

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. VV 9

1e oplage (1983-08-18)

Eiprodukten: bepaling van het β -hydroxyboterzuurgehalte

1. Toepassingsgebied

De methode is toepasbaar op eieren, vloeibaar ei product en ei poeder met een onderste detectiegrens van 1 mg/kg.

2. Beginsel

De eiwitten van het monster ei (product) worden met behulp van perchloorzuur neergeslagen. Het β -hydroxyboterzuur (β -HBZ) in het supernatant wordt met behulp van het enzym β -hydroxyboterzuurdehydrogenase, NAD^+ en hydrazinehydraat geoxideerd tot acetoacetaat.

Hydrazinehydraat laat de reactie naar rechts verlopen:



De hoeveelheid β -HBZ wordt berekend aan de hand van de gemeten hoeveelheid NADH bij 340 nm. De methode wordt getoetst met behulp van een standaardoplossing β -HBZ.

3. Reagentia

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Gebruik dubbel gedestilleerd water.

3.1 Perchloorzuur 30%

Voeg geconcentreerd perchloorzuur (60%) aan een gelijke hoeveelheid water toe.

3.2 Kaliumhydroxide-oplossing 30% (m/v).

3.3 Kaliumhydroxide-oplossing 3% (m/v).

3.4 Zoutzuur, 1M

Verdun één deel geconcentreerd zoutzuur $d_{20} = 1,16$, met negen delen water.

3.5 Zoutzuur, 0,2M

Verdun één deel zoutzuur (3.4) met vier delen water.

3.6 Tris(hydroxymethyl) methylamine, 0,2M

Weeg 24,23 g af en los op in 1 liter water.

3.7 Tris HCl buffer, 0,05M

Meng 50 ml Tris (hydroxymethyl) methylamine met 16,5 ml 0,2M HCl (3.5), breng over in een maatkolf van 200 ml, vul aan met water en meng. Breng de pH op 8.4 met KOH oplossingen (3.2 en 3.3).

Bewaar bij 4°C, maximaal 1 maand houdbaar.

3.8 Hydrazinehydraatoplossing 0,2mM

Meng 5 ml hydrazinehydraat met 25 ml 1M HCL (3.4), breng over in een maatkolf van 50 ml, vul aan met water en meng. Breng de pH op 8.4 met KOH oplossingen (3.2 en 3.3).

Bewaar bij 4°C, maximaal 1 maand houdbaar.

3.9 NAD⁺ oplossing, 10mM

Los 0,3317 g NAD⁺ op in water, breng over in een maatkolf van 50 ml, vul aan met water en meng.

Bewaar bij 4°C, maximaal 1 maand houdbaar.

3.10 D-β-hydroxyboterzuurdehydrogenase

Sigma H-4005, Type III.

3.11 Natriumzout van β-hydroxyboterzuur

Sigma art.nr. H6501 (98%-zuiver).

3.11.1 Standaardoplossing van β-hydroxyboterzuur

Weeg af tot op 1 mg nauwkeurig 0,61 g (3.11) welke overeenkomt met 0,5 g β-hydroxyboterzuur (β-HBZ).

Los op in water en breng over in een maatkolf van 100 ml vul aan met water en meng. Concentratie β-HBZ is 5 g/l.

3.12 Schilfer- of gruijzelijs.

4. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

4.1 Analytische balans, tot op 1 mg nauwkeurig.

4.2 Bovenweger, tot op 0,01 g nauwkeurig.

4.3 Spectrofotometer, geschikt voor het meten bij een golflengte van 340 nm, met bijbehorende plasticcuvetten van 1 cm weglengte en een cuvetverwarmingssysteem geschikt voor het meten bij 30°C.

4.4 Centrifuge, 10.000 toeren/min.

4.5 Centrifugebuizen, Dupont, Sorvall Type 03143.

4.6 pH-meter, afleesbaar op 2 decimalen en geijkt bij 40 à 45°C.

4.7 Vouwfilters, Schleicher en Schüll 595 1/2 ϕ 150 mm art.nr. 311645.

4.8 Konische kolf van 250 ml.

4.9 Bekerglazen van 50 en 150 ml.

4.10 Trechters ϕ 10 cm.

4.11 Volpipetten van 10 en 25 ml.

4.12 Verdeelpipetten van 5 en 10 ml.

4.13 Micropipetten van 10, 200 en 500 μ l.

4.14 Maatkolven van 50, 100 en 200 ml.

4.15 ULTRA-TURRAX T 18/10 met hulpstuk 18N en toerenregelaar TR50.

4.16 Plastic roerstaafjes.

4.17 Plastic bekglas (2 l).

5. Werkwijze

5.1 Eipoeder

Weeg 10 g gehomogeniseerd monster, tot op 0,01 g nauwkeurig, af in een centrifugebuis (4.5), voeg 30 ml water toe en homogeniseer met behulp van een ULTRA-TURRAX (4.15). Voeg 25 ml perchloorzuur (3.1) toe, meng met behulp van een ULTRA-TURRAX en handel verder zoals beschreven bij 5.4. (Voorkom klontvorming!)

5.2 Vloeibare eimonsters

Weeg 40 g gehomogeniseerd monster, tot op 0,01 g nauwkeurig, af in een centrifugebuis (4.5), voeg 25 ml perchloorzuur (3.1) toe, meng met behulp van een ULTRA-TURRAX en handel verder zoals beschreven bij 5.4.

5.3 Standaard β -HBZ

Neem bij elke serie monsters een standaard van β -HBZ mee. Verdun hiervoor de standaardoplossing (3.11.1) door 1,0 ml te pipetteren in een maatkolf van 100 ml en deze met water aan te vullen.

Breng 40 ml van deze verdunde standaardoplossing (50 mg/l) over in een centrifugebuis, voeg 25 ml perchloorzuur (3.1) toe, meng en handel verder zoals beschreven bij 5.4.

5.4 Centrifugeer gedurende 15 minuten bij 10.000 toeren/min en filtreer de bovenstaande vloeistof door een vouwfilter (4.7). Breng 30 ml filtraat over in een bekersglas van 150 ml en breng met behulp van KOH-oplossingen (3.2 en 3.3) de pH op 8.4 met een pH-meter geijkt bij 40-45°C (4.6). Breng, met behulp van water, kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, koel af tot kamertemperatuur, vul aan en meng. Plaats de kolfjes gedurende 15 min in een met ijs (3.12) en water-mengsel gevuld vat (4.17). Breng de inhoud over in een centrifugebuis (4.5) en centrifugeer gedurende 10 minuten bij 10.000 toeren/min.

5.5 Pipetteer 2,0 ml monsteroplossing in een cuvet en voeg toe 0,5 ml Tris HCl buffer (3.7), 0,5 ml hydrazinehydraatoplossing (3.8), 0,4 ml NAD⁺ oplossing (3.9) en 10 μ l enzymsuspensie (3.10). Meng met behulp van een plastic roerstaafje (4.16) en meet de absorptie van het monster met enzym, t.o.v. het monster zonder toevoeging van het enzym, met behulp van een spectrofotometer (4.3) bij 340 nm en bij een temperatuur van 30°C.

Meet de absorptie met tussenpozen van 10 minuten tot een constante absorptiewaarde is verkregen. De absorptie wordt constant beschouwd indien deze niet meer dan 0,0010 extinctie eenheid/min verandert. Veelal is de absorptie na ca. 60 minuten constant. Controleer tussentijds op gasvorming in de cuvet en verwijder deze zonodig door roeren met behulp van een plastic roerstaafje.

6. Berekening

6.1 Bereken het β -HBZ gehalte in eimonsters, uitgedrukt in mg/kg, met behulp van de formule:

$$\frac{A \times V_1 \times M \times V_2 \times V_3}{E \times V_4 \times G \times V_5} = \text{mg/kg}$$

waarin:

- A = de gemeten absorptie, bij 5.5
- V_1 = totaalvolume vloeistof in de cuvet (3,4 ml)
- M = molecuulgewicht β -HBZ (104.1)
- V_2 = volumemonster + water + perchloorzuur (65 ml)
- V_3 = volume maatkolf (100 ml)
- E = molaire extinctiecoëfficiënt van NADH ($6,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- V_4 = ml monsterextract in de cuvet gebracht (2 ml)
- G = ingewogen monster in grammen (eipoeder 10 g en vloeibaar ei 40 g)
- V_5 = aantal ml geneutraliseerd monster (25 ml)

6.2 Bereken de recovery, van de in (5.3) in bewerking genomen standaardoplossing, uitgedrukt in % met behulp van de formule:

$$\frac{A \times V_1 \times M \times V_2 \times V_3}{E \times V_4 \times V_5 \times C} \times 100\% = \%$$

waarin:

- C = de concentratie van D- β -hydroxyboterzuur in de verdunde standaardoplossing bereid in 5.3, en uitgedrukt in mg/l (zie 6.2.1).

6.2.1 Berekening van de concentratie (C) van D- β -hydroxyboterzuur in de verdunde standaardoplossing met behulp van de formule:

$$\frac{G \times M_1 \times Z \times 1000}{M_2 \times V \times 2 \times f \times 100} = C \text{ (mg/l)}$$

waarin:

G = afgewogen natriumzout van β -HBZ (mg)

M_1 = molecuulgewicht β -HBZ (104.1)

M_2 = molecuulgewicht van het natriumzout van β -HBZ (126.1)

V = volume standaardoplossing, zoals beschreven in 3.10.1 (100 ml)

Z = zuiverheid van de standaard, zoals opgegeven door de leverancier (98%)

f = verdunningsfactor (100)

Het enzym β -HBZ dehydrogenase reageert alleen met het D-isomeer van β -HBZ. De standaardoplossing bevat, in gelijke verhouding, de D en L isomeren van β -HBZ.

7. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen twee bepalingen, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd door dezelfde analist (met gebruikmaking van dezelfde reagentia, toestellen, glaswerk en hulpmiddelen) dient niet groter te zijn dan 10%.

Literatuur:

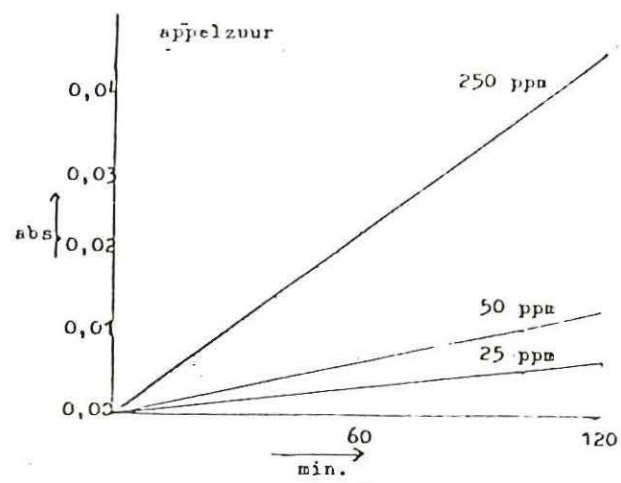
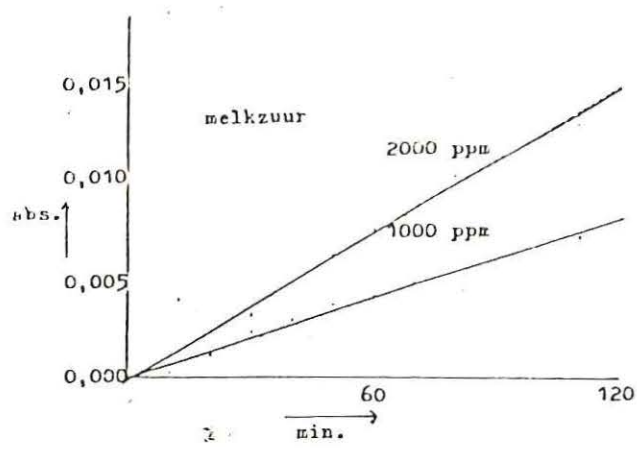
Parry A.E.J., Robinson D.S., Wedzicha B.L.,
J. Sci. Fd. Agric. 1980, 31, 905-910.

Verantwoordelijk: drs H.L. Elenbaas

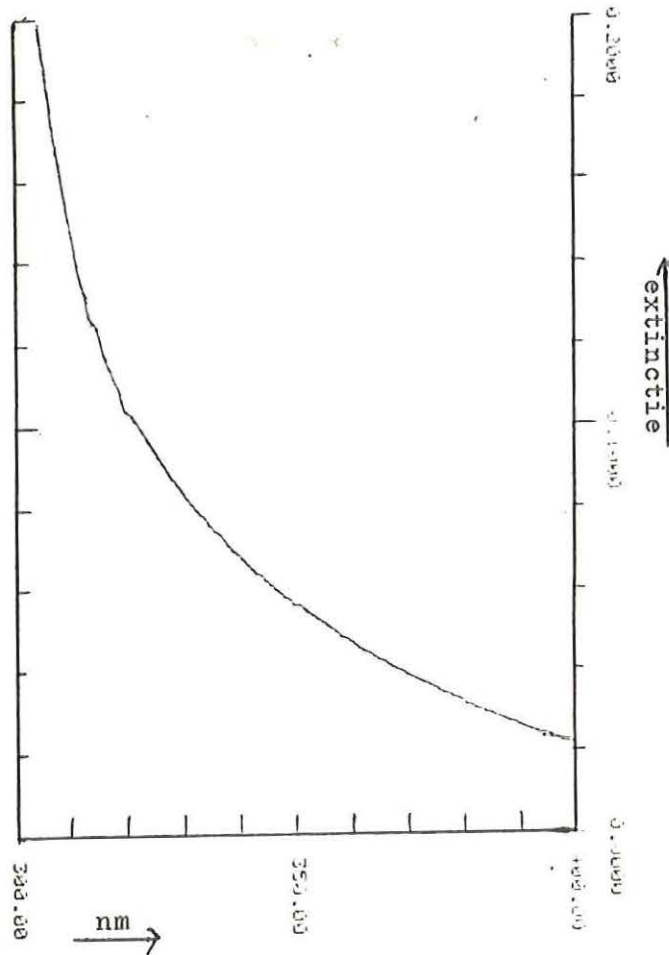
Samenstellers : P. Stouten en W. Haasnoot

*Regime
lijp in veldag.*

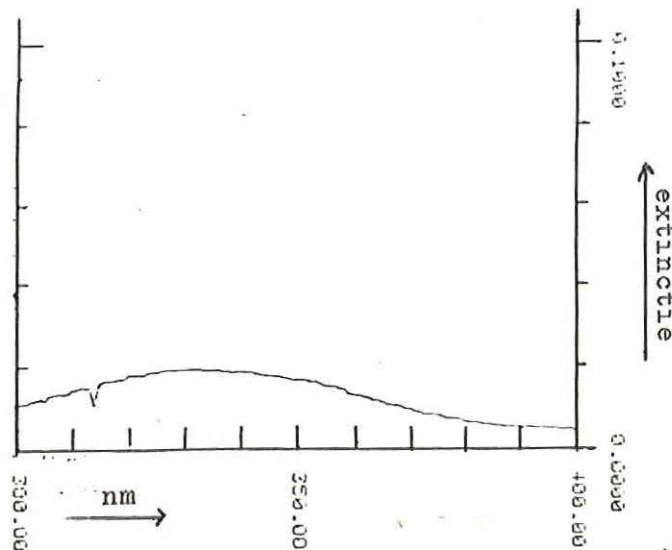
Figuur 1. Gemeten absorptie uitgezet tegen de reaktietijd van standaardoplossingen van melkzuur en appelzuur na enzymatische reactie met β -hydroxyboterzuurdehydrogenase.



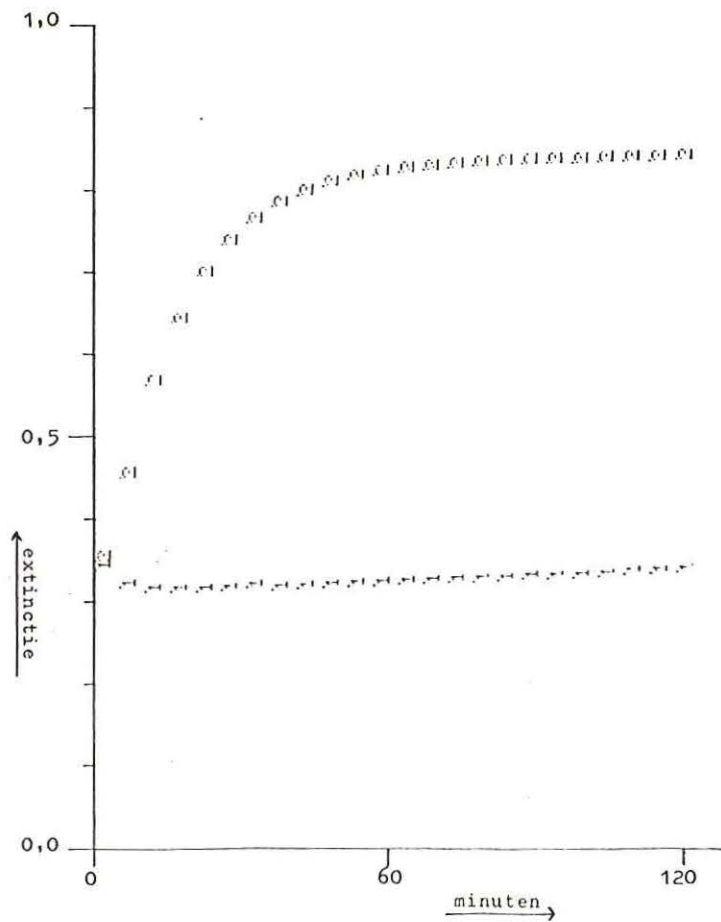
Figuur 2. Absorptiespectrum van een eiextract, na toevoegen van alle reagentia behalve het enzym, gemeten tegen een blanco chemicaliën.



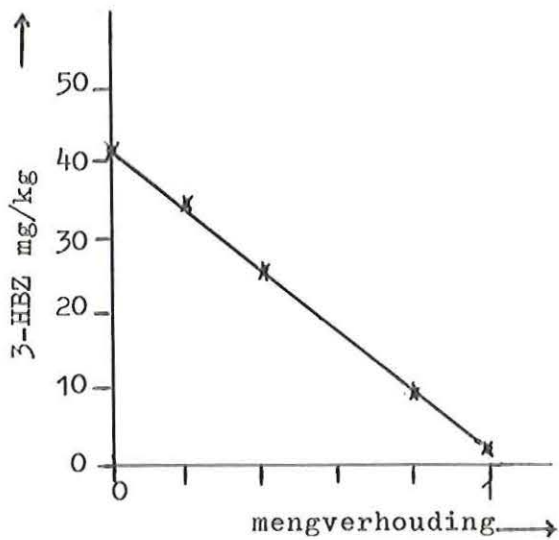
Figuur 3. Absorptiespectrum van een eiextract met enzym gemeten tegen hetzelfde eiextract zonder enzym.



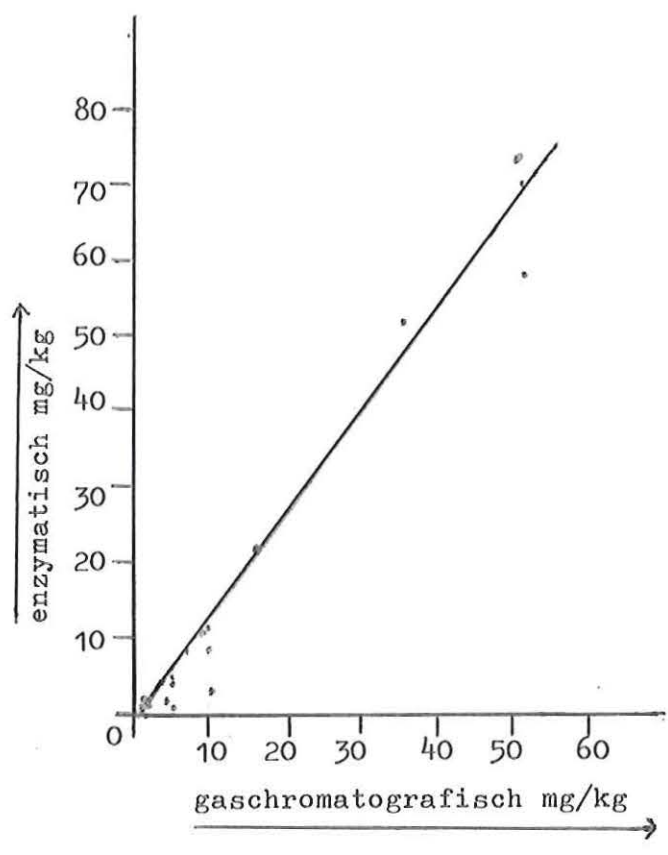
Figuur 4. De gemeten absorptie van een eiextract, zonder en met enzym, uitgezet tegen de tijd.



Figuur 5. β -HBZ gehalte uitgezet tegen de mengverhouding van twee eimonsters met verschillende β -HBZ gehalten

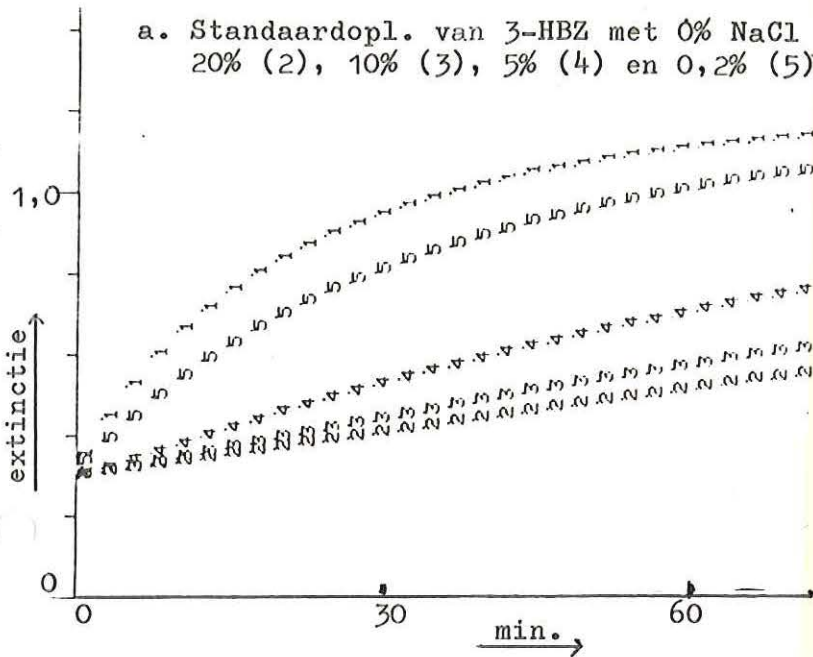


Figuur 6. Vergelijking gaschromatografische- en enzymatische resultaten.

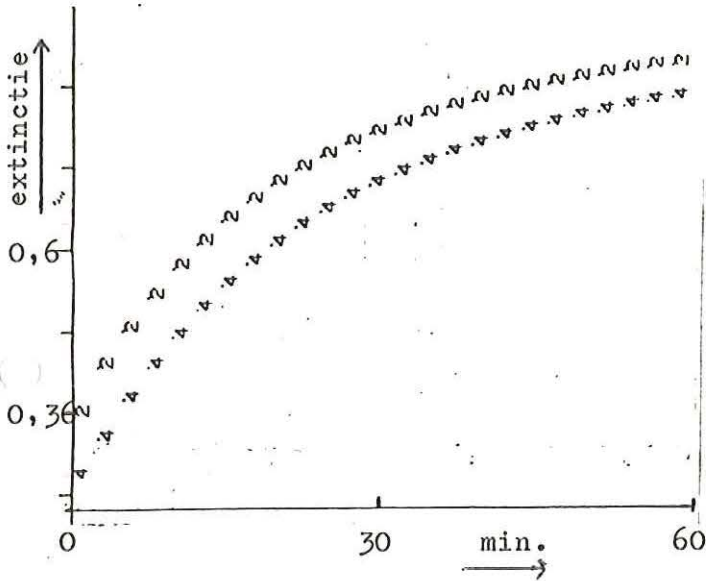


Figuur 7. Invloed van zout op de enzymatische reaktie.

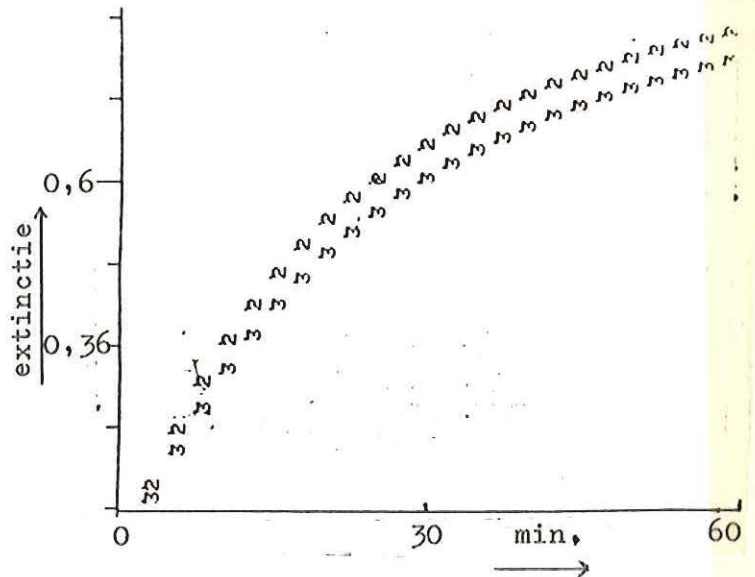
a. Standaardopl. van 3-HBZ met 0% NaCl (1), 20% (2), 10% (3), 5% (4) en 0,2% (5).



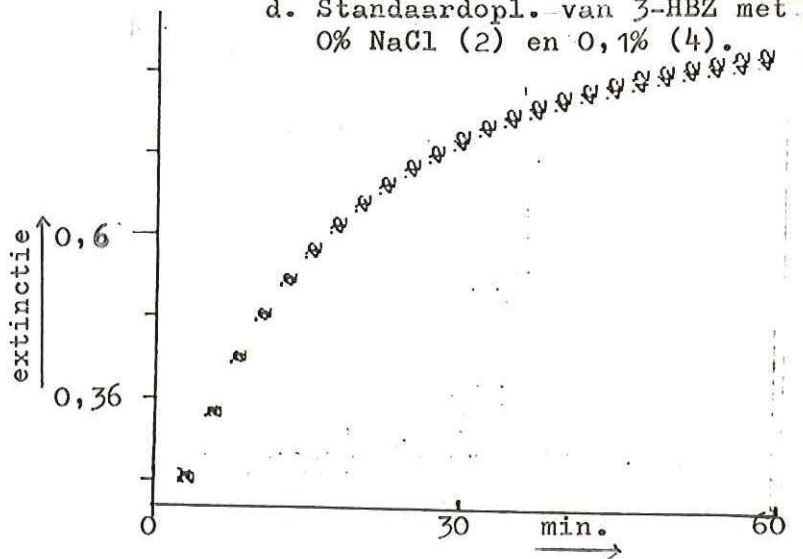
b. Standaardopl. van 3-HBZ met 0% NaCl (2) en 1% (4).



c. Standaardopl. van 3-HBZ met 0% NaCl (2) en 0,5% (3).



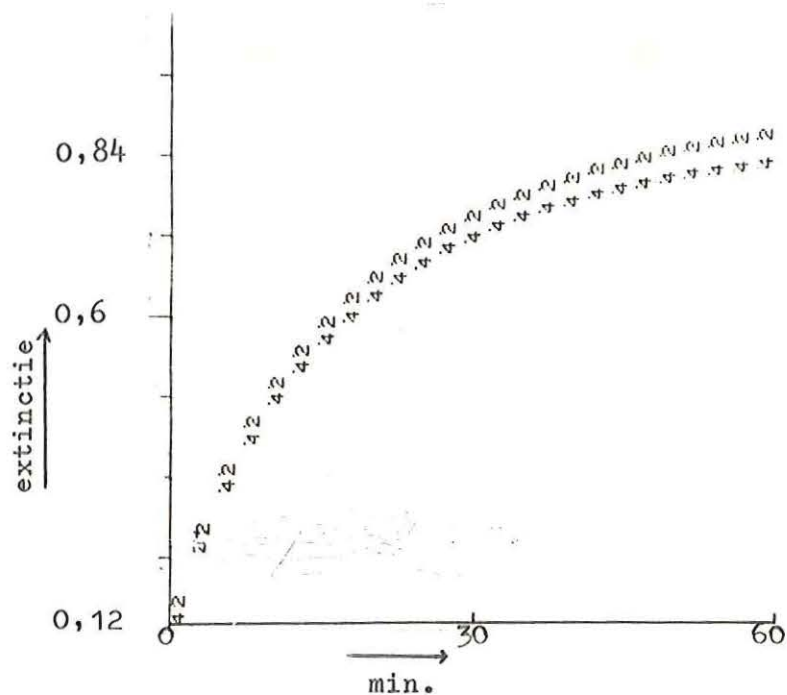
d. Standaardopl. van 3-HBZ met 0% NaCl (2) en 0,1% (4).



Figuur 8. Invloed van suiker op de enzymatische reactie

2 = standaardoplossing van β -HBZ met 0% suiker

4 = standaardoplossing van β -HBZ met 10% suiker



Figuur 9. Invloed van alcohol op de enzymatische reactie

1 = standaardoplossing van β -HBZ met 0% alcohol

2 = standaardoplossing van β -HBZ met 2,3% alcohol

