening van het gehalte aan carvon en/of limoneen in
massaprocenten:

$$X_i = A_i/A_{IS} * Kf_i * W_{IS}/W * 100$$

waarin:

X_i = Gehalte komponent i in massaprocenten;

A_i = piekoppervlak komponent i;

A_{IS} = piekoppervlak interne standaard;

Kf_i = kalibratiefactor komponent i;

W_{IS} = hoeveelheid toegevoegde IS in mg;

W = afgewogen hoeveelheid monster in mg;

i = carvon of limoneen.

Gegevens monsters karwijzaad CPO

volgnr.	Rikilt nr.	soort	carvon % (vlg. CPO)
CPO			
1	52731	Bleija	2.57
2	52732	Mansholt's Karwij	2.20
3	52733	Volhouden (Gr)	2.01
4	52734	Silvia (Gr)	1.87
5	52735	Estland (Gr)	2.15
6	52736	Polen I (Gr)	1.75
7	52737	Polen II (Gr)	1.85
8	52738	Polen III (Gr)	1.56
9	52739	Eénjarig mengsel CPO	1.33
10	52740	4x CPO '89	2.45
11	52741	4x CPO '88	2.36
12	52742	F3 zaad '89 (zg tweejarig)	2.16
13	52743	F3 zaad '89 (zg éénjarig)	1.95
14	52744	Deens éénjarig, Randwijk '89	1.03
15	52745	Deens éénjarig, O.Fl. '89	1.69
16	52746	Pools éénjarig, Randwijk '89	1.72
17	52747	Pools éénjarig, O.Fl. '89	1.87
18	52748	Egyptisch éénjarig, Randwijk '89	1.48
19	52749	Egyptisch éénjarig, O.Fl. '89	1.54
20	52750	Hongaars éénjarig, Randwijk '89	1.09
21	52751	Hongaars éénjarig, O.Fl. '89	1.79
22	52752	Oldambter Oogst 1987	2.19
23	52753	Oldambter '89 E.O. laag	1.84
24	52754	Oldambter '89 E.O. hoog	2.61
25	52755	Oldambter '89 E.O. hoog	2.82
26	52756	Oldambter '89 E.O. hoog	3.00