

Afdeling AM 1984-09-11
RAPPORT 84.87 Pr.nr. 505.0200
Onderwerp: Kwantitatieve bepaling van
conserveermiddelen en saccha-
rine in huzarensalades.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. AM (4x),
afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Projektbeheer,
Projektleider (Hollman), sektormappen.

RAPPORT 84.87

Pr.nr. 505.0200

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

Onderwerp: Kwantitatieve bepaling van conserveermiddelen en saccharine in huzarensalades.

Doel:

De ontwikkeling van een methode voor de bepaling van sorbinezuur, benzoëzuur en saccharine in huzarensalades.

Samenvatting:

Gezocht werd naar een methode waarmee de conserveermiddelen en saccharine gelijktijdig bepaald kunnen worden. Na raadpleging van recente literatuur werd gekozen voor een reversed-phase HPLC-systeem, waarvan een aantal chromatografische kondities gevarieerd werden. De extractie uit huzarensalade werd onderzocht, waarbij de recovery's van sorbinezuur, benzoëzuur en saccharine bepaald werden.

Conclusies:

- Een extractie met methanol/water blijkt voor zowel sorbinezuur, benzoëzuur als saccharine geschikt, waarbij resp. de volgende recoveries verkregen werden: 89,9%; 94,6% en 94,7%.
- Door gebruik te maken van het tegenion hexadecyltrimethylammoniumbromide kunnen sorbinezuur, benzoëzuur en saccharine isocratisch snel bepaald worden.
- Dit tegenion biedt perspectieven voor de gelijktijdige bepaling van sorbinezuur, benzoëzuur en de parabenen zonder gebruik te maken van gradiënt-elutie.

Verantwoordelijk: ir P. Hollman 

Medewerkers/Samenstellers: J.J. van Oostrom, ir P. Hollman 

Projectleider: ir P. Hollman

1. Inleiding

In het kader van een onderzoek naar de kwaliteit van huzarensalades, bestond belangstelling voor het voorkomen van conserveermiddelen en kunstmatige zoetstoffen in deze produkten.

Het gebruik van deze additieven is geregeld in de Warenwet. Volgens het Kokswarenbesluit art. 7d (salades) mogen in salades als conserveermiddel worden toegepast: sorbinezuur en benzoëzuur en de natrium- en calciumzouten tot een totaal van 1000 ppm berekend als zuur. In het Algemeen besluit art. 3 quater is de toepassing van kunstmatige zoetstoffen geregeld. Orthobenzoëzuursulfimide (= saccharine) en de natrium- en calciumzouten van deze stof mogen in produkten aanwezig zijn tot een gehalte van 200 ppm. Bij gebruik is een aanduiding van de stof en het gehalte op de verpakking verplicht. Voor N-cyclohexylsulfaminezuur (= cyclamaat) zijn aparte regels opgesteld (Algemeen besluit art. 3 quater lid 6 en art. 9 lid 1). Cyclamaat is in huzarensalade niet te verwachten.

Het onderzoek heeft zich dan ook toegespitst op sorbinezuur (SZ), benzoëzuur (BZ) en saccharine (SACCH).

2. Overzicht literatuur SACCH (vanaf 1977)

Spektrofotometrische methodes worden beschreven voor de bepaling van SACCH in softdrinks en farmaceutica (Ramappa, 2, 13, Krueger, 5), zoetjes (Clark, 4), jam en vruchtesap (Lemieszek, 14). Aangezien deze methodes niet specifiek en relatief ongevoelig zijn, is bij de analyse van SACCH in levensmiddelen de extractie en clean-up bewerkelijk. Zo meldt Clark (4) storingen van o.a. BZ en SZ.

Polarografische methodes (Differential Pulse Polarography) worden beschreven door Holak (8) en Sontag (9) voor de bepaling van SACCH in softdrinks, zoetjes, toetjes en gezouten haring. De extractie van SACCH met chloroform of ether die hierbij noodzakelijk is, maakt de methode bewerkelijk in verband met mogelijke emulsievorming bij een aantal produkten.

Een gaschromatografische methode voor SACCH wordt beschreven door Sumimoto (15). Nadeel is dat derivatizeren noodzakelijk is, waarvoor het (waarschijnlijk) kankerverwekkende N-nitrosomethylureum gebruikt wordt.

De nadelen van bovengenoemde methodes kunnen grotendeels ondervangen worden door gebruik te maken van vloeistofchromatografie. Het aantal beschreven toepassingen met HPLC is daarom het grootst. Bovendien blijkt het soms mogelijk om naast SACCH de conserveermiddelen gelijktijdig te bepalen. Alle auteurs maken gebruik van Reversed-phase HPLC (zie overzicht tabel 1). Afwijkend hiervan beschrijft Ueta (16) een methode waarbij yoghurt, sojabonen en een visprodukt onderzocht worden op SZ, BZ en SACCH met behulp van ionwisselingschromatografie (Zipax SAX en Permaphase AAX).

Tabel 1 Literatuuroverzicht Reversed-phase HPLC-methodes voor de bepaling van SACCH

Auteur	Scheiding	Extraktie	Toepassing
Henning (3)	SACCH kolom: 7 μ m C18, 25 cm (I.D. 4 mm) (temp. 35°C) eluens: methanol/fosfaat- buffer (0,01 M) (65:35) + TPA- Bromide (0,005 M)	produkt + 70% methanol, ultrasoonbad 65°C (20 min), filtreren glasfilter G4, 3x wassen met 70% methanol, aliquot indampen, op SEP-PAK voorbehandeld met 40% methanol (+0,005 TPABr), SEP-PAK spoelen met 40% methanol (+0,005 TPABr), elueren met 70% methanol (+0,005 M TPABr)	mosterd, salades, dressings
Jushchyshyn (17)	SACCH kolom: 10 μ m C18 eluens: buffer pH 7 + hexadecyltrimethyl- ammoniumchloride		farmaceutische produkten
Szokolay (7)	SACCH kolom: Zorbax CN, 25 cm (I.D. 4,6 mm) eluens: 5% azijnzuur		onzuiverheden in saccharine
Palermo (18)	SACCH kolom: 10 μ m C18 eluens: azijnzuur/methanol/ water (1:60:139)	farmaceutische produkten aanzuren HCl, extraheren ether. zoetjes, oplossen in eluens.	farmaceutische produkten, zoetjes

Auteur	Scheiding	Extraktie	Toepassing
Tenenbaum (12)	SACCH kolom: 10 μ m C18, 25 cm (I.D. 4 mm) eluens: fosfaatbuffer (0,01 M) pH 2.2	produkt droogdampen + 5 ml 0.1 N H ₂ SO ₄ , extraheren met ether (3x), droogdampen, oplossen in water	alkoholhoudende produkten
Gillyon (6)	SACCH, BZ kolom: C18 (S11-X), 25 cm (I.D. 2,6 mm) eluens: acetonitril/1 M azijnzuur (1:9)		softdrinks
Woodward (10)	SACCH, BZ kolom: C18 eluens: 20% azijnzuur + NaAc pH 3/iso- propanol (98:2)	eventueel CO ₂ en vaste bestanddelen verwijderen	collaborative study koolzuurhoudende dranken
Ciraolo (19)	SACCH, BZ, para- hydroxybenzoaat kolom: C18 (S11-X-1) eluens: fosfaatbuffer pH 3/ methanol (33:67)		softdrinks op basis van jus d'orange
Kitada (20)	SACCH, BZ, para- benen kolom: 10 μ m C18, 30 cm eluens: acetaatbuffer (0,03 M)/methanol		sojasaus
Leuenberger (11)	kolom: 10 μ m C18 eluens: * BZ, SB, parabenen gradient 20% methanol - 80% methanol in fos- faatbuffer pH 6 * BZ, SB, SACCH fosfaatbuffer pH 6	* softdrinks: - filtreren * vetrijke produkten: op- lossen in ether, + 0,1 N NaOH, scheidrecter, aanzuren, aanvullen methanol * produkten die emulsies vormen: + 0,5 N H ₂ SO ₄ , homogeniseren (Ultra Turrax), aliquot op EXTRELUT, elueren met CHCl ₃ /isopropanol (9:1), indampen tot droog, op- lossen in methanol.	cake, kaas, ketchup, chocolade, salades, fruit, cocktail, yoghurt, pickels

3. Experimenten

3.1 Chromatografische kondities

Alle experimenten werden uitgevoerd met een Microspher C18 kolom (Chrompack), deeltjesgrootte 3 μm , 10 cm (I.D. 4,6 mm), voorzien van een voorkolom van 2,5 cm (I.D. 4,6 mm) gevuld met Perisorb C18 deeltjesgrootte 30-40 μm . Geïnjecteerd werd via een sample loop van 10 μl . Detectie geschiedde bij 235 nm.

3.1.1 Invloed buffer en pH

Getracht werd de extraktiemethode van Ueta (16) met 0.2 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en de HPLC kondities van Leuenberger (11) te combineren (zie tabel 2, punt 1). Aangezien SACCH dan een dubbele piek geeft, hetgeen blijkbaar veroorzaakt wordt door het borax-milieu van de standaardoplossingen (zie tabel 2, punt 2), is verder afgezien van deze extraktie. Bij alle volgende experimenten is gebruik gemaakt van standaarden opgelost in 70% methanol. Verlaging van de pH van de buffer verbetert alleen de piekvorm van BZ, opvalt de grote invloed op de retentie van SZ (zie tabel 2, punt 3). Wijziging van de soort buffer, bij gelijkblijvende pH (= 4,5) heeft voor de citraat/fosfaatbuffer niet het gewenste effect (zie tabel 2, punt 4). Toepassing van een acetaatbuffer volgens Gieger (1) heeft tot gevolg dat de piekvorm van SZ en SACCH duidelijk verbetert, de retentie van SZ en SACCH neemt echter zeer sterk toe (zie tabel 2, punt 5).

Conclusies:

- de retentie van SACCH wordt door de pH nauwelijks beïnvloed, de soort buffer heeft wel invloed;
- SB en BZ worden zowel door de pH als door de soort buffer beïnvloed;
- een acetaatbuffer geeft voor alle drie de componenten de beste piekvorm en lijkt dus de beste keuze.

Toevoeging van methanol aan het eluens (tabel 2, punten 6 en 7) heeft voor SACCH niet het gewenste effect. Kennelijk is SACCH te ionogeen. Dit zou verholpen kunnen worden door SACCH te protoneren in sterk zuur milieu pH $\pm$ 2 (zie Woodward, 10). Zoals uit tabel 2 punt 8 blijkt is de retentie van SACCH enigszins verbeterd, echter de scheiding tussen BZ, SZ en SACCH is nihil.

Bovendien doen zich door de hoge concentratie azijnzuur problemen voor bij de detectie. Bij 235 nm bleek de absorptie van azijnzuur dusdanig hoog dat hiervoor niet meer gecompenseerd kon worden. De detectiegolflengte moest derhalve verhoogd worden tot boven 247 nm, waarbij echter de UV-absorptie van SACCH beduidend kleiner is.

Tabel 2

Eluens	k'		
	BZ	SZ	SACCH
1. Fosfaatbuffer (0,03 M) pH 6 (standaarden in 0,2 M Na ₂ B ₄ O ₇)	3,3 t	5,3 t	11,5 d
2. Fosfaatbuffer (0,03 M) pH 6	3,3 t	5,0 t	11,2 +
3. Fosfaatbuffer (0,03 M) pH 4,5	0,6 +	13,9 t	11,3 t
4. Citraat/fosfaatbuffer pH 4,5	0,6 +	6,9 t	4,3 t
5. Acetaatbuffer (0,01 M) pH 4,5	26,0 +	52,4 +	5,6 +
6. Acetaatbuffer (0,01 M) pH 4,5/ Methanol (90:10)	11,7 +	niet bepaald	1,0 +
7. Acetaatbuffer (0,01 M) pH 4,5/ Methanol (80:20)	6,6 +	10,2 +	0,4 +
8. Acetaatbuffer (0,01 M) pH 2,2/ Methanol (80:20)	0,8 +	0,8 +	0,9 +

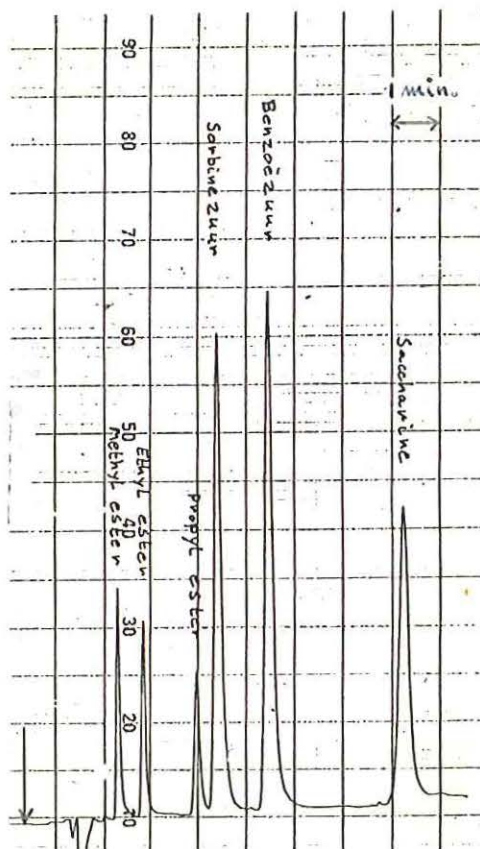
t = tailende piek
d = dubbele piek
+ = goede piekvorm

3.1.2 Invloed tegenion

Gezien