

Afdeling SERH

Datum: 1984-06-01

RAPPORT 84.58

Pr.nr. 505.0200

Onderwerp: Bepaling van toegevoegd nicotinezuur in vlees.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH (4x),
afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer, projekt-
leider, afd. Additieven (2x)

Afdeling SERH

Datum: 1984-06-01

RAPPORT 84.58

Pr.nr. 505.0200

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

Onderwerp: Bepaling van toegevoegd nicotinezuur in vlees.

Bijlage: Intern Analysevoorschrift A 349.

Doel:

Het verbeteren van een polarografische methode voor de bepaling van nicotinezuur in vlees.

Samenvatting

Bij het opsporen van de volgens de Warenwet verboden toepassing van nicotinezuur in vlees (verbetering houdbaarheid van de kleur) wordt o.a. gebruik gemaakt van een polarografische methode.

In vlees bevindt zich van nature geen nicotinezuur. Wel nicotinezuuramide, een stof, die bij de polarografie op vrijwel dezelfde plaats als nicotinezuur een piek geeft.

Bij de extractie uit het vlees met 0,1 N HCl of 0,1 M citroenzuur blijkt in tegenstelling tot eerdere aannamen het nicotinezuuramide niet omgezet te worden in nicotinezuur.

Op grond daarvan leidt een totaal bepaling van nicotinezuur + "omgezet nicotinezuuramide" d.m.v. een additie van nicotinezuur tot foutieve meetresultaten.

In dit onderzoek is de omzetting van het nicotinezuuramide in nicotinezuur m.b.v. extremere middelen bestudeerd. De omzetting op zich was hiermee geen probleem, maar door de vorming van storende stoffen bleek het niet mogelijk het totaal-gehalte voldoende nauwkeurig te meten. Met gebruikmaking van een oppervlakactieve stof is het wel mogelijk gebleken, bij een zodanige pH te meten, dat de polarografische eigenschappen van het nicotinezuur en het nicotinezuuramide vrijwel gelijk zijn. Op grond hiervan is een bepalingsmethode opgesteld, die gebaseerd is op een additie met een gemengde standaard van nicotinezuur en nicotinezuuramide.

Bij een vergelijkend onderzoek met een methode gebaseerd op HPLC scheiding met UV detectie werd een goede overeenkomst gevonden.

Conclusie:

Met de voorgestelde methode is het mogelijk het totaalgehalte aan nicotinezuur en nicotinezuuramide in vlees te bepalen. Aangezien de toevoeging van nicotinezuur aan vlees alleen zinvol is bij grotere hoeveelheden, zodat in de totaal bepaling het aandeel van het nicotinezuur minstens gelijk is t.o.v. het nicotinezuuramide, is het zeer goed mogelijk met deze snelle methode een uitspraak te doen over de aanwezigheid van toegevoegd nicotinezuur.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig *R*

Medewerker/samensteller: ing. P. Kienhuis *P. Kienhuis*

Projectleider: ir P. Hollman *PH*

1. Inleiding

In 1981 werd het gebruik van nicotinezuur (NZ) in vlees als kleurbehoudend middel in de Warenwet verboden. Daarvoor was een toevoeging tot max. 15 mg/kg toegestaan.

Nicotinezuur (NZ) kan op verschillende manieren bepaald worden: nl. polarografisch, spectrofotometrisch, gaschromatografisch, vloeistofchromatografisch en met dunnelaagchromatografie.

In de Ware(n) Chemicus zijn meerdere artikelen verschenen over de bepaling van nicotinezuur, waaronder een polarografische methode (1).

Nu bevat vlees van nature ($\pm$ 30 tot 70 mg/kg) nicotinezuur (NZ) in een gebonden vorm en wel als nicotinezuuramide (NZA) en aanverwante verbindingen. De stof is nl. een belangrijke bouwsteen voor tal van verbindingen, die een belangrijke rol spelen in het lichaam, zoals de coënzymen NAD (nicotine-amide-adenine-dinucleotide) en NMN (nicotine-amide mononucleotide).

Bij de polarografische methode in (1) wordt er van uitgegaan, dat bij een extractie uit vlees met 0,1 N HCl een deel van het NZ wordt vrijgemaakt uit zijn verbindingen en als zodanig meebepaald.

Dit lijkt mede bevestigd te worden door het feit dat de piek gemeten in het extrakt (van vlees zonder toegevoegd NZ) verhoogd is na een additie van een NZ standaard. (Een additie van NZ aan een NZA standaard levert een dubbele piek op.) De berekening van het totaalgehalte geschiedt m.b.v. een standaardadditie van NZ. Omdat de toevoeging van NZ alleen zinvol is bij grotere hoeveelheden, kon ook na aftrek van een enigszins variërend natuurlijk gehalte een betrouwbare uitspraak gedaan worden.

