

Afdeling Koolhydraat Vetchemie

RAPPORT 84.13

Datum: 1984-02-10

Pr.nr. 505.9020

Onderwerp: Onderzoek van (gas)chromatografische analysemogelijkheden voor de bepaling van 3-hydroxyboterzuur in eieren en eiprodukten.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, Elenbaas, Haasnoot, afdeling Koolhydraat- en Vetchemie (5x), afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer, projekteider, ir Th.G. Uyttenboogaart, ir A.T.G. Steverink (5 x IPS), ir A. Mijs (Produktschap voor Pluimvee en Eieren), S. van Wijk (VD), drs K. Büchli (Min. WVC).

Afdeling Koolhydraat Vetschemie.

Datum: 1984-02-10

RAPPORT 84.13

Pr.nr. 505.9020

Project: Ontwikkeling van methoden voor het aantonen en bepalen van schouweieren in eiprodukten.

Onderwerp: Onderzoek van (gas)chromatografische analysemogelijkheden voor de bepaling van 3-hydroxyboterzuur in eieren en ei-
produkten.

Voorgaand rapport: 84.7

Doel:

Ontwikkeling van een gaschromatografische methode voor de bepaling van 3-hydroxyboterzuur (3-HBZ) in eieren en eiprodukten.

Deze methode is bedoeld als referentiemethode.

Samenvatting:

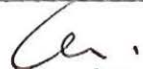
Een capillair gaschromatografische methode werd ontwikkeld op basis van een Duitse methode van Littman, Schulte en Acker. De methode omvat een clean-up van het onteiwitte waterige extrakt, kolom elutie met ethylacetaat, derivatisering van het droge extrakt en gaschromatografische scheiding van de componenten. Daarnaast werden twee methoden ontwikkeld met een snellere kolom clean-up en methyleren of silyleren van de componenten.

Ook werd een HPLC scheiding van de componenten beproefd.

Conclusie:

De detectiegrens die met GCC haalbaar bleek was ca. 5 µg/kg. Dit is ver beneden de in de praktijk voorkomende gehalten van meer dan 1 mg/kg. Voor het 1-10 mg/kg bereik werden standaarddeviatie gevonden van 0,1-0,4 mg/kg (n=40). De basismethode is geschikt voor routinematige analyse van ca. 20 monsters per dag. Bij enkele halffabrikanten werden geen storingen gevonden. Varianten op de methode maken de werkwijze eleganter en minder bewerkelijk. Ook met HPLC liggen er analysemogelijkheden vanaf 0,5 mg/kg.

Bij een recente oriënterende vergelijking met een enzymatische analyse bleek een redelijke overeenstemming te bestaan voor gehalten boven 3 mg/kg.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse 

Medewerkers/samenstellers: B. Rutjes, drs B.G. Muuse 

Projectleider: W. Haasnoot

<u>Inhoud</u>	<u>blz.</u>
1. Inleiding.	1
2. Materiaal, apparatuur en hulpmiddelen.	2
3. Onderzoek opzet voor de indeling zie sub 4.	3
4. Resultaten en discussie.	4
4.1 Algemeen.	4
4.2 FID respons verhoudingen.	5
4.3 Extraktie met Extrelut kolommen.	6
4.4 Reproduceerbaarheid van de gaschromatografie.	6
4.5 Alternatieven voor indampen van de ethylacetaat voor de derivatisering met HPLC	6
4.6 Identificatie van de componenten.	7
4.7 Lineariteit van de methode. Recovery van interne standaard en 3-HBZ.	7
4.8 Vergelijking met enzymatische analyse.	8
4.9 Eiprodukten.	9
5. Conclusies.	9
6. Literatuur.	10
Tabellen 1 t/m 6.	
Chromatogrammen 1 t/m 7.	
Grafieken 1 t/m 7.	
Bijlagen I t/m V.	

1. Inleiding

Meer en meer worden analysetechnieken verbeterd en ontwikkeld ter vaststelling van de kwaliteit van levensmiddelen. Met name is dit het geval bij bederfelijke waar en samengestelde produkten daarvan.

Voor produkten die hoofdzakelijk bestaan uit eieren is de handel, producent en consument geïnteresseerd in de kwaliteit van de gebruikte eigrondstof en met name of eieren van technische kwaliteit in levensmiddelen terecht komen.

In broederijen worden eieren geschouwd na 6 dagen en na 18 dagen en daarbij gecontroleerd op goede ontwikkeling van de vrucht. De controle na 6 dagen vindt echter in de praktijk weinig plaats. De niet bevruchte heldere eieren die niet langer bebroed zijn dan 6 dagen mogen worden aangeduid als klasse C eieren (geel etiket). Eieren met mindere kwaliteit dan klasse C mogen alleen voor non-food doeleinden zoals cosmetica e.d. worden gebruikt.

Wettelijke regelingen hiervoor werden vastgesteld in art. 6, Vo (EEG) 2772/75 en opgenomen in de nederlandse wetgeving in PBO voorschrift E5b - Verordening betreffende bepaalde handelsnormen voor eieren. Voor ons onderzoek zijn daarin met name art. 1; 6 lid 2 en 9 van belang.

De chemische samenstelling van natuurprodukten zoals eieren is afhankelijk van het evenwicht in de biochemische processen. De onbevruchte eieren bevinden zich biochemisch in een status quo toestand waarbij slechts langzaam verouderingsprocessen plaats vinden.

Microbiële processen en fysische veranderingen kunnen wel opmerkelijk zijn in deze onbevruchte eieren (1).

Wanneer bevruchting plaats vindt en bebroeding volgt, dan start het wonderbaarlijke biochemische levensproces en komen energie- en ademhalingsketens op gang. Eén van de metaboliëten die dan geproduceerd wordt is het D-3-hydroxyboterzuur. Deze component wordt gevormd bij de beta-oxidatie van vetzuren met acetoacetaat als precursor naast vele andere hydroxy en ketoverbindingen uit de citroenzuurcyclus. Het onderzoeken van Littman CS (1) en inmiddels ook Spelderholt-RIKILT onderzoek heeft aangetoond dat met name het D-3-hydroxyboterzuur correleert met het al dan niet bevrucht en bebroed zijn van eieren en na bevruchting en normale ontwikkeling van de kiem zeer snel toeneemt van ca. 1 mg/kg in verse eieren tot ca. 400 mg/kg indien een zichtbare embryo was ontwikkeld.

In dit verslag wordt de ontwikkeling beschreven van een gaschromatografische analysemethode en worden enkele varianten aangegeven, waaronder HPLC om het gehalte aan 3-hydroxyboterzuur in eieren en eiprodukten te bepalen.

De gaschromatografische methode werd ontwikkeld op basis van oudere methoden van Heaney, Curtis '76 (2), Robinson, Barnes, Taylor '75 (3), Staruszkiewicz e.a. '70 en '71 (4,5) en met name de meer recente methode van Littman, Schulte, Acker '82 (1).

2. Materiaal, apparatuur en hulpmiddelen

2.1 Van het Spelderholt - Beekbergen werden partijen vloeibare eieren verkregen van diverse kwaliteitsklassen alsmede enkele droge eipoeder halffabrikaten.

Voor de ontwikkeling van de methoden werden litermonsters van vloeibaar ei verkregen, danwel werden kleinere partijen bij elkaar gevoegd en gehomogeniseerd.

2.2 Voor de gaschromatografie werd gebruik gemaakt van een Varian capillair GC serie 3700 met een 25 m fused silica kolom 0,23 mm I.D. met chemisch gebonden polaire fase CP Wax 57 CB.

De splitmode injector was van het type Grob, de detektie werd gedaan met een FID en het draaggas was helium.

Tevens werd een tot on column capillair GC omgebouwde Varian 3700 gebruikt met een 25 m fused silica kolom 0,32 mm I.D. met chemisch gebonden apolaire fase CP Sil 5.

2.3 Voor het vloeistofchromatografisch onderzoek werd gebruik gemaakt van een Varian 5000 met kolomverwarming met Waters doorstroom refraktometer R 401 en 30 cm Biorad aminex 87 H kolom.

De R.I. werd gethermostatiseerd met een Colora Kryothermostaat.

2.4 Voor de clean-up en concentratie van de componenten werd gebruik gemaakt van Extrelut kolommen en van ionenwisselkolommetjes van Baker-Amino NH_2 .

Als silyleringsreagens werd BSTFA gebruikt.

Als methyleringsreagens werd 2N HCl/MeOH gebruikt.

3. Onderzoek opzet

3.1 De gevolgde chromatografische analyses zijn te verdelen in de volgende fasen:

- monstervoorbereiding
- klaren van het opgeloste monster
- clean-up van het waterig extrakt
- concentratie van de componenten
- derivatisering van de componenten
- chromatografische scheiding en berekening van het resultaat.

3.2 Voor de kwantificatie van de analyse is het gebruik noodzakelijk van een interne standaard. Ter vaststelling van de recovery van deze interne standaard bij elke analyse, werd een tweede interne standaard toegevoegd aan het eind van de analyse. IS I = glutaarzuur, IS II = adipinezuur.

De FID respons verhoudingen van deze interne standaarden en 3-hydroxyboterzuur werden vastgesteld m.b.v. een standaardmengsel van deze drie componenten en in de loop van het onderzoek enkele malen gecontroleerd.

3.3 In de loop van het onderzoek bleek het noodzakelijk de clean-up nader te onderzoeken, te verbeteren en ook de gaschromatografische condities te herzien.

3.4 Voor de controle op het goed functioneren van de methode werd een standaard eioplossing gemaakt van het waterig extrakt, van het extrakt in ethylacetaat na extrelutscheiding en van de gemethyleerde verbindingen in de eindoplossing. Op deze wijze konden veranderingen in de methode getoetst worden op hun effect op het resultaat.

3.5 Na ontwikkeling van de basismethode werd onderzocht of er mogelijkheden waren om de clean-up en derivatiseringsmethode te verbeteren en te verkorten en ook of er snellere alternatieven gevonden konden worden met HPLC.

3.6 Voor de identificatie van de componenten in het chromatogram, werd met GC-MS een standaard eioplossing onderzocht door de afdeling Organische Contaminanten en werden standaardmengsels geanalyseerd.

3.7 Voor het testen van de methode op juistheid werd de lineairiteit beproefd, de interne reproduceerbaarheid bepaald, het niveau (meetverwachting) getoetst en de detectiegrens nagegaan.

Voor de lineariteitsbepaling werd uit twee monsters met een hoog resp. laag gehalte aan 3-HBZ een lineaire mengreeks gemaakt. Deze mengsels werden meerdere malen en op verschillende dagen onderzocht. Dit gaf tevens informatie over de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de methode en ook de detectiegrens viel hieruit op te maken.

Voor vaststelling van het niveau werd 3-HBZ in verschillende hoeveelheden toegevoegd aan een eimonster met laag 3-HBZ gehalte. Behalve over de recovery werd hieruit ook weer informatie verkregen over herhaal-, interne reproduceerbaarheid en detectiegrens.

3.8 Tenslotte werd een oriënterend vergelijkend onderzoek gedaan tussen de basis GC methode en de enzymatische methode die door de afdeling Eiwitchemie werd ontwikkeld en uitgevoerd.

4. Resultaten en discussie (De subnummers komen overeen met de subnummers in onderzoek hoofdstuk 3).

Algemeen: Zie stroomschema bijlage I en basismethode bijlage II.

4.1 De monstervoorbereiding bestond uit de inweeg van ca. 25 g gehomogeniseerd eimonster en toevoeging van water en interne standaard I (glutaarzuur).

Om eiwitten en vetten te verwijderen werd het monster aangezuurd en fosforwolfraamzuur toegevoegd.

Door centrifugeren ontstond een residu en een helder waterextrakt. Dit waterig extrakt was geschikt voor verdere chromatografie. Enzymatische analyse van dit waterig extrakt bleek tot vrijwel dezelfde resultaten te leiden als de enzymatische analyse - VV9 (tabel 4 en 5).

Om de componenten over te brengen in een organisch oplosmiddel werd 20 ml van het waterig extrakt op een extrelutkolom gebracht en daarna gelueerd met ethylacetaat. Na deze opwerking werden diverse verdere bewerkingen gevolgd.

Bij de basismethode werd de ethylacetaat afgedampt totdat het monster droog was. De componenten werden daarna gemethyleerd met methanolzoutzuur en deze oplossing na neutralisatie gaschromatografisch onderzocht met een kolom voor polaire componenten CP Wax 57 CB (bijlage III).

Een snellere methode bleek te zijn om de ethylacetaat niet af te dampen doch door een amino NH_2 ionenwisselkolommetje te leiden waarbij de componenten werden geconcentreerd op de kolom en daarna de componenten weer te elueren met 1 ml van het methyleringsreagens.

Een alternatieve derivatisering i.p.v. methyleren was het silyleren van zowel de hydroxylgroep als de carboxylgroep m.b.v. BSTFA-silyleringsreagens, uitgaande van het droge extract. De componenten zijn dan apolair geworden en kunnen gaschromatografisch worden bepaald met een kolom voor apolaire stoffen: CP Sil 5 (bijlage IV).

Uit een eerste oriënterend onderzoek bleek dat de niet gederivatiseerde verbindingen van het droge extract ook m.b.v. HPLC met een ionenwisselkolom Aminex 87 H konden worden gescheiden.

4.2 De responsverhoudingen van de methylesters van resp. 3-HBZ, glutaarzuur (Glu) en adipinezuur (Adi) werden bepaald en berekend met de formules (1) en (2)

$$(1) \text{ Kf (Glu/Adi)} = \frac{\text{opp Adi}}{\text{opp Glu}} \cdot \frac{\text{mg Glu}}{\text{mg Adi}}$$

$$(2) \text{ Kf (3-HBZ/Glu)} = \frac{\text{opp Glu}}{\text{opp BHBZ}} \cdot \frac{\text{mg 3-HBZ}}{\text{mg Glu}}$$

$$(3) \text{ Kf (theoretisch) a/b}$$

$$= \frac{\text{koolstofaantal met respons in FID van b}}{\text{koolstofaantal met respons in FID van a}} \times \frac{\text{Molgew. a}}{\text{Molgew. b}}$$

Er werd verondersteld dat m.n. carboxyl en carbinolgroepen geen FID respons geven.

De theoretische waarden berekend volgens de principes van Onkie Hong (6) formule (3) bleken redelijk overeen te komen met de gevonden waarden (zie tabel 1).

4.3 De kolomextraktie van extrelut met ethylacetaat werd gecontroleerd op volledige elutie van interne standaard en 3-HBZ door de kolom met steeds grotere hoeveelheden ethylacetaat te elueren. Pas na ca. 160 ml ethylacetaat bleek het 3-HBZ volledig van de kolom af te zijn terwijl de IS I glutaarzuur reeds bij de 40 ml volledig geëluëerd was (zie tabel 2).

In deze fase van het onderzoek bleek een betere GC scheiding van 3-HBZ en een begeleidende component nodig. Hiertoe werd de programmering van de temperatuur vertraagd waardoor een vrijwel basislijnscheiding werd verkregen van 3-HBZ. Ook de scheiding van IS I en II werd hierdoor verbeterd. Voor het verder onderzoek werd deze programmering gehandhaafd (zie chromatogram 1).

4.4 De gemethyleerde verbindingen van de standaard oplossing werden herhaaldelijk geanalyseerd ter controle op het niveau van de GC analyse. Uit de waarnemingen werd het gemiddelde berekend en de spreiding van het GC-deel van de analyse. Voor het niveau 7 ppm werd een variatiecoëfficiënt berekend van 4,2% of $R_i = 0,8$ mg/kg (zie tabel 3). Hieruit bleek tevens de goede houdbaarheid van de extrakten! Houdbaarheid tot enkele weken.

4.5 Vervanging van het indampen van ca. 160 ml ethylacetaat door component concentratie op een ionenwisselkolommetje van Baker was bijzonder snel en eenvoudig doch gaf soms afwijkende resultaten t.o.v. de werkwijze volgens de basismethode. Elutie met 1 ml methanol i.p.v. met 1 ml methanol/HCl kon toegepast worden wanneer GC met gesilyleerde verbindingen gewenst was (zie chromatogram 2 en vergelijk hierbij chromatogram 1).

Voor de weinig aantrekkelijke methyleringsmethode met vers bereid 2 N zoutzure methanol, verwarming en neutraliseren van het zoutzuur met natriumbicarbonaat gevolgd door ammoniakale methanol waarbij een aan ammoniumchloride oververzadigde oplossing van methanol wordt verkregen, werd een vervangende derivatisering toegepast door te silyleren. Het drooggedampte (ethylacetaat) extrakt werd met 100 μ l BSTFA gesilyleerd bij 60°C gedurende 30 min. Daarbij werden eerst de hydroxylgroepen gesilyleerd en vervolgens de carboxylgroepen (7).

Het gaschromatogram (zie chromatogram 3) werd hierdoor en door toepassing van een andere kolomfase (CP Sil 5) veranderd en is niet zonder meer vergelijkbaar met een chromatogram van de methylesters op CP Wax 57 CB.

Het silyleren is een elegantere techniek dan methyleren en leverde een geringe tijdswinst, doch beide derivatiseringen werden equivalent bevonden (zie tabel 4 en 5 grafiek 1 t/m 6). Doordat echter somtijds toch verschillen werden gevonden is de basismethode met methyleren van de componenten nog steeds het meest betrouwbaar op dit moment.

Ook werd nagegaan of met HPLC een alternatief gevonden kon worden. Hiertoe werd het droog gedampde ethylacetaatextract opgenomen in 50 μ l water en 25 μ l van dit opgeloste eiextract geïnjecteerd op de ionenwisselkolom van de HPLC bij 40°C.

Voor de eimonsters met ca. 7 mg/kg 3-HBZ werden overeenkomstige resultaten verkregen als met de GCC (zie chromatogrammen 6 en 7). Een gehalte van ca. 0,5 mg/kg zou nog meetbaar zijn.

Dit HPLC chromatogram werd in ca. 30 min verkregen terwijl het gaschromatogram ca. 60 min duurt. Met GC hebben we echter de beschikking over auto-injectoren waardoor deze tijd geen rol speelt.

4.6 Met behulp van GC-MS werd een standaard eiextract onderzocht dat werd verkregen met de basismethode en werd het 3-hydroxyboterzuur geïdentificeerd. In chromatogrammen 1 en 3 zijn enkele pieken benoemd zoals ze werden gevonden met een CP Wax 57 CB kolom na methylering resp. met een CP Sil 5 kolom na silylering. In chromatogrammen 4 en 5 zijn resp. een aantal gemethyleerde en gesilyleerde standaardcomponenten aangeduid waarbij hun retentietijden inpasbaar zijn in chromatogrammen 1, 2 en 3.

Voor structuurformules en gegevens over de componenten zie bijlage V.

4.7 De lineariteit van de methode bleek goed te zijn in het onderzochte gebied van 0-10 mg/kg.

De herhaalbaarheid van de basismethode berekend uit de waarnemingen bij het lineariteitsonderzoek en de additietest had een standaarddeviatie van 0,18 mg/kg en een reproduceerbaarheid met een SD van 0,31 mg/kg (zie tabellen 4 en 5), ofwel herhaalbaarheid $r = 0,5$ en interne reproduceerbaarheid $R_i = 0,9$ (zie tabellen 4a en 5a).

Het piekoppervlak van 1 mg/kg was ca. 250 terwijl 100 nog meetbaar is. De detectiegrens van de basismethode ligt derhalve op ca. 0,4 mg/kg. Door simpele aanpassingen zoals meerdere extraktkolommen, verzamelen van extrakten en splitless on column injectie, kan deze detectiegrens met een faktor 100-200 omlaag gebracht worden. Deze uiterste detectiegrens wordt verkregen door het totale waterige extrakt over ca. 5 extrelut kolommen te leiden en te elueren met ethylacetaat. Leid al deze ethylacetaatfrakties (800 ml) door één amino NH_2 kolom en elueer de gebonden componenten met 1 ml MeOH. Damp de methanol in en silyleer de verbindingen met 100 μl BSTFA en injecteer 1 μl on column op CP Sil 5. De FID detector heeft een (nog 10 x te verhogen) gevoeligheid van 1 ng. Wanneer de boven beschreven werkwijze wordt gevolgd zou een BHBZ-gehalte van 4 $\mu\text{g/kg}$ (ppb) nog aantoonbaar zijn.

Het terugvindpercentage van toegevoegde standaarden BHBZ berekend met de interne standaard I (Glu) in het 0-10 mg/kg gebied lag rond 80% (60-100%) (zie tabel 5).

De recovery van ca. 80% voor IS I (in tabellen 2 t/m 5) werd ook gevonden door Littman en Schulte (1) en heeft betrekking op het terugvindpercentage van interne standaard I (Glu). Dit percentage geeft per analyse aan of de analyse betrouwbaar is geweest. De verliezen ontstaan in dit geval door afcentrifugeren van het residu. Toen het totale ei homogenaat op de extrelut kolom gebracht werd, was de recovery voor de IS I (Glu) 100%. Deze werkwijze is echter niet elegant, blijkt ook een minder schoon chromatogram op te leveren en is bovendien niet nodig om een juist gehalte te leveren. De methode gaat ervan uit dat het glutaarzuur (IS I) zich op dezelfde wijze verdeelt over residu en filtraat als het 3-HBZ. Voor het 0-10 mg/kg gebied is dit verantwoord.

4.8 Vergeleken met de enzymatische analyses was de overeenkomst in eerste instantie niet bevredigend. Met name bleek de enzymatische analyse niet betrouwbaar bij lage gehalten. In de loop van het onderzoek werden zowel de enzymatische (8) als de gaschromatografische methode verbeterd en voor zover aanwezig werden de resultaten vergeleken (zie tabel 6 en grafiek 7). Bij het lineariteitsonderzoek en standaardadditie test werden de analyses ook met de enzymatische methode uitgevoerd door de afdeling Eiwitchemie. De resultaten kwamen goed overeen met de resultaten van de GC basismethode.

Enzymatische analyse van enkele waterige extracten van de gaschromatografische analyse bleek zonder problemen mogelijk en gaf dezelfde resultaten als met de oorspronkelijke enzymatische analyse, doch had verder geen voordelen dan arbeidswinst bij analyseren volgens deze twee methoden (zie tabel 4 en 5).

4.9 Analyse van eipoeder en vloeibare gesuikerde ei producten gaf geen bijzondere problemen. Voor de inweeg werd rekening gehouden met de hoeveelheid ei in het monster.

5. Conclusies

Met capillaire gaschromatografie is 3-HBZ te bepalen voor gehalten boven ca. 5 µg/kg. Bij berekening van de herhaalbaarheid werd een standaarddeviatie gevonden van 0,2 mg/kg voor het 1-10 mg/kg gebied en voor de reproduceerbaarheid werd een SD gevonden van 0,3 mg/kg.

De in de praktijk voorkomende gehalten van 0,5 mg/kg en hoger zouden bovendien met HPLC bepaald kunnen worden doch levert geen voordelen. Vergeleken met de enzymatische analyse van de afdeling Eiwitchemie werd met enig voorbehoud een goede overeenkomst gevonden met de GC analyse boven 3 mg/kg. Een goede methodevergelijking dient nog gemaakt te worden. Gezien de tot nu toe verkregen resultaten lijkt het resultaat hoopvol.

Met de GC analyse is het mogelijk om ook andere zuren uit de citroenzuur-cyclus te bepalen en een correlatie te leggen met al dan niet bebroed, bevrucht, afgestorven of microbieel aangetast. Verder onderzoek waaronder GCMS identificatie is dan nodig. De GC is evenals de enzymatische analyse geschikt als routinemethode met ca. 20 analyses per dag. Analyse van de silylethers gaf soms resultaten die doen vermoeden dat dit een betere methode zou kunnen blijken te zijn dan de methode met de methylesters. Verdere ervaring met deze methode dient verkregen te worden. Tot nu toe is de basismethodiek met methylesters het meest betrouwbaar.

6. Literatuur

1. S. Littman, E. Schulte, L. Acker: Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1982) 175, 101-105-112.
2. R.K. Heaney, R.F. Curtis: J. Sci. Food Agric. (1976) 27, 1057-1063.
3. D.S. Robinson, E.M. Barnes, J. Taylor: J. Sci. Food Agric. (1975) 26, 91-98 en (1976) 27, 1057-1065.
4. W.F. Staruszkiewicz jr., J.F. Bond, H. Salwin: J. Chromatogr. (1970) 51, 423-432.
5. W.F. Staruszkiewicz jr., J.F. Bond, H. Salwin: J.A.O.A.C. (1971) 54 (4) 773-776.
6. L. Ong Kie Hong: Investigations of the hydrogen flame ionization detector. R.P.W. Scott ~ Gaschromatography 1960, 7-15.
7. Blau King ~ Handbook of derivatives for chromatography, chap. 4. C.F. Poole ~ Advances in silylation of organic compounds for GC.
8. H. Elenbaas, W. Haasnoot ~ RIKILT onderzoekrapport ~ 84.7. Enzymatische analyse van 3-HBZ.

Tabel 1. FID - reponsfactoren

	Methylesters		Silylethers	
	gevonden	theoretisch	gevonden	theoretisch
Kf 3-HBZ/Glu	1,33	1,31	1,00	0,89
Kf Glu/Adi	1,15	1,09	0,98	1,01

Tabel 2. Invloed van het elutievolume op het gevonden gehalte aan 3-HBZ

Ethylacetaat (elutievolume)	3-HBZ gevonden	Recovery GZ/AZ
ml	mg/kg	%
40	2,3	54
80	4,0	69
120	5,9	59
160	6,7	69
200	6,9	69
240	6,5	64

Tabel 3. 10-voudig onderzoek van een gemethyleerde standaard ei-oplossing

Datum	3-HBZ	Recovery GZ/AZ
	ppm	%
1984-01-11 (oude kolom)	7,0	72
1984-01-12	6,8	75
1984-01-12	7,0	73
1984-01-20	6,9	67
1984-01-17	6,8	60
1984-01-24 (nieuwe kolom)	7,6	79
1984-01-25	7,5	86
1984-01-26	7,3	89
1984-02-01 (gereviseerde kolom)	6,9	87
1984-02-01	7,0	83

Van het gaschromatografische analysedeel was de standaarddeviatie 0,30 mg/kg of wel de variatiecoëfficiënt 4,2% en de interne reproduceerbaarheid 0,8 mg/kg.

Tabel 4. Lineariteitsonderzoek

Mengreeks van A (RIKILT 1983 46760) en B (RIKILT 1983 44547)

Mengverhouding A/B	1/0	3/1	1/1	1/3	0/1
<u>Gemethyleerd*</u> 1984-01-11 Split 1:7	0,8/72	2,3/64	3,6/64	5,4/59	6,5/58
1984-01-12 On Column	0,3/77	2,3/61	3,5/68	5,2/64	6,8/61
1984-01-31 Split 1:7	0,9/102	2,5/100	3,9/96	5,6/96	6,7/98
<u>Gesilyleerd*</u> 1984-01-31 On Column	1,4/54	3,8/87	5,2/90	7,3/86	8,3/96
<u>Enzymatisch</u> 1984-02-02 waterextract van GCC	0,8 1,4	2,4 2,8	3,7 3,8	4,7 5,5	6,3 7,7

* a/b a = mg/kg 3-HBZ

b = terugvindpercentage van glutaarzuur (IS I)

Tabel 4a. Lineariteitsonderzoek - Berekeningen

$y = a x + b$ y = 3-HBZ gehalte

x = percentage B in A

a = helling van de rechte lijn door de meetpunten

b = gehalte van A (46760)

Analyse	a	b	Gehalte van B (44547)	Res. standaard error
Methyl 1	0,0580	0,82	6,62	0,166
Methyl 2	0,0636	0,44	6,80	0,189
Methyl 3	0,0588	0,98	6,86	0,166
Silyl	0,0692	1,74	8,66	0,405
Enzym	0,0532	0,92	6,24	0,182
Methyl 1,2,3	0,0601	0,75	6,75	0,218

Tabel 5. Standaardadditie van 3-HBZ aan eimonster (RIKILT 1983 44545)

Additie	0	2	3,3	4	6,0	6,7	10,0	Recovery over 3-HBZ %
<u>Methylesters</u>								
1984-01-19 Split 1:7	1,3/77	2,9/84	4,4/85	6,3/83				83
1984-01-20 Split 1:7	1,5/88	2,9/88	4,5/93	6,1/82				77
1984-02-02 Split 1:7	1,2/107	3,7/97				5,9/100	7,5/103	63
<u>Silylethers</u>								
1984-01-31 On Column	1,6/75	3,3/95		5,9/85	7,5/66			102
1984-01-31 On Column*	1,8/57		4,4/77			6,6/61	8,4/83	66
<u>Enzymatisch*</u>								
1984-02-02	1,1		2,4 add.			(7,4)add.	4,4 add.	(66)
Alleen D BHBZ!			1,66 D			3,33 D	5,00 D	
Waterextract van GOC	1,3		2,3			4,7	5,0	79

* Additie van 3-HBZ apart van additie glutaarzuur (IS I)

a/b a = mg/kg 3-HBZ

b = terugvindpercentage van glutaarzuur (IS I)

Tabel 5a. Standaardadditie - berekeningen.

$y = a x + b$ y = 3-HBZ gehalte

x = 3-HBZ additie

a = helling van de rechte lijn door de meetpunten

b = gehalte van A (44545)

Analyse	a	b	Res. standaard error	Recovery (100 x a)
Methyl 1	0,825	1,25	0,132	83
Methyl 2	0,770	1,44	0,077	77
Methyl 3	0,632	1,44	0,319	63
Silyl 1	1,015	1,53	0,302	102
Silyl 2	0,659	2,01	0,284	66
Methyl 1,2,3	0,673	1,55	0,411	67
Silyl 1,2	0,715	2,08	0,743	72
Meth. + sil.	0,697	1,74	0,640	70

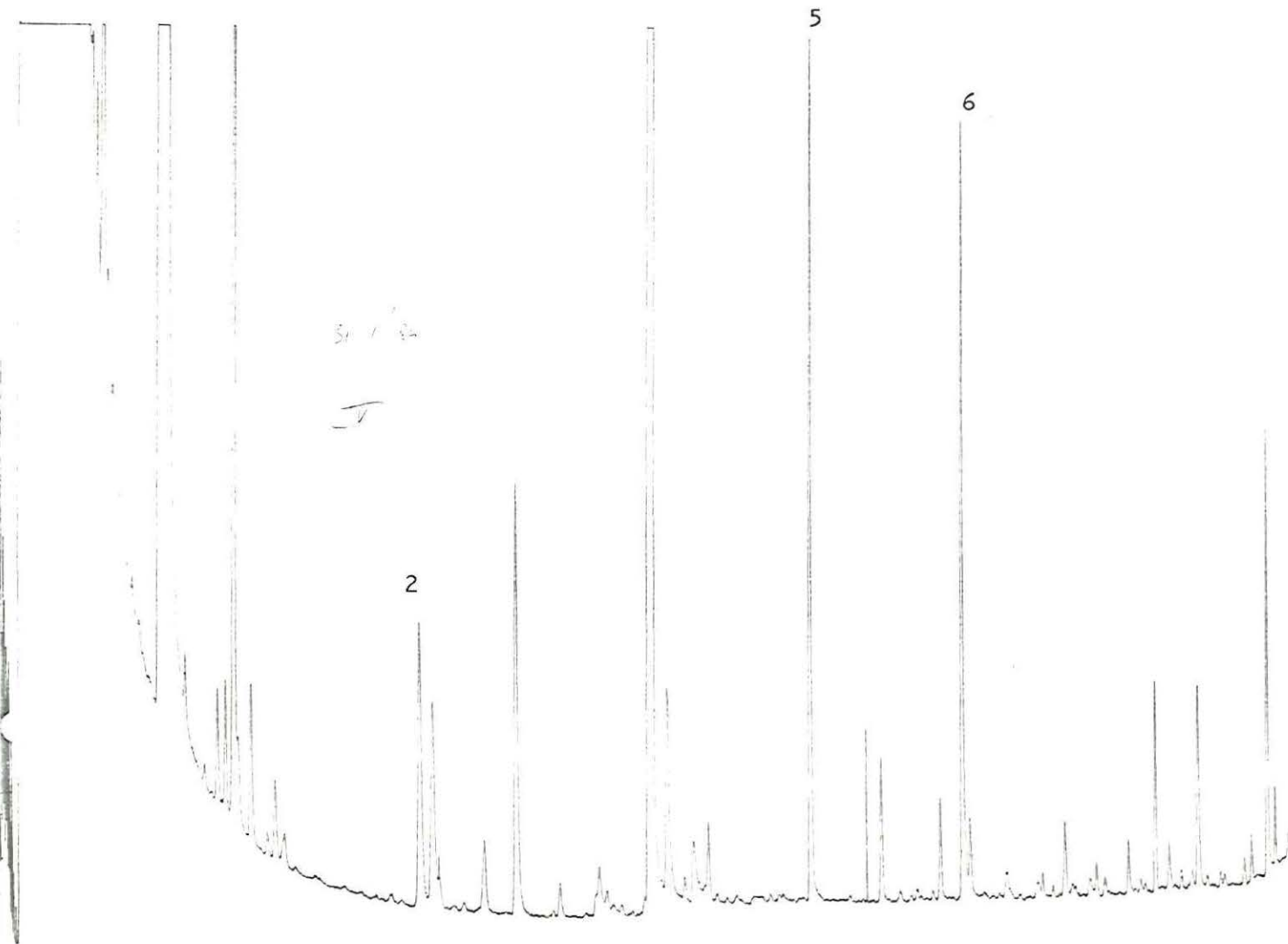
Tabel 6. Overzicht van resultaten 1983/1984

RIKILT nummer	Methylesters			Silylethers		Enzymatisch	
43601	49					47	
43605	2,0					1,5	
44507	133					143	
44539	1,0	1,0	1,0			1,9	
44542	56	44	54			58	
44545	1,5	1,3	1,3	1,8	1,6	0,6	
	uit tab. 5 n=20 1,3-2,1					1,1	
44547	6,7	6,9	6,5			8,3	8,4 6,3
	uit tab. 4	n=15	6,8	n=5	8,3	n=5	5,9
45439	1,0						
46743	0,7					0,8	
46748	4,6					1,0	
46760	0,8	0,9		1,4			
	uit tab. 4	n=15	0,8	n=5	0,8	n=5	0,8
				n=5	1,8		
46769	0,9					3,0	2,4
46771	2,8					2,8	
49449	2,8	2,8				2,5	
49450	4,7					3,7	

Chromatogram 1

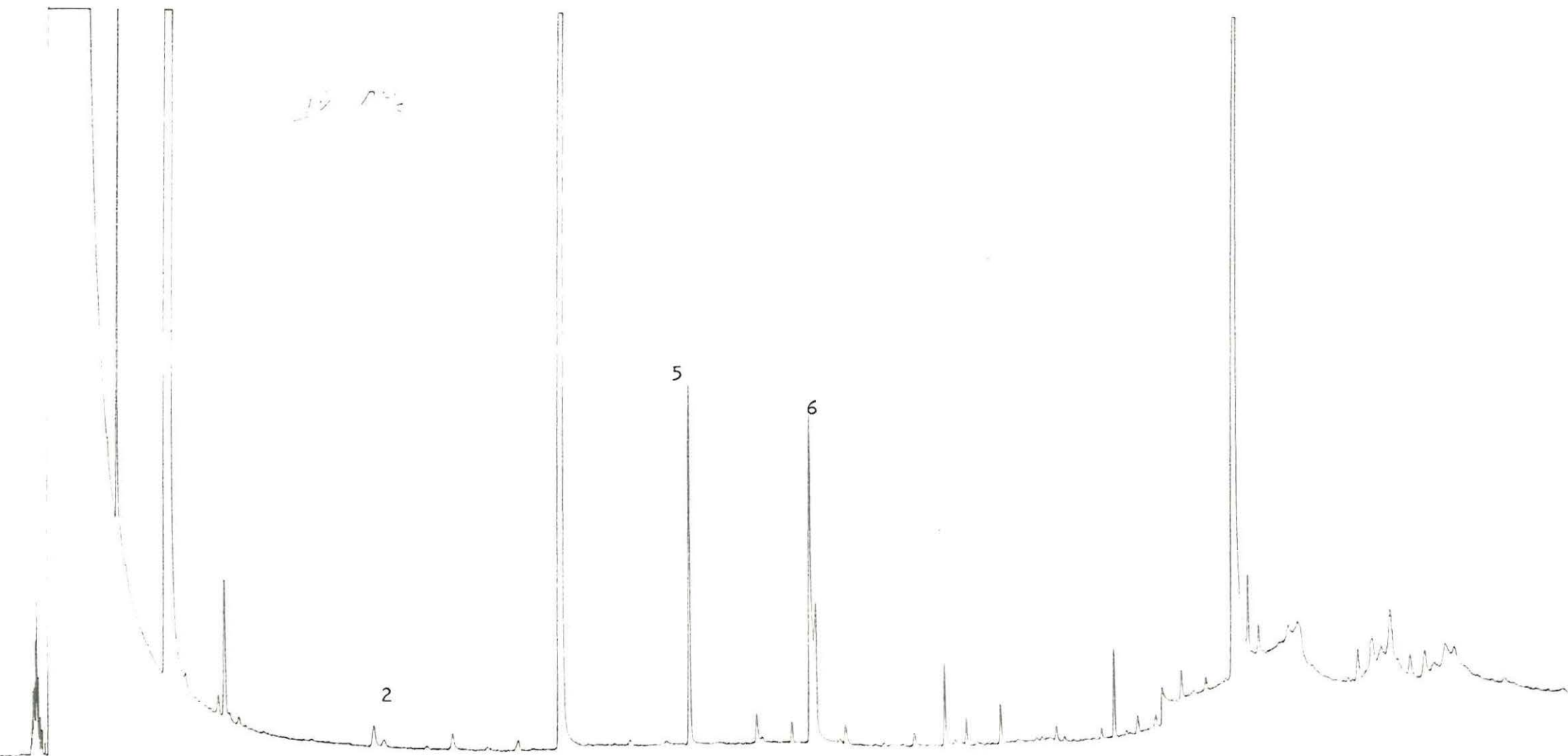
Basismethc (methylesters)
ei 1/3 uit de mengreeks

2 - 3 hydroxy boterzuur
5 - Glutaarzuur
6 - Adipinezuur



Chromatogram 2

ei 1/3 methylesters met amino NH_2 concentratie
van uit de mengreeks



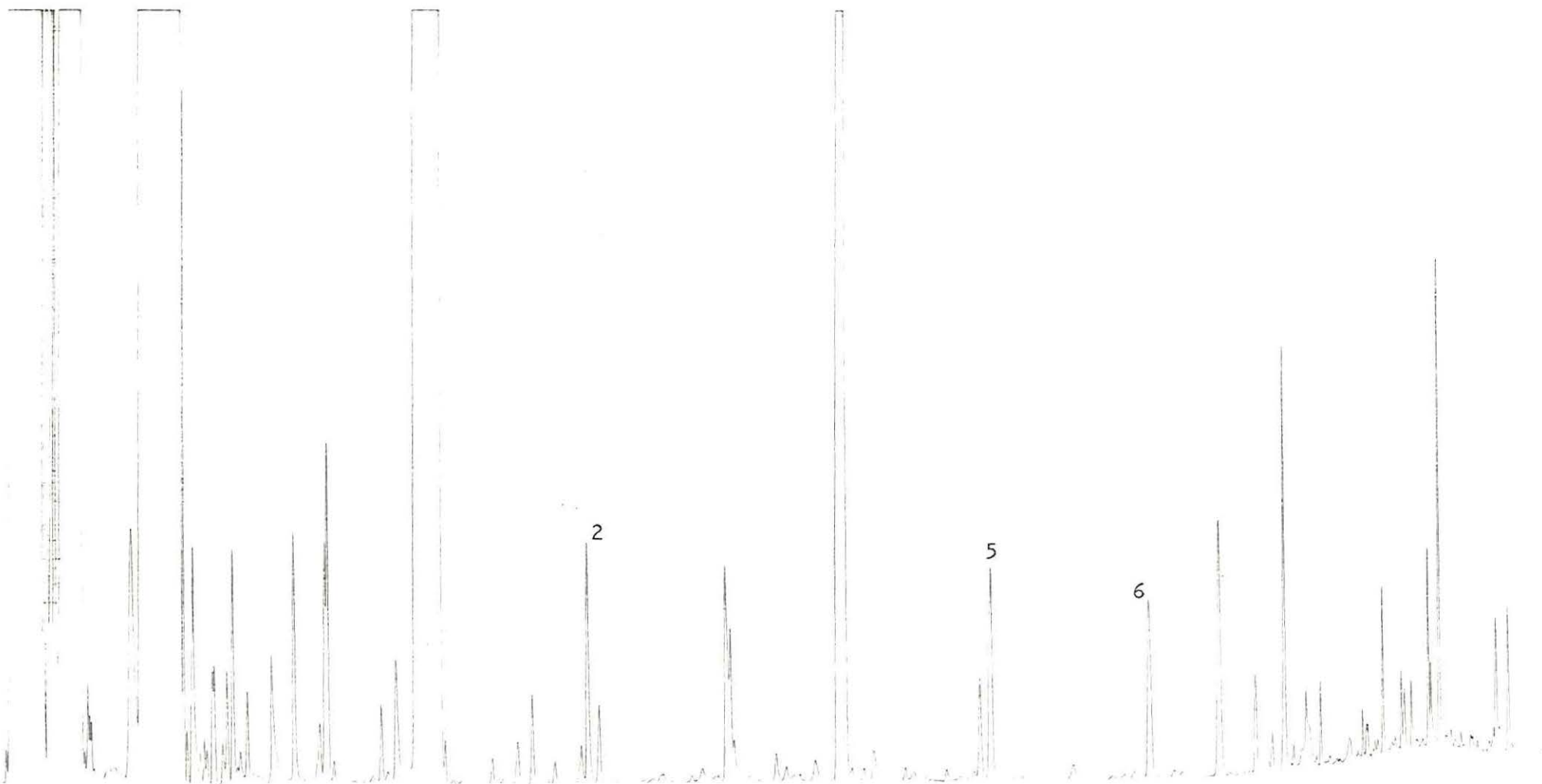
Chromatogram 3

Silylethers van
ei 1/3 uit de mengreeks

2 - 3-hydroxyboterzuur

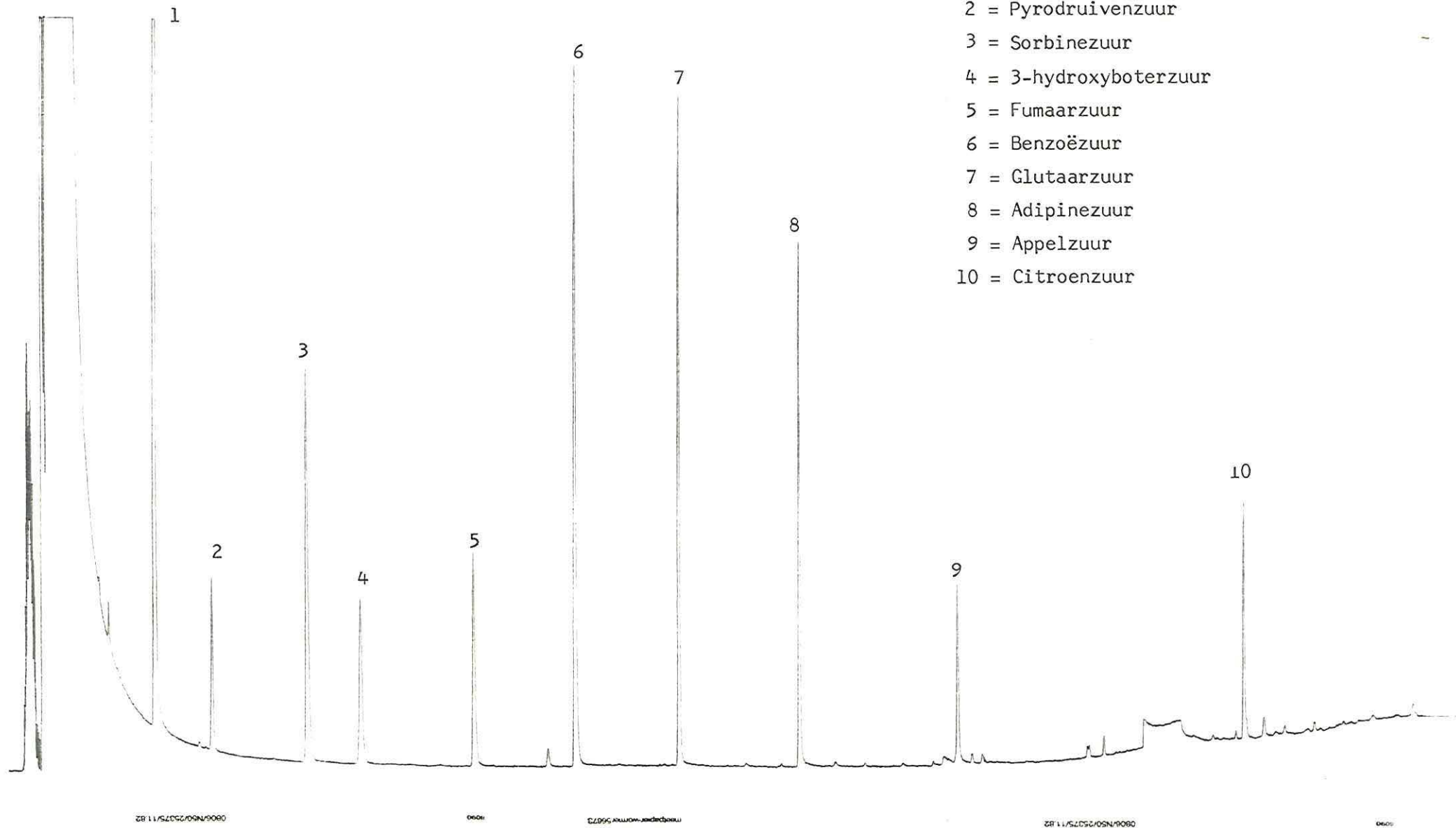
5 glutaarzuur

6 adipinezuur



Chromatogram 4 Standaardmengsel methylesters

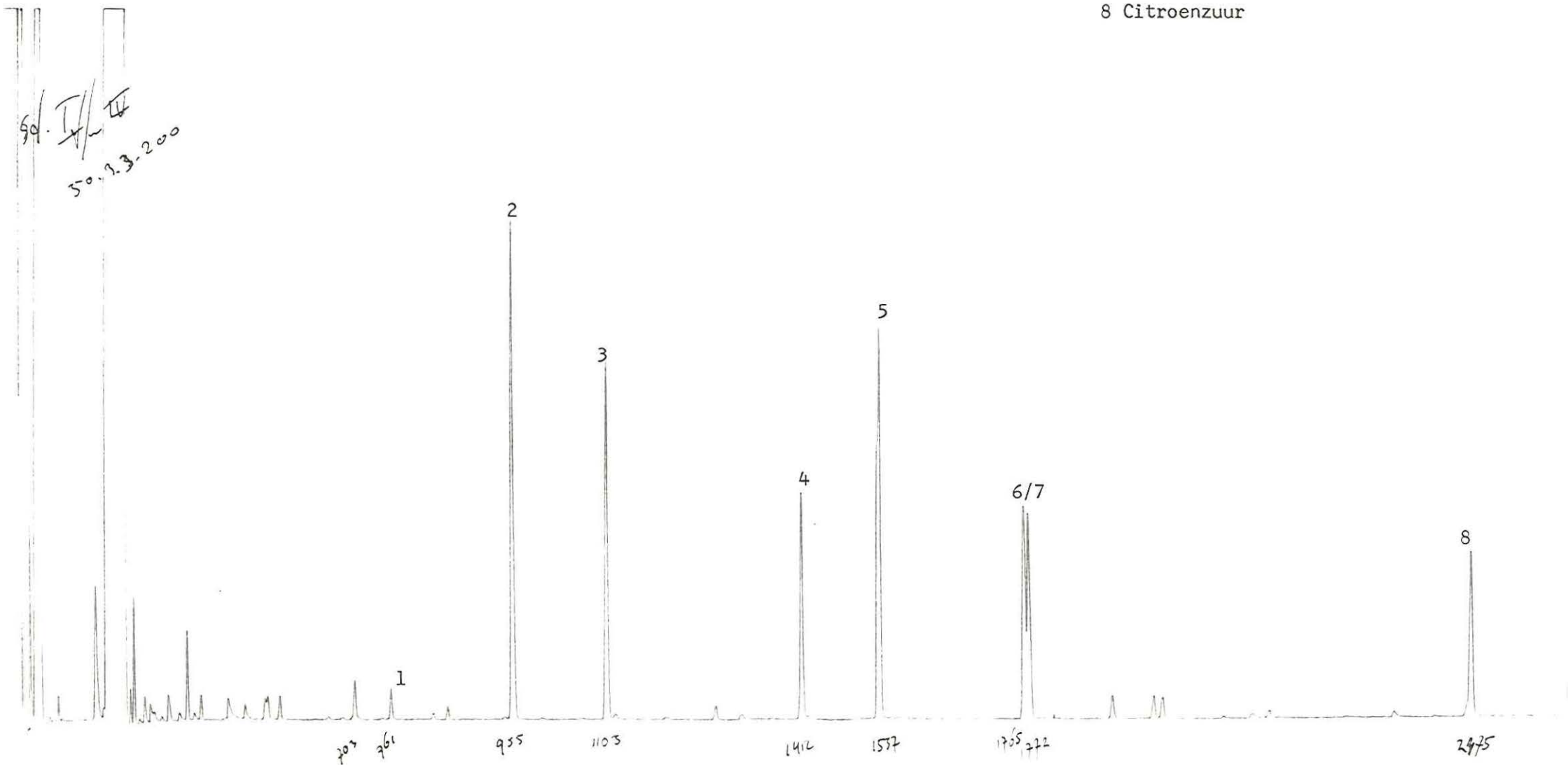
- 1 = Melkzuur
- 2 = Pyrodruivenzuur
- 3 = Sorbinezuur
- 4 = 3-hydroxyboterzuur
- 5 = Fumaarzuur
- 6 = Benzoëzuur
- 7 = Glutaarzuur
- 8 = Adipinezuur
- 9 = Appelzuur
- 10 = Citroenzuur



Chromatogram 5

Standaardmengsel silylethers

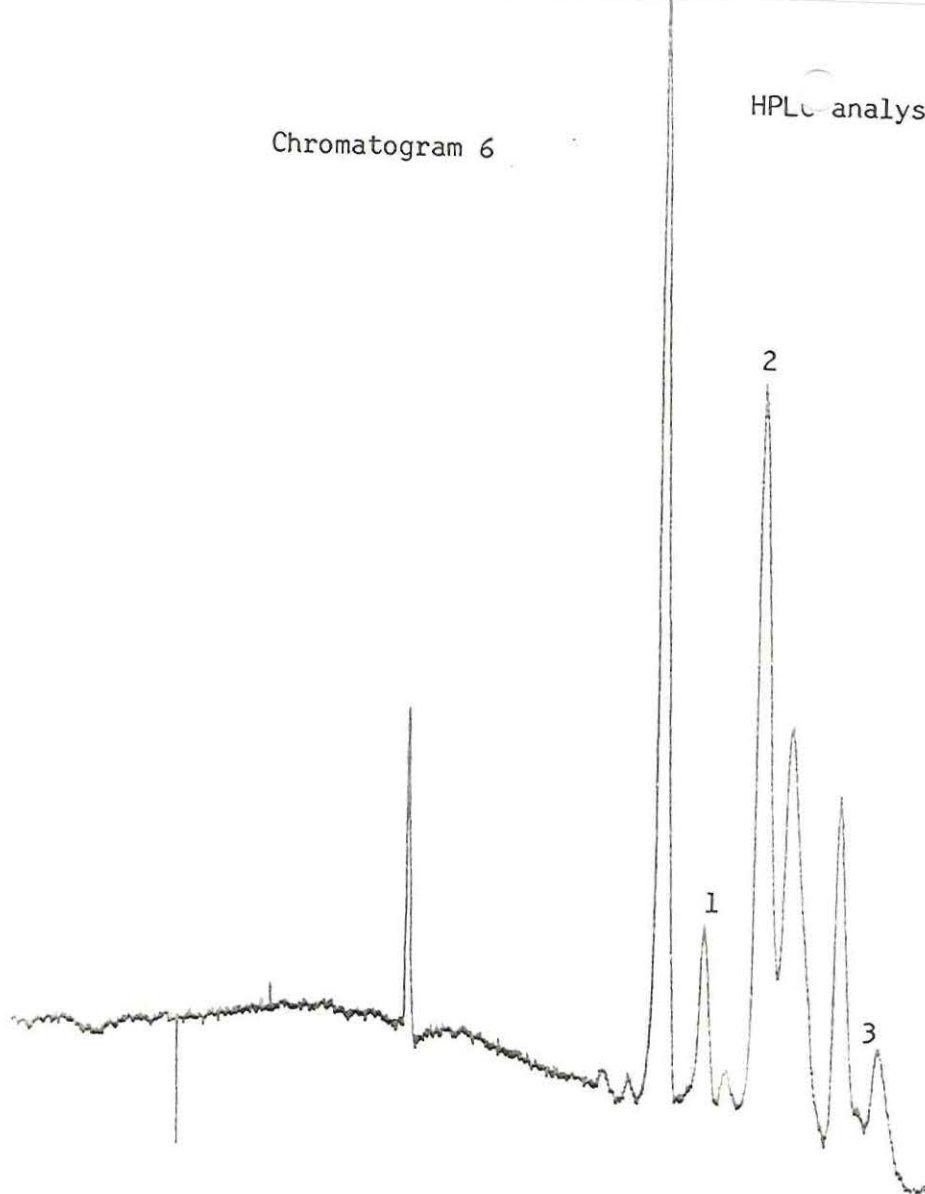
- 1 Pyrodruivenzuur
- 2 3-hydroxy boterzuur
- 3 Benzoëzuur
- 4 Fumaarzuur
- 5 Glutaarzuur
- 6 Adipinezuur
- 7 Appelzuur
- 8 Citroenzuur



Chromatogram 6

HPLC-analyse van een standaard ei

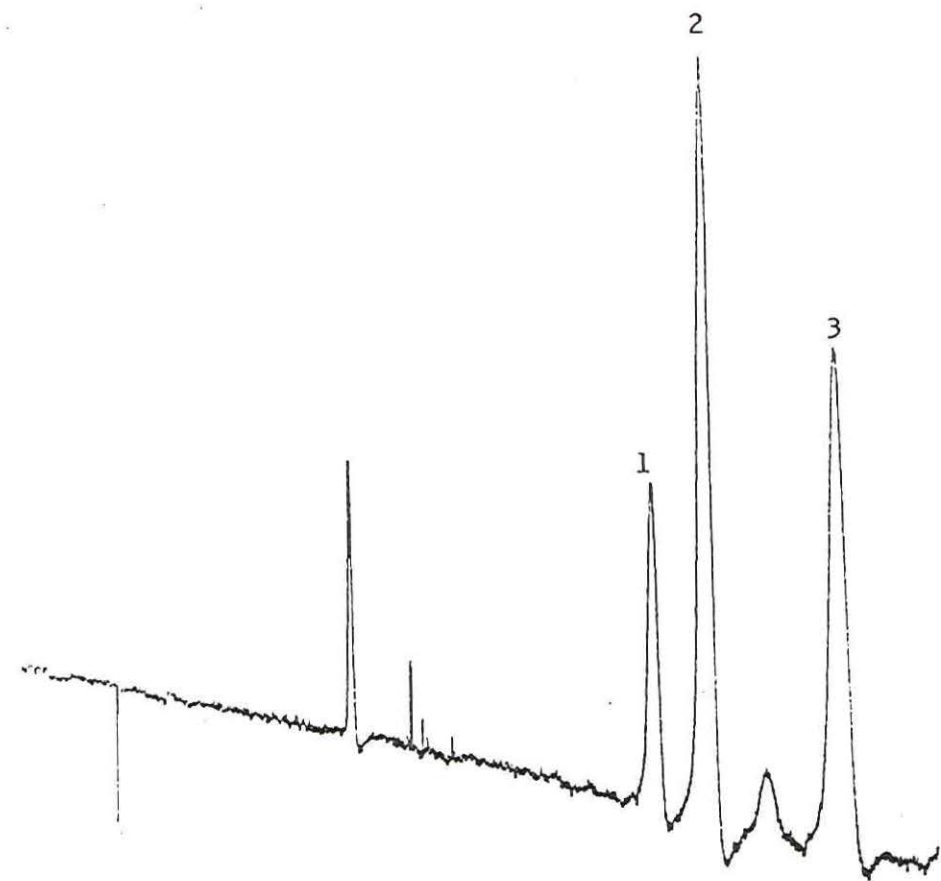
- 1 - 3 hydroxyboterzuur
- 2 - glutaarzuur
- 3 - Adipinezuur



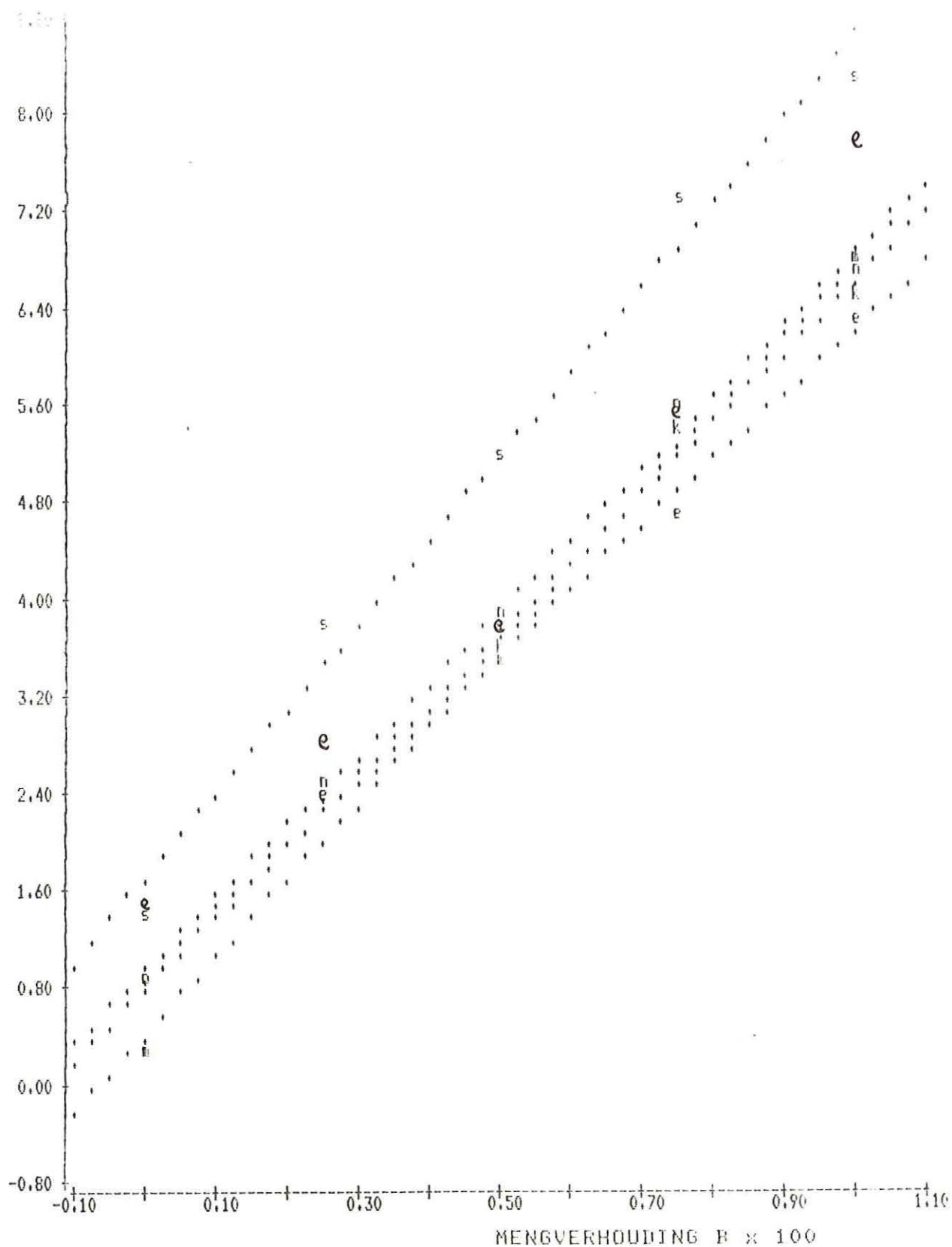
Chromatogram 7

H₁C analyse van standaarden 1, 2 en 3

- 1 - 3 hydroxyboterzuur
- 2 - glutaarzuur
- 3 - Adipinezuur



Grafiek 1. Lineariteit - Alle waarnemingen

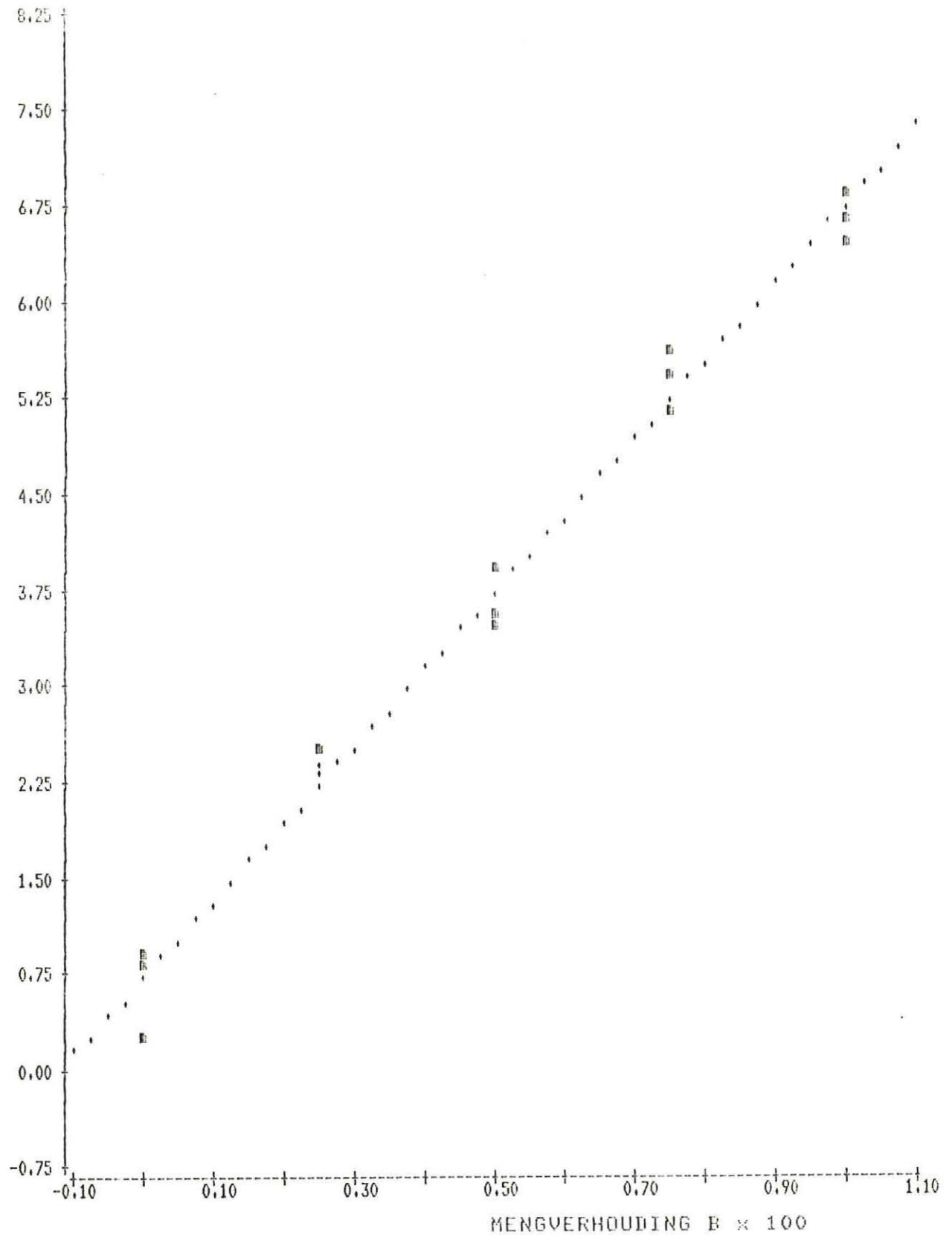


BHBZ 1984

kkkkkk: METHYL 1
 mmmmm: METHYL 2
 nnnnnn: METHYL 3
 ssssss: SILYL
 eeeee: ENZYM
 ::::: DATA OVERLAP
 eeeee: ENZYM

Grafief 2. Lineariteit - Methylesters

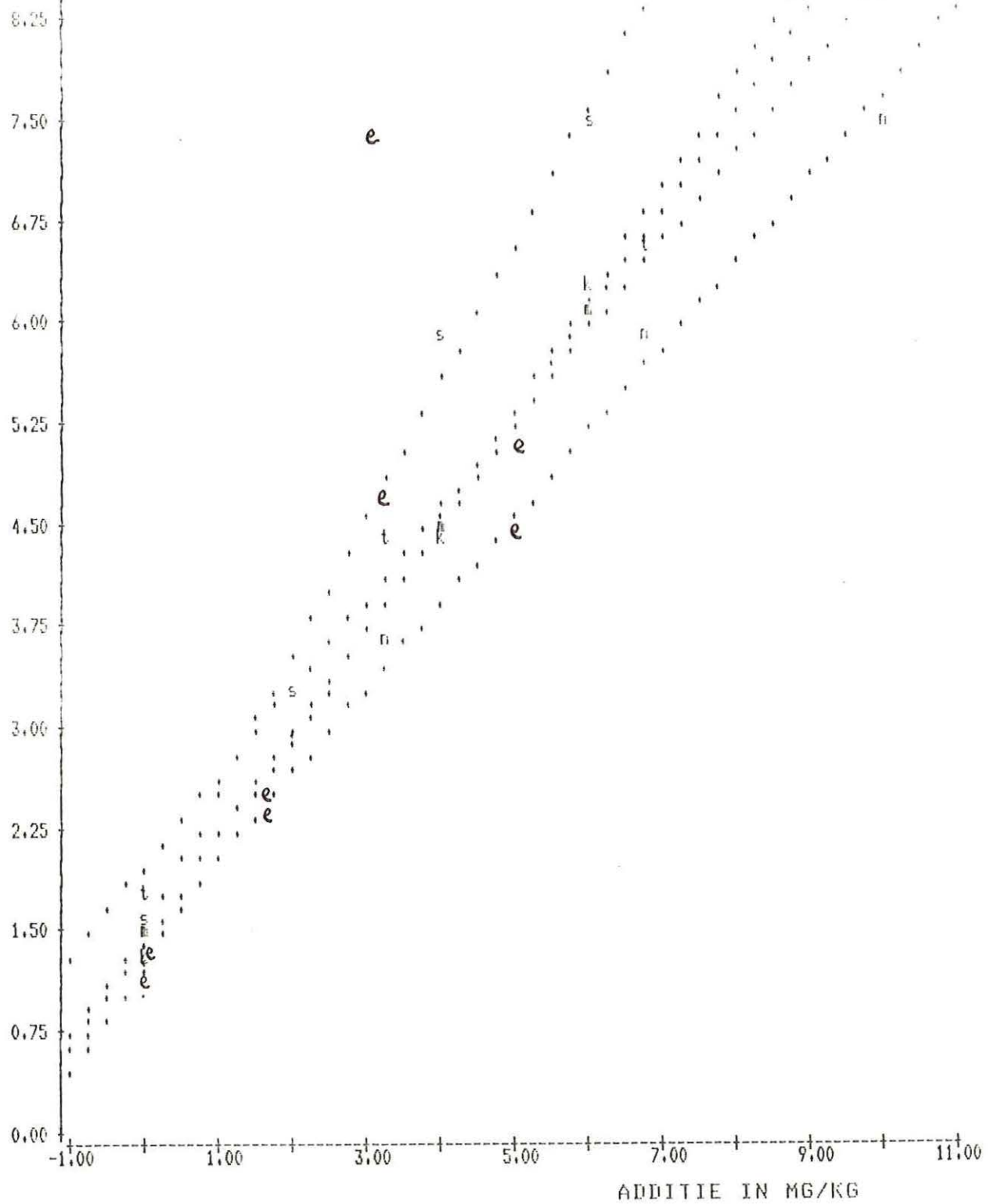
GEVONDEN IN MG/K



BHEZ 1984

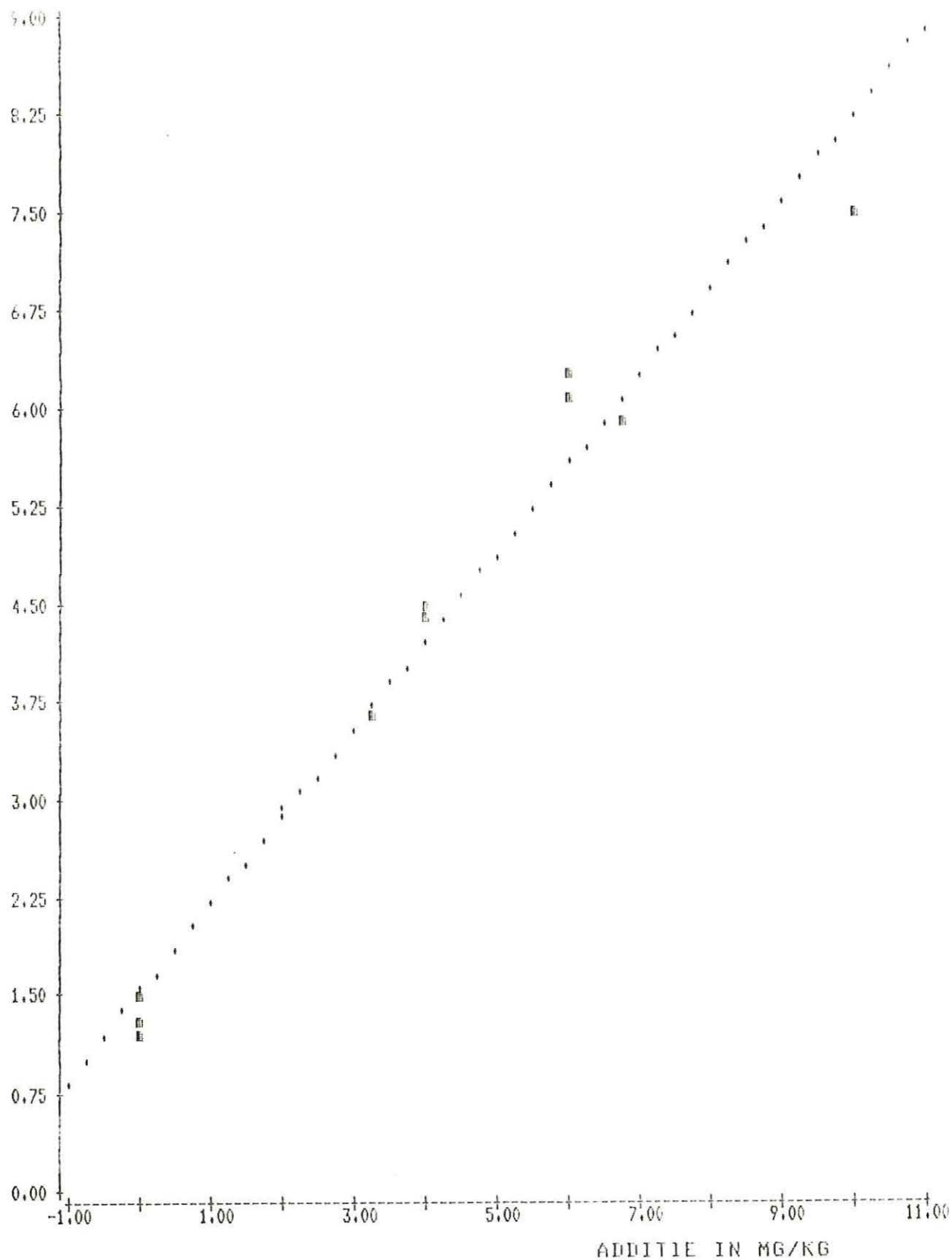
DATA OVERLAP

Grafiek 3. Standaardadditie - Alle waarnemingen



BHBZ 1984

kkkkkk: METHYL 1
 mmmmm: METHYL 2
 nnnnnn: METHYL 3
 ssssss: SILYL 1
 tttttt: SYLYL 2
 ::::::: DATA OVERLAP
 eeeeeee: ENZYH

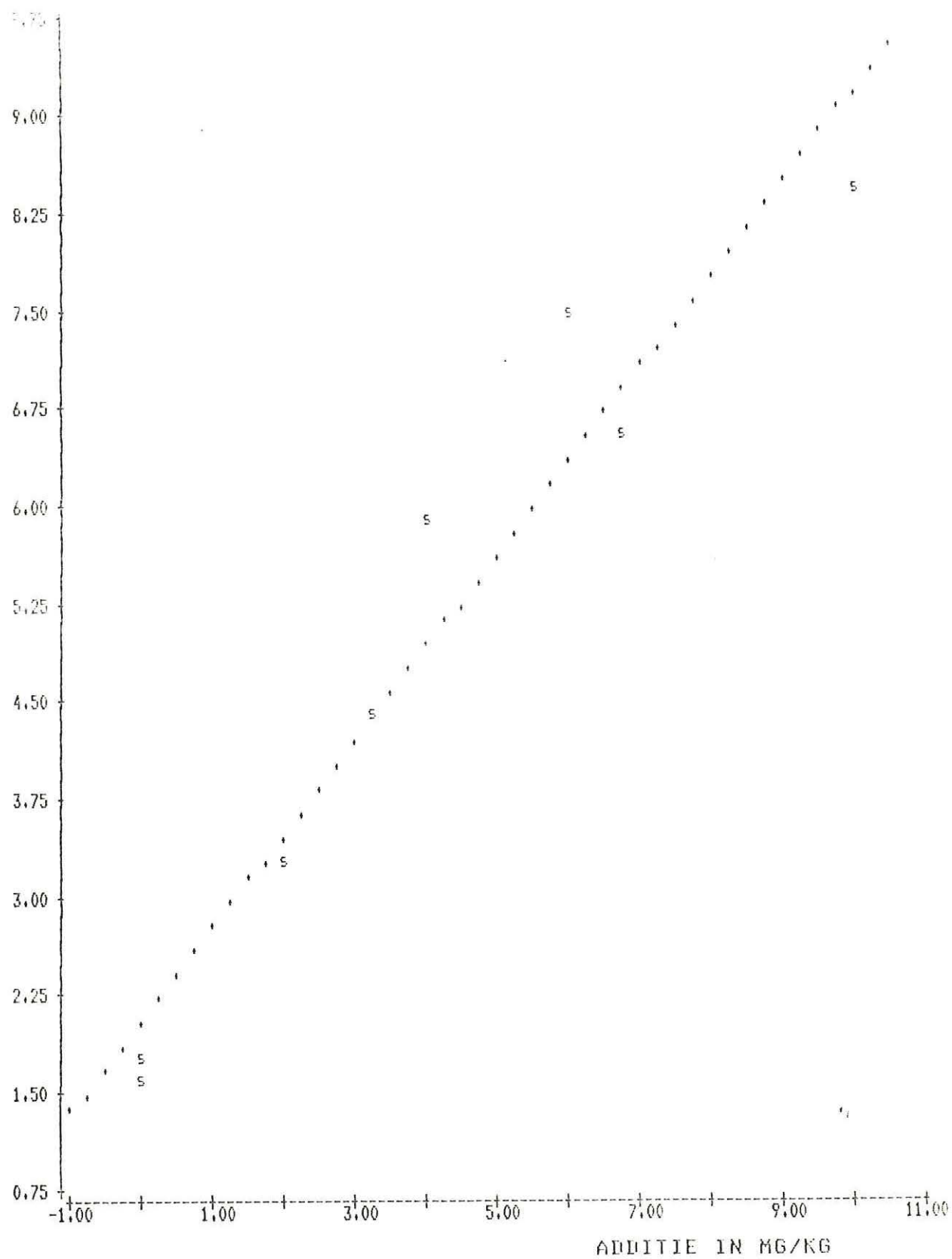


BHBZ 1984

***** DATA OVERLAP

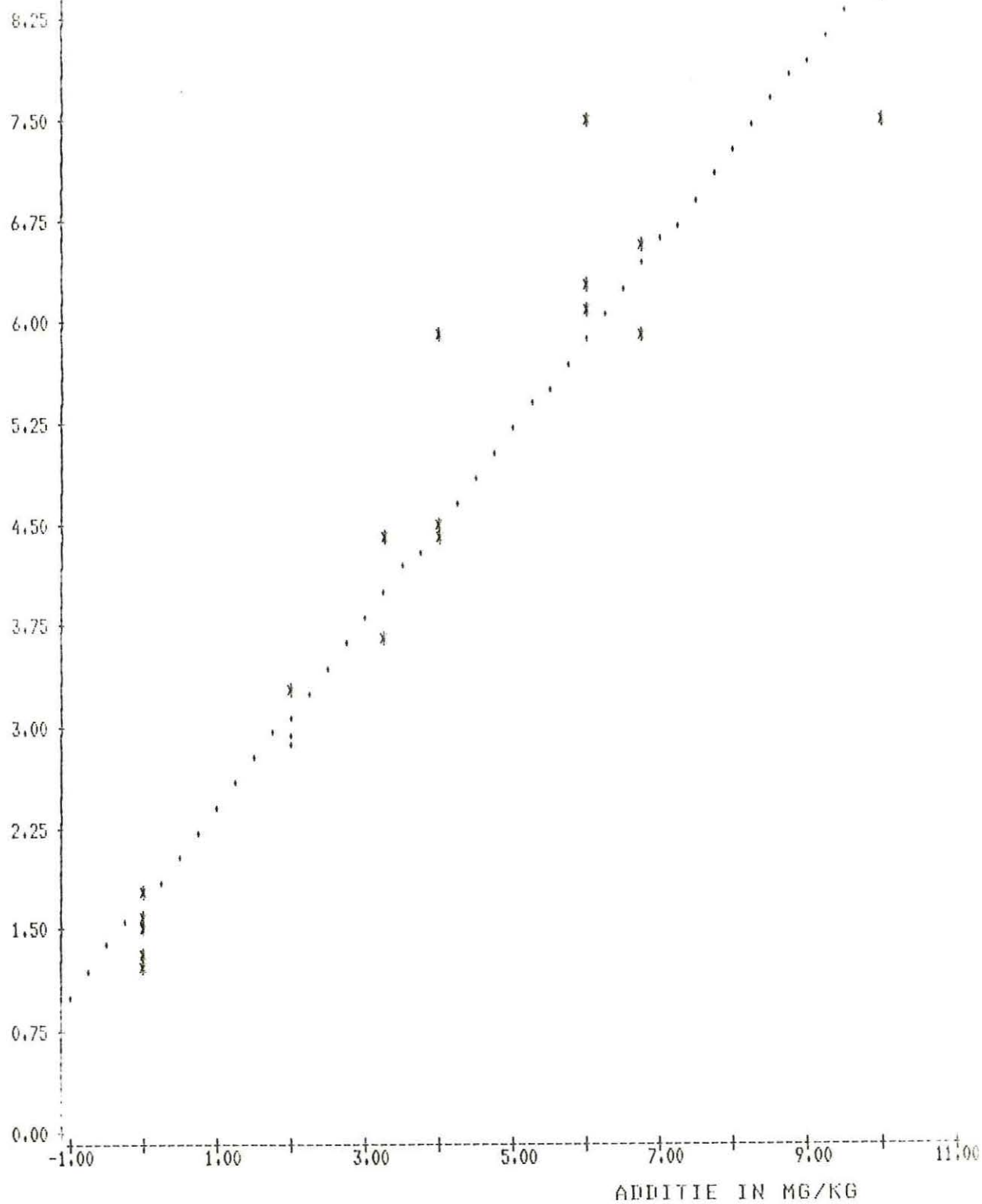
Grafiek 5. Standaardadditie - Silylethers

STANDAARD ADDITIE IN MG/KG



BHBZ 1984

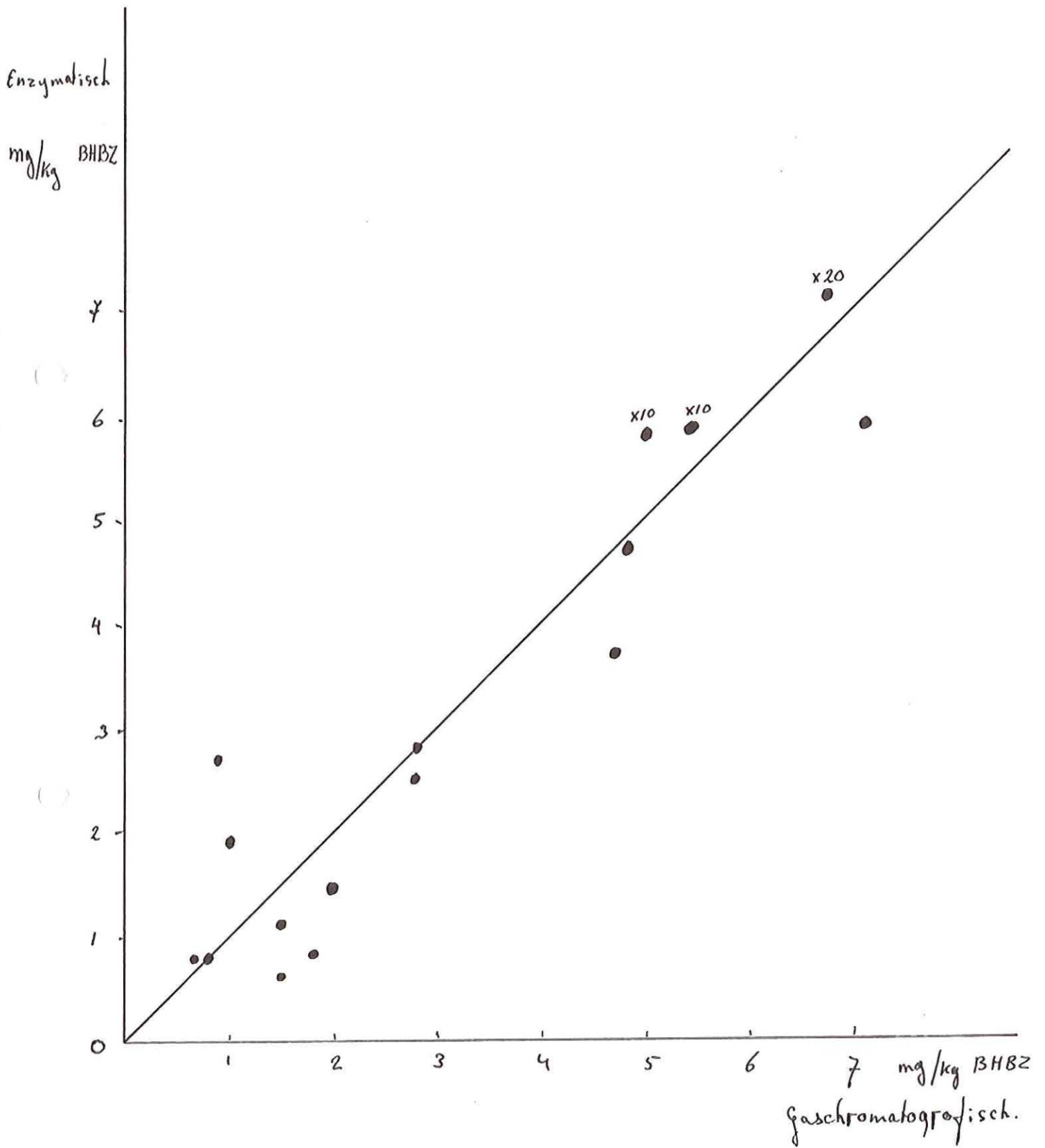
Grafiek 6. Standaardadditie - Gemiddelde regressielijn
(Gaschromatografie)



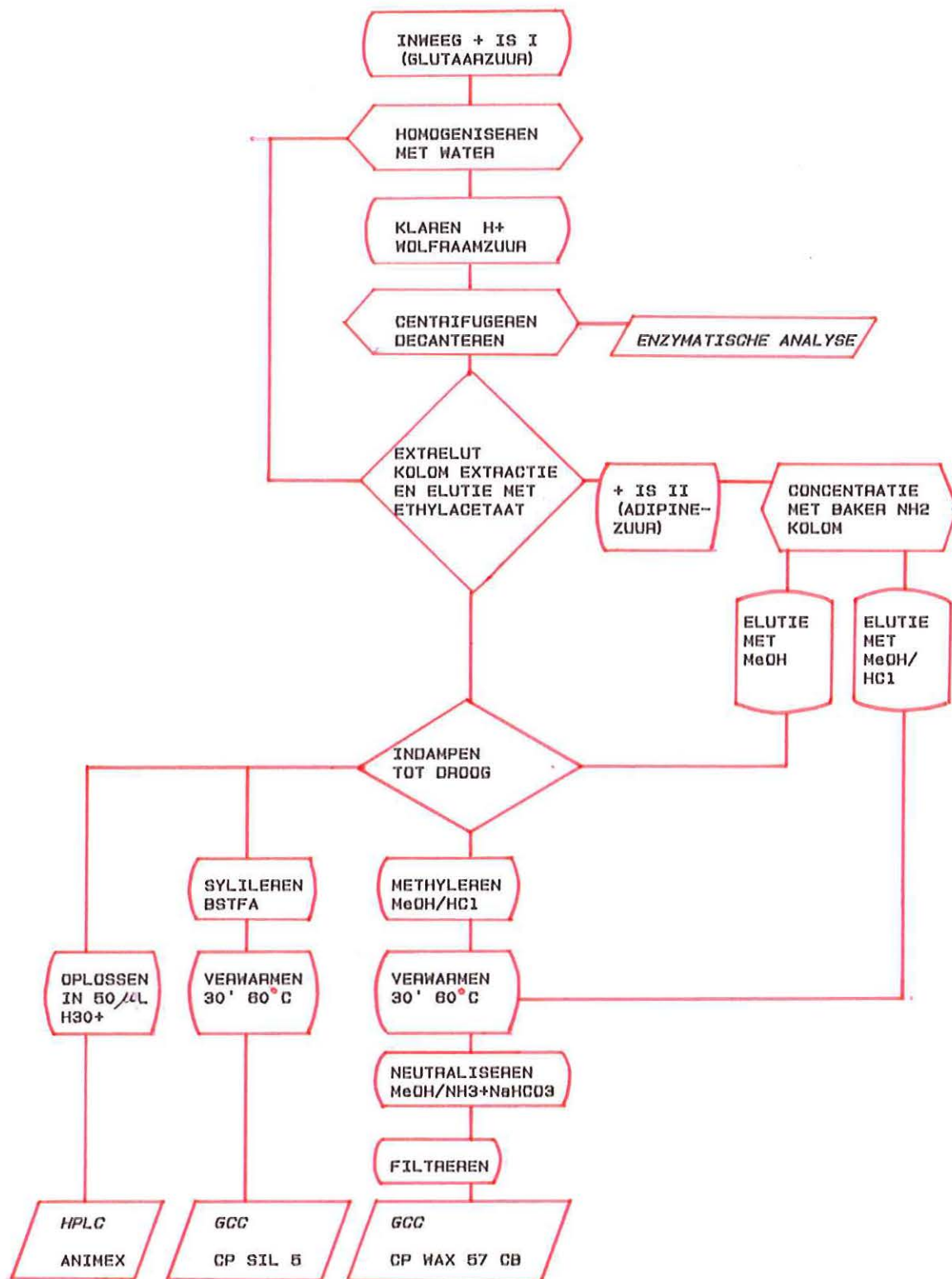
BHEZ 1984

:::::::::: DATA OVERLAP

Grafiek 7. Correlatiediagram



Correlatiediagram enzymatische analyse versus gaschrom.



Methode voor de bepaling van β -hydroxyboterzuur in eieren

Werkwijze:

- 25 gram ei in 250 ml bekerglas afwegen
- 10 ml glutaarzuurop. (IS) toevoegen 0,2 mg GZ/10 ml H₂O
- 50 ml water toevoegen
- 2 minuten roeren op magneetroerder
- 20 ml zwavelzuur 4N toevoegen
- 2 minuten roeren op magneetroerder
- 40 ml fosforwolfraamzuur toevoegen
(fosforwolfraamzuur: 10 g per 100 g water)
- 5 minuten krachtig roeren op magneetroerder
- suspensie overgieten in 2 centrifugebuizen van 80 ml
- 10 minuten centrifugeren bij 5000 toeren/min
- heldere bovenlaag overgieten over vouwfilter in erlenmeyer
(centrifugebuis niet nawassen!!!)
- 20 ml van filtraat op een extrelut-kolom brengen en 15 min laten in-
werken, elueren met 160 ml ethylacetaat (4 x 40 ml)
- eluens opvangen in een kolf van 250 ml met ingeslepen stop
- indampen aan rotavapor bij 40°C
- overspoelen met ethylacetaat in een reageerbuis met ingeslepen stop
- 2 ml adipinezuuroplossing (IS) toevoegen 0,05 mg AZ/5 ml et.ac.
- oplossing in reageerbuis indampen aan rotavapor bij 40°C

monster is nu klaar voor methylering.

Methylering

- 1 ml methanolische zoutzuurop. toevoegen aan het extract (methano-
lische zoutzuurop.: zoutzuurgas leiden door methanol totdat een
sterkte is verkregen van 2 mol/l) zie bijlage A
- reageerbuis goed afsluiten en 30 minuten in een droogstoof zetten
bij 60°C
- reageerbuis afkoelen onder koud stromend water
- 0,25 ml methanolische ammoniak toevoegen
(methanolische ammoniakopl.: ammoniakgas leiden door methanol totdat
een sterkte is verkregen van 5 mol/l) zie bijlage B

- spatelpunt natriumhydrogeencarbonaat toevoegen
- krachtig de reageerbuis schudden
- door acrodisc cartridge CR 0,45 µm filtreren

monster gereed voor GC analyse (1 µl inspuiten).

Totale duur van de analyse ca. 2¹/₂ uur.

Berekening:

$$\text{ppm BHBZ} = \frac{\text{opp BHBZ}}{\text{opp Glu}} \cdot \frac{\text{mg Glu}}{\text{mg ei (gr)}} \cdot \text{KfBHBZ/Glu} \cdot 1000$$

$$\text{KfBHBZ/Glu} = \frac{\text{opp Glu}}{\text{opp BHBZ}} \cdot \frac{\text{mg BHBZ}}{\text{mg Glu}}$$

$$\text{Recover} = \frac{\text{opp Glu}}{\text{opp AZ}} \cdot \frac{\text{mg AZ}}{\text{mg Glu}} \cdot \text{KfGlu/AZ} \cdot \frac{145}{20} \cdot 100$$

$$\text{KfGlu/AZ} = \frac{\text{opp AZ}}{\text{opp Glu}} \cdot \frac{\text{mg Glu}}{\text{mg AZ}}$$

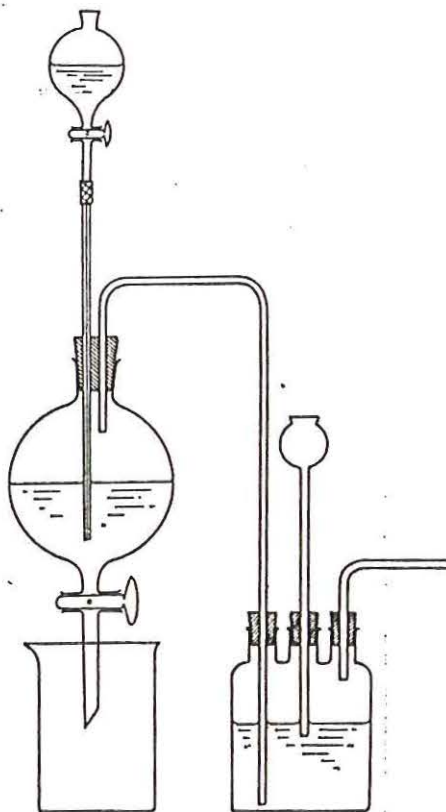
Bereiding van een zoutzure methanoloplossing.

Leid gedurende ca. 30 min zoutzuurgas door methanol. Zoutzuurgas is te genereren door voorzichtig geconcentreerd zoutzuur te druppelen bij geconcentreerd zwavelzuur. Het ontstane zoutzuurgas wordt door geconcentreerd zwavelzuur geleid als wasvloeistof en doorgeleid door methanol.

Uit de gewichtstoename van de methanoloplossing is de zoutzuurconcentratie te berekenen. Deze dient ca. 2 mol/l te zijn (toename van 7,5 gr per 100 ml).

150 ml H_2SO_4 en 100 ml HCl leveren ca. 32 gr HCl gas.

Apparatuur:

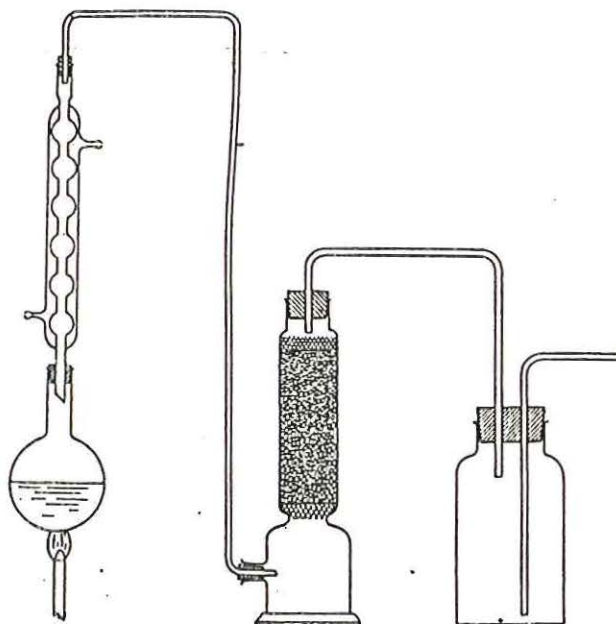


Bereiding van een ammoniakale methanoloplossing.

Leid gedurende ca. 45 min ammoniakgas door methanol.

Ammoniakgas is te genereren door een geconcentreerde ammoniakoplossing te verhitten onder reflux en het gas te drogen door doorleiden door ongebluste kalkbrokjes. Het doorleiden dient zolang te geschieden dat uit de gewichtstoename van de methanoloplossing een ammoniacconcentratie van ca. 5 mol/l wordt berekend (toename van 8,5 gr per 100 ml).

Apparatuur:



4.1 Conditities: GCC

Gaschromatograaf: Varian 3700.

Kolom : CP Wax 57 CB fused silica
20 meter
diameter binnen 0,22 mm.

Injektor : 280°C.

Detektor : FID 280°C.

Druk : 1,0 atm.

Splitverhouding : 1:7 (7 ml/min).

Verzwakker : 4×10^{-12} .

Kolomtemperatuur: 10 min isotherm 70°C
gradient 35°C/min naar 200°C
10 min isotherm 200°C.

Recorder : Kipp 1 mV.

Papiersnelheid : 1 cm/min.

Injektie Volume : 1 µl.

Draaggas : Helium.

Dataverwerking : Spectra Physics SP 4000.

4.1 Conditities: GCC

Gaschromatograaf: Varian 3700.

Kolom : CP Sil 5 fused silica
25 meter
diameter binnen 0,32 mm.

Injektor : 50°C gradient 120°/min naar 220°C
60 min isotherm 220°C.

Detektor : FID 250°C.

Flow : 1,5 ml/min.

Splitless : On Column.

Verzwakker : 4×10^{-11} .

Kolomtemperatuur: 3 min isotherm 50°C
gradient 3°C/min naar 220°C.

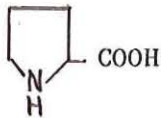
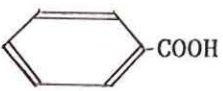
Recorder : Kipp 1 mV.

Papiersnelheid : 1 cm/min.

Injektie Volume : 1 µl.

Draaggas : Helium.

Dataverwerking : Spectra Physics SP 4000.

Brutoformule	Molgew.	Triviaalnaam	Struktuurformule	Systeembenaming
$C_3H_6O_3$	90	<u>melkzuur</u>	$\begin{array}{c} OH \\ \\ C-C-COOH \end{array}$	2 OH propionzuur
$C_3H_4O_3$	88	<u>pyrodruivenzuur</u>	$\begin{array}{c} O \\ \\ C-C-COOH \end{array}$	2 keto propionzuur
$C_4H_8O_3$	104	<u>3 OH boterzuur</u>	$\begin{array}{c} OH \\ \\ C-C-C-COOH \end{array}$	
$C_4H_4O_4$	116	<u>Fumaarzuur</u>	$HOOC-C \equiv C-COOH$	2 ethyleendicarb.zuur
$C_4H_6O_4$	118	<u>barnsteenzuur</u> = succinezuur	$HOOC-C-C-COOH$	1.4 butaandicarb.zuur
$C_4H_6O_5$	134	<u>Appelzuur</u> = malonzuur	$\begin{array}{c} OH \\ \\ HOOC-C-C-COOH \end{array}$	hydroxysuccinezuur
$C_6H_8O_7$	192	<u>citroenzuur</u>	$\begin{array}{c} OH \\ \\ C - C - C \\ \quad \quad \\ COOH \quad COOH \quad COOH \end{array}$	2 OH 1-2-3 propaantricarb.z.
$C_5H_7NO_3$	129	<u>proline</u> = pyrolidinecarb.z.		2 pyrolidine 5 carboxylzuur
$C_6H_{10}O_4$	146	<u>adipinezuur</u>	$HOOC-C-C-C-C-COOH$	1.4 butaan dicarboxylzuur
$C_5H_8O_4$	132	<u>glutaarzuur</u>	$HOOC-C-C-C-COOH$	1.3 propaandicarboxylzuur
$C_4H_6O_6$	150	<u>wijnsteenzuur</u>	$\begin{array}{c} OH \quad OH \\ \quad \\ HOOC-C-C-COOH \end{array}$	2.3 di OH succinezuur
$C_2H_4O_2$	60	<u>azijnzuur</u>	CH_3-COOH	
$C_7H_6O_2$	122	<u>benzoëzuur</u>		
$C_6H_8O_2$	112	<u>sorbinezuur</u>	$CH_3-C \equiv C-C \equiv C-COOH$	2 propenyl acrylzuur