Uit literatuur (2, 3) en eigen experimenten (zie 3.1) blijkt echter, dat er geen omzetting naar NZ plaats vindt, maar dat het NZA zelf de vleesextraktpiek veroorzaakt. Het gevolg is, dat verschillende stoffen samen een meetsignaal veroorzaken, terwijl het totaalgehalte wordt berekend m.b.v. een additie van één van hen.

Naar aanleiding van deze feiten is er een onderzoek gedaan naar de polarografische eigenschappen van het nicotinezuur (NZ) en het nicotinezuuramide (NZA), om zodoende tot een betere bepalingsmethode te komen.

2. Apparatuur

De navolgende experimenten zijn uitgevoerd met een Metrohm E 506 en E 505, met een DME als werkelektrode, een Ag/AgCl/3M KCl referentie elektrode en een platina tegenelektrode. De metingen worden opgenomen m.b.v. differential pulse polarografie met een puls amplitude van -25 mV. Er wordt gescand van -0,8 V $\rightarrow$ -1,4 V.

Een nadere omschrijving van de apparatuur wordt vermeld in bijgaand analysevoorschrift.

3. Experimenteel

3.1 pH gevoeligheid.

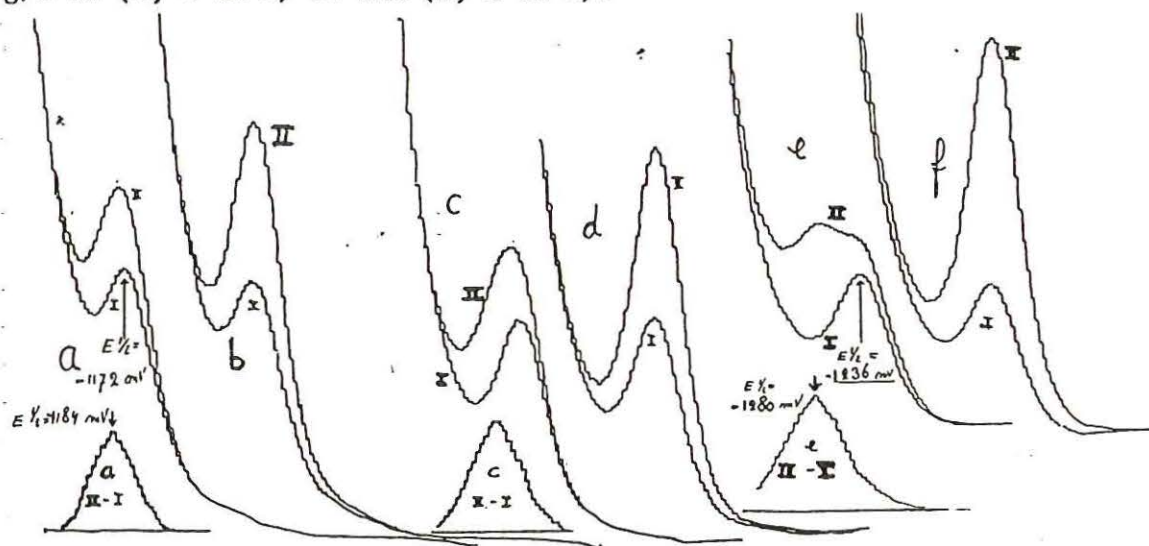
Om te bewijzen dat bij een extractie met 0,1 N HCl het van nature aanwezige NZA niet wordt omgezet in NZ is de volgende proef uitgevoerd: 5 gram gehakt (dit monster bevat geen toegevoegd NZ) wordt geëxtraheerd met 0,1 N HCl. Het extract wordt vervolgens met 0,1 N HCl aangevuld tot 100 ml.

Na centrifugeren worden 2 frakties van 5 ml direct gepolarografeerd (pH = 1,5). Dit zijn de polarogrammen a en b in fig. 1.

Aan 2 andere frakties van 5 ml (c en d) wordt 4 N NaOH toegevoegd tot pH = 3.

Aan 2 derde frakties van 5 ml (e en f) is eerst 0,1 ml 1 M citroenzuur toegevoegd en vervolgens zijn ze met 4 N NaOH op pH = 3 gebracht.

De lijnen I in fig. 1 vertegenwoordigen de vleesextracten. Aan de verschillende extracties is steeds een additie toegevoegd van 0,1 ml 0,1 g/l NZ (a, c en e) of NZA (b, d en f).



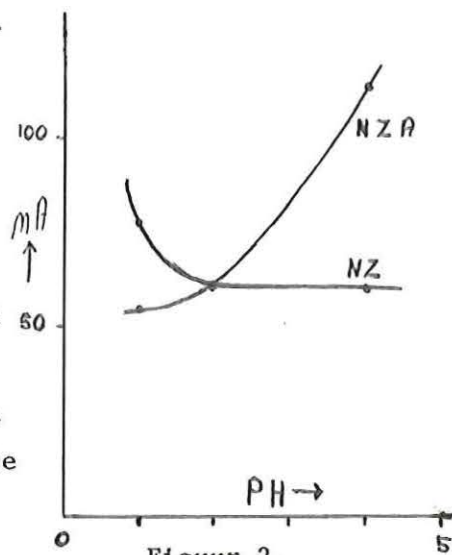
Figuur 1.

Deze addities worden weergegeven met de lijnen II. Tenslotte is ter verduidelijking het verschil tussen de lijnen I en II bij a, c en e vermeld.

Uit de resultaten is te zien, dat bij a de NZ additiepiek vrijwel boven de extraktpiek ligt. Dit wordt al anders bij c, terwijl bij e zeer duidelijk te zien is, dat de NZ additie geheel naast de extraktpiek valt. Bij de NZA addities daarentegen, blijft de piek in lijn II steeds boven de piek in lijn I. Hiermee wordt duidelijk aangetoond, dat de monsterpiek niet wordt veroorzaakt door NZ, dat vrijgekomen is tijdens de extraktie, maar door NZA.

Bij de resultaten in fig. 1 valt tevens op, dat de piekverhoging ten gevolge van de additie verschillend is bij NZ en NZA. Ter ondersteuning hiervan zijn standaarden bij verschillende pH's gepolarografeerd met als resultaat fig. 2.

Bij addities aan monsterextrakten is de situatie enigszins verschoven (het snijpunt ligt bij pH 1) maar dit varieert per extrakt en vleessoort. Uit fig. 2 blijkt duidelijk, dat vooral bij hogere pH's een berekening van het totaal gehalte op basis van een NZ additie tot te hoge meetwaarden leidt.



Figuur 2.

3.2 Omzetting NZA naar NZ.

Het voorgaande probleem kan opgelost worden door alsnog het aanwezige NZA om te zetten in NZ.

Deze omzetting kan zowel in sterk zuur als in sterk basisch milieu plaats vinden (2;5).

3.2.1 De basische omzetting.

Een standaard van NZA is opgelost in 2 N NaOH bij $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Na een half uur is de oplossing aangezuurd met een mengsel van 1 M citroenzuur en 4 N HCl tot pH 3. Het citroenzuur wordt toegevoegd, omdat het de standaarden zover uit elkaar trekt, dat de NZ piek vrijwel naast de NZA piek ligt.

Bij vleesextraktie is dit jammer genoeg niet mogelijk, omdat de vleesmatrix dit effect tegengaat. (Vergelijk c en e fig. 1.)

Het resultaat van de NaOH behandeling is, dat vrijwel alle NZA is omgezet naar NZ.

Bij monsters gebeurt dit echter maar voor een deel, maar het grootste probleem is het feit, dat de extraktie slecht verloopt door het neerslaan van diverse stoffen (o.a. eiwitten).

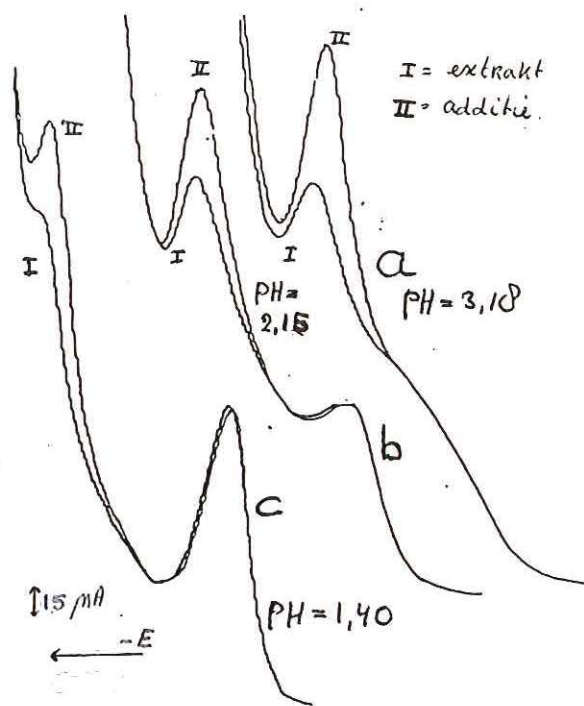
Op grond hiervan is ook afgezien van de optie om in basisch gebied te meten. Volgens (4) kan NZA en NZ nl. als som bepaald worden bij pH 8-9, terwijl het NZA apart te bepalen is bij pH = 13.

Vervolgens is 5 gram vlees in 25 ml 2 N NaOH verwarmd tot 95°C gedurende een half uur. Het vlees gaat vrijwel geheel in oplossing. Na afkoelen en aanzuren tot pH = 3 ontstaat er een vetlaag, die afgecentrifugeerd wordt.

Er blijkt zeer veel NZ gevormd te zijn, veel meer dan bij een zure extraktie aan NZ en NZA samen (+ een faktor 10). Blijkbaar wordt uit veel extra verbindingen NZ vrijgemaakt en meebepaald. Dit wordt o.a. ook vermeld door (6). Het is niet zinvol om deze methode toe te passen, omdat de matrix zo'n grote piek veroorzaakt, dat een eventuele toevoeging van NZ erbij in het niet valt.

3.2.2 De zure omzetting.

De zure omzetting van standaarden in 2 N H_2SO_4 vindt pas volledig plaats bij een temperatuur van 120°C in de autoclaaf, gedurende een half uur. Een half uur bij 90°C veroorzaakt slechts een gedeeltelijke omzetting van NZA naar NZ. Bij monsters vindt ook een volledige reactie van NZA naar NZ plaats bij 120°C. Het meetniveau komt overeen met de waarde, die verkregen wordt na een extraktie met 0,1 N HCl. Tijdens de hydrolyse vindt er echter vorming plaats van een component, die de eindbepaling sterk stoort (fig. 3).



Figuur 3.

a en c: additie van NZA

b: additie van NZ

In figuur 3a bevindt de storende piek zich onder de gevormde NZ piek (het monster bevatte voor de hydrolyse geen NZ, aan de NZA additie is te zien dat er NZ gevormd is).

Bij 3c is dit niet meer het geval, maar hier ligt de NZ zo dicht tegen de H^+ lijn, dat er niet meer verantwoord te meten valt.

Het bovenstaande geldt zowel voor een hydrolyse met als zonder ureum (2).

Een poging om m.b.v. Sep-pak kolommetjes de stoorkiek te verwijderen, leverde een negatief resultaat op.

3.3 Meting bij verschillende pH's.

Uit proeven met standaarden is gebleken dat de NZA geheel anders reageert op de pH, dan de NZ (fig. 2).

Omdat de verschillen zo groot zijn, is gekeken naar de mogelijkheid om gebruik te maken van deze eigenschappen. Door te meten bij pH 2 en pH 4 zou het nl. mogelijk moeten zijn uit de toename van de meetwaarde van het monster het gehalte aan NZ en NZA afzonderlijk te berekenen. Daartoe is een monster zonder NZ geëxtraheerd met 0,1 N HCl. Na centrifugeren zijn frakties van het extrakt op pH gebracht met NaOH 4 N. Na volumekorrektie van zowel de toevoeging van NaOH als van NZA en NZ zijn de volgende resultaten verkregen.

Tabel 1.

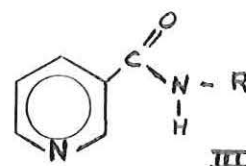
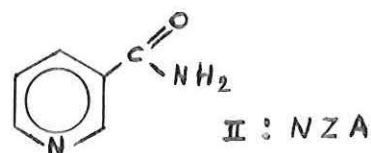
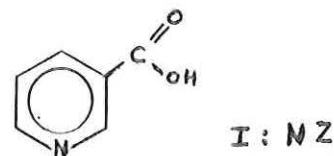
pH	E 1/2 in mV	Extrakt in nA	NZ additie toename in nA	NZA additie toename in nA
2	-1180	61,5	54	66
3	-1232	61,5	48	85,5
4	-1264	66,0	52,5	106

Additie met 0,1 ml NZA of NZ 0,1 g/l

Meetoplossing = 5 ml

Uit de toenamen veroorzaakt door de addities komt eenzelfde patroon als bij de standaarden in fig. 2 naar voren. De extrakten op zich vertonen echter een afwijkend gedrag.

Uit de meetresultaten daarvan zou haast geconcludeerd kunnen worden, dat alle NZA is omgezet naar NZ. Dit wordt echter duidelijk tegengesproken door de voorgaande experimenten. Een verklaring zou gevonden kunnen worden in het feit, dat het van nature aanwezige NZA aanwezig is in de vorm van III, terwijl de addities in de vorm van II plaatsvinden. Gezien het verschil in pH gevoeligheid tussen I en II is het ook niet onwaarschijnlijk, dat iets dergelijks gebeurt tussen II en III. In ieder geval is het op grond van bovenstaande resultaten niet mogelijk op het meten bij verschillende pH's een methode te baseren.

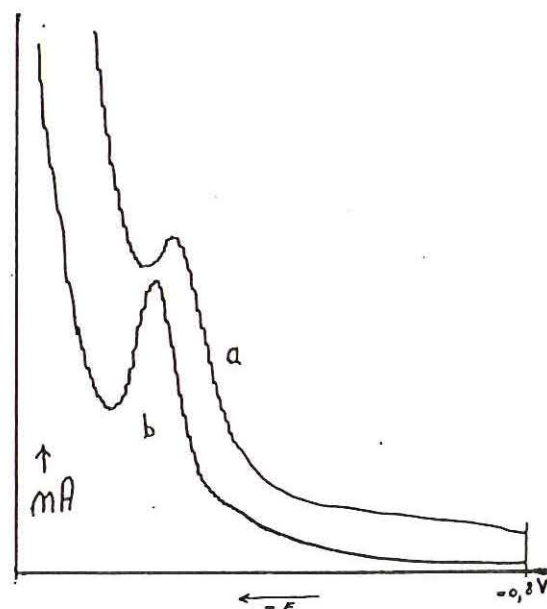


3.4 De toepassing van oppervlak actieve stoffen.

Bij het opmeten van standaarden, monsters uit de autoclaaf en extrakten verkregen na een NaOH behandeling bij 90°C is gebruik gemaakt van triton x-100 (0,1 ml 5% opl per 5 ml extrakt) als maximum onderdrukker.

Bij het opmeten van vleesextrakten treedt er geen maximum op, zodat toevoeging ervan tot nu toe achterwege is gelaten. Ook in (1) wordt het niet gebruikt. Toch blijkt de toepassing van een oppervlak actieve stof een groot effect te hebben op zowel de H^+ lijn als de monsterpiek (fig. 4).

Bij het uitproberen van verschillende concentraties Brij 35 en triton x-100, blijkt een concentratie van 1,5% Brij de beste resultaten op te leveren bij een toevoeging van 0,1 ml aan 5 ml vleesextrakt.



Figuur 4.

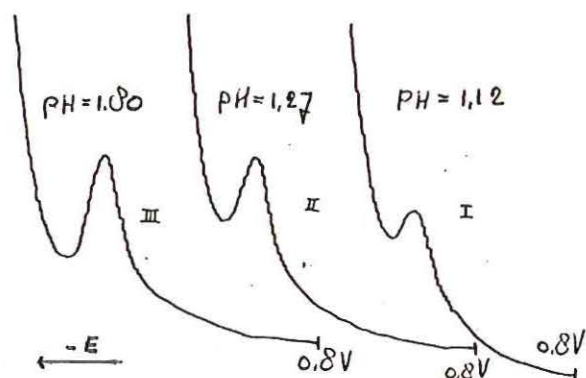
5 ml vleesextrakt in 0,2 N HCl
+ 0,1 M NaH_2PO_4 pH = 1,27
a) zonder Brij
b) met Brij 1,5% 0,1 ml

Uit fig. 2 is gebleken dat het meten bij een lage pH de mogelijkheid biedt dat NZ en NZA vrijwel eenzelfde piekhoogte veroorzaken bij een gelijke concentratie. Bij vleesextrakten ligt dit snijpunt bij ong. pH = 1. Zonder de toevoeging van Brij 35 is het niet mogelijk hier te meten, omdat de NZ piek daar vrijwel geheel opgaat in de H^+ lijn (ontleding $H^+ \rightarrow H_2$).

De toepassing van Brij 35 biedt echter de mogelijkheid om dit meetgebied nader te onderzoeken. Daartoe zijn extrakten gemaakt (met een inweeg van ± 5 g rundergehaakt $\rightarrow$ naar 100 ml) in de volgende bufferoplossingen: I : 0,1 N HCl + 0,1 M NaH_2PO_4
II : 0,1 N HCl + 0,1 M NaH_2PO_4
III: 0,1 N HCl + 0,1 M NaH_2PO_4

De NaH_2PO_4 wordt toegevoegd voor zijn bufferende werking. De eind pH bij een 0,1 N HCl extractie kan nl. nogal variëren bij verschillende vleessoorten. Voor het resultaat zie fig. 5.

De gemiddelde additiewaarden bij deze meetomstandigheden waren als volgt.



figuur 5.

Tabel 2.

Oplossing	Toename na NZ additie in nA	Toename na NZA additie in nA
I	66	73,5
II	63,5	73,5
III	58,5	76,5

In combinatie met fig. 5 en bovenstaande tabel is gekozen voor II als extraktievloeistof.

Bij I ligt de piek nog te veel in de H^+ lijn, terwijl de additiever- schillen tussen I en II niet groot zijn.

Bij III is het verschil tussen de addities van NZ en NZA al een stuk toegenomen, met alle nadelen van dien.

3.5 IJklijntest in blanco en vleesextract.

Met de voorheen gekozen meetomstandigheden is een ijklijntest (meerdere addities aan een vlees extract) uitgevoerd in 2 monsters en in de extraktievloeistof (blanco).

De meetresultaten zijn uitgedrukt in nA piekhoogte. De meetomstandigheden zijn zoals in bijliggend werkvoorschrift vermeld. De addities zijn gecorrigeerd naar een volume van 5,1 ml.

Tabel 3.

	7,7 g gehakt → 100 ml 5 ml + 0,1 ml Brij 1,5% pH = 1,26				4,9 g runderlap → 100 ml 5 ml + 0,1 ml Brij 1,5% pH = 1,25				0,2 N HCl + 0,1 M NaH ₂ PO ₄ + Brij pH = 1,15	
Meetw. extrakt	83	86	83	86	71	72	75	68	0	0
Additie van 0,1 ml 0,1 g/l	NZ	NZ	NZA	NZA	NZ	NZ	NZA	NZA	NZ	NZA
	147	147	150	158	144	135	150	137	71	57
	210	216	224	234	224	204	225	215	146	116
	273	287	302	308	294	264	302	285	219	180
							336		291	242
gem. additie- toename	65,2		73,2		69,5		74		72,8	60,6

De toename per additie vertoont geen neiging om af of toe te nemen bij meerdere addities boven op elkaar. De ijklijn is blijkbaar recht in het onderzochte meetbereik. Wel is de toename per vleessoort verschillend, waaruit de noodzaak van het werken met standaardadditie blijkt. Opvallend is het feit, dat bij de blanco de NZA lager uitvalt dan de NZ addities, dit in tegenstelling met de monsters. Wel komen de meetresultaten van de blanco goed overeen met die van fig. 2.

Het verschil tussen de NZA en NZ addities is acceptabel. De toenamen t.g.v. de addities variëren soms in vrij grote mate. Op grond daarvan is besloten tot de volgende bepalingsmethodiek:

Bij de bepaling van het gehalte in een onbekend monster zal de standaardadditie 2 keer per 5 ml vleesextract uitgevoerd worden met een standaardmengsel van 1 op 1 NZA en NZ.

Omdat een toevoeging van NZ aan vlees alleen zinvol is bij hoeveelheden die minstens in de buurt liggen van de hoeveelheid NZA, die gevonden wordt na een zure extractie, wordt door gebruik te maken van een gemengde standaard een betrouwbaar gehalte verkregen.

De 2 additiewaarden, die per extract verkregen worden mogen daarbij niet te veel van elkaar afwijken, anders moet een herhaling met een ander deel van het extract worden uitgevoerd.

4. Vergelijkend onderzoek

De ontwikkelde methode is vergeleken met een in ontwikkeling zijnde HPLC methode gebaseerd op een alcoholextractie (8). Daartoe zijn in totaal 7 monsters van verschillende slagers onderzocht.

Aan monster nr. 1 zijn de volgende toevoegingen gedaan:

1 = zonder toevoeging

1 A = + 25 mg NZ/kg

1 B = + 50 mg NZ/kg

1 C = + 100 mg NZ/kg.

De monsters zijn gehomogeniseerd en binnen een paar dagen in duplo geanalyseerd.

De gemiddelde meetresultaten zijn als volgt.

Tabel 4.

Nummer	Monster	HPLC		Polarografie	
		in mg/kg	%	in mg/kg	%
1	gehakt h.o.h.	40		43	
1 A		66,5	106	64	84
1 B				93	100
1 C				143	100
2	gehakt h.o.h.	39		38	
3	gehakt h.o.h.			189	
4	gehakt rund	36,3		39	
5	gehakt rund			209	
6	gehakt gekruid	17		25	
7	hamburger			204	

De meetwaarden voor lage gehalten komen goed met elkaar overeen. De monsters met veel toegevoegd NZ komen bij de HPLC methode te laag uit. (Naar aanleiding daarvan zal de HPLC methode qua extractie aangepast worden. Mede op grond daarvan zijn de hoge resultaten niet vermeld). De monsters 3, 5 en 7 zijn afkomstig van dezelfde slager, die duidelijk NZ gebruikt.

De nummers 1, 2 en 4 vertonen een gehalte, dat van nature aan NZA aanwezig is.

Nummer 6 tenslotte vertoont een zeer lage meetwaarde. Het monster bevatte dan ook zeer veel vet.

Uit bovenstaande meetwaarden kan geconcludeerd worden dat de ontwikkelde methode betrouwbaar is.

5. Discussie

Uit het onderzoek is een bepaling naar voren gekomen die in zoverre een verbetering is t.o.v. (1), dat door de toepassing van Brij 35 een betere scheiding van de piek t.o.v. de H^+ lijn is verkregen. Het feit, dat bewezen is dat de NZA niet omgezet wordt is praktische in zoverre van belang, dat indien er sprake is van een toevoeging van NZ, er een waarde berekend kan worden die beter met het totaal aanwezige gehalte aan NZ en NZA overeenkomt.

Een belangrijk feit is wel de kennis, dat het meten bij een hogere pH zeker tot fouten leidt, omdat de eigenschappen van het NZA en het NZ dan te veel uit elkaar gaan lopen.

Het grootste nadeel van de bepaling is, dat ook nu een som verkregen wordt van het van nature aanwezige NZA en het eventueel toegevoegde NZ. Omdat het natuurlijke gehalte nogal varieert, is het niet mogelijk een nauwkeurig NZ gehalte te berekenen. Nu is dit bezwaar gezien het doel van deze bepaling, niet erg groot. Het is nl. alleen maar zinvol NZ toe te voegen in hoeveelheden, die minstens overeenkomen met het natuurlijke gehalte aan NZA, om het tegenhouden van verkleuring te verhinderen. Binnen dit kader is dit een betrouwbare methode die weinig tijd vraagt voor zowel opwerking als meting.

6. Conclusie

Met de voorgestelde methode is het mogelijk het totaalgehalte aan NZ en NZA in vlees te bepalen. Aangezien de toevoeging van NZ aan vlees alleen zinvol is bij grotere hoeveelheden, is het zeer goed mogelijk met deze snelle methode een uitspraak te doen over de aanwezigheid ervan.

7. Literatuur

1. H. Koenders en G. Haken.
Ware(n) Chemicus, 6 (1976) 49-54.
2. R. Roy en J. Merten.
J.A.O.A.C. vol. 66, no. 2, 1983, blz. 291.
3. E. Jacobsen en K. Thorgersen.
Analytica Chimica Acta, 71 (1974) 175-184.
4. J. Lindquist en S. Farroha.
Analyst, vol. 100, 1975, blz. 377-385.
5. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. (1980) 13th Ed. sec. 43.044.
6. K. Kral.
Fres. Z. Anal. Chem. 1983, nr. 314, blz. 479-482.
7. RIKILT-verslag 82.93.
8. Intern verslag in voorbereiding bij de afdeling Additieven.

RIJKS-KWALITEITSINSTITUUT VOOR
LAND- EN TUINBOUWPRODUKTEN
WAGENINGEN

Afdeling Spectroscopie/Electrochemie/Radio-aktiviteit/Hormonen

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 349

1e oplage (1984-06-01)

VLEES - BEPALING VAN NICOTINEZUUR - POLAROGRAFISCH

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling SERH (4x).
afd. Additieven

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 349

1e oplage (1984-06-01)

Vlees - Bepaling van nicotinezuur - Polarografisch

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Dit voorschrift beschrijft een methode om m.b.v. differentiaalpulspolarografie te bepalen of er nicotinezuur is toegevoegd aan vlees en vleesprodukten.

2. Beginsel

Aan een afgewogen hoeveelheid (gemalen) vleesmonster wordt een hoeveelheid bufferoplossing toegevoegd. Na homogeniseren wordt de suspensie met buffer aangevuld tot een bekend volume (pH = 1,25). Na centrifugeren wordt een aliquot deel van het aldus verkregen vleesextract gepolarografeerd.

Het totaal gehalte aan nicotinezuur (toegevoegd) en nicotinezuuramide (natuurlijk gehalte) wordt bepaald m.b.v. standaardadditie.

Na aftrek van het nicotinezuuramidegehalte wordt het nicotinezuurgehalte verkregen.

3. Apparatuur

3.1 Bovenweger.

3.2 Homogenisator (b.v. Sorvall Omnimixer).

3.3 Centrifuges b.v.:

3.3.1 Roty III van WKF max. 7.000 t/min.

3.3.2 Microrapid van Hettick max. 11.000 t/min.

3.4 Maatkolven 100 ml.

3.5 Trechters, pipetten, erlenmeyers.

3.6 Polarograaf, b.v. E 506, E 505 van Methrom.

4. Chemicaliën

4.1 Zoutzuur HCl 4 N (316 ml HCl gec./liter).

4.2 Natriumdihydrogenfosfaat-1-hydraat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a.

4.3 Bufferoplossing 0,2 N HCl + 0,1 M NaH_2PO_4 .

Weeg in een maatkolf van 1 liter 13,8 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4.2) af. Voeg toe 50 ml HCl 4 N (4.1) en vul aan met water.

4.4 Nicotinezuur $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ p.a.

4.4.1 Voorraadstandaard nicotinezuur 1 gram/liter.

Breng 100 mg nicotinezuur (4.4) in een maatkolf van 100 ml. Los op, vul aan en meng.

4.5 Nicotinezuuramide $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ p.a.

4.5.1 Voorraadstandaard nicotinezuuramide 1 gram/liter.

Breng 100 mg nicotinezuuramide (4.5) in een maatkolf van 100 ml. Los op, vul aan en meng.

4.6 Werkstandaard NZ-NZA (0,1 g/l).

Breng 5 ml nicotinezuuramide-oplossing (4.5.1) en 5 ml nicotinezuuroplossing (4.4.1) in een maatkolf van 100 ml. Vul aan en meng.

Opmerking:

De oplossingen 4.4.1, 4.5.1 en 4.6 zijn enigszins lichtgevoelig. Ze kunnen het beste in de koelkast bewaard worden.

4.7 Brij-35: Polyoxyethylenedodecylether.

4.7.1 Voorraadoplossing Brij-35 (30% oplossing).

Breng 30 gram Brij-35 in een maatkolf van 100 ml. Los op, vul aan en meng.

4.7.2 Werkoplossing Brij-35 (1,5% oplossing).

Breng 5 ml voorraadoplossing Brij-35 (4.7.1) in een maatkolf van 100. Vul aan en meng.

5. Werkwijze

5.1 Weeg ongeveer 5 gram vleesmonster precies af (3.1) in een erlenmeyer (of homogeniseervaatje behorende bij (3.2)). Voeg toe 10 tot 25 ml bufferoplossing (4.3) en homogeniseer gedurende 1 min.

5.2 Breng het fijngemalen vlees kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml m.b.v. een trechter. Vul aan met buffer (4.3) en meng.

5.3 Breng de inhoud van de maatkolf over in een grote centrifugebuis en centrifugeer gedurende 5 à 10 min bij het hoogste toerental (3.3.1). Breng het heldere middendeel ($\pm$ 20 à 30 ml) over in een erlenmeyer m.b.v. een pipet. Centrifugeer een fraktie van 7 à 8 ml in een centrifuge met een hoog toerental gedurende 15 min (3.3.2). Breng m.b.v. een pipet 5 ml precies van de heldere fraktie over in een polarografiecel. Bij vetarme monsters is het 2e deel van 5.3 als zuiveringsstap voldoende.

5.4 Voeg toe 0,1 ml Brij-35 1,5% oplossing (4.7.2).

5.5 Stel de volgende parameters in bij gebruik van de Methrohm E 506 en E 505 (werkelectrode DME, ref. electrode Ag/AgCl/3M HCl, tegen-electrode Pt).

Analytische techniek - diff. pulse (P) stand rapid.

U start	- -0,8 Volt
ΔU	- - 1 Volt
t drop	- 1 sec.
Gevoeligheid	- 1,5 nA
mm/t drop	- 1
pulse amplitude	- 25 mV.

5.6 Neem het polarogram op na gedurende 5 min N₂ doorgeleid te hebben (piekhoogte is h₁ (zie 6)).

5.7 Voeg 0,1 ml van de NZ-NZA standaard (4.6) toe. Leid 40 sec. N₂ door en neem opnieuw het polarogram op (piekhoogte is h₂).

5.8 Voeg opnieuw 0,1 ml standaard (4.6) toe. Leid 30 sec, N₂ door en neem het polarogram op (piekhoogte is h₃).

6. Berekening

De toename door de addities is na volumecorrectie naar 5,1 ml als volgt:

$$\text{eerste additie (5.7)} = h_2 \times \frac{5,2}{5,1} - h_1$$

$$\text{tweede additie (5.8)} = h_3 \times \frac{5,3}{5,1} - h_2 \times \frac{5,2}{5,1}$$

Het verschil tussen de addities moet minimaal zijn.

De gemiddelde additiewaarde wordt gebruikt bij de eindberekening.

Gehalte in het monster in mg/kg aan NZ + NZA:

$$\frac{h_1}{\text{Gem. additie}} \times \frac{200}{\text{inweeg}}$$

Teneinde het gehalte toegevoegd nicotinezuur te bepalen, moet gecorrigeerd worden voor het natuurlijke gehalte aan nicotinezuuramide, dat meebepaald wordt.

De concentratie nicotinezuuramide, uitgedrukt als nicotinezuur bedraagt:

Varkensvlees	40 - 87 mg/kg
Rundvlees	37 - 75 mg/kg
Kalfsvlees	64 - 80 mg/kg.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Samensteller : ing. P.G.M. Kienhuis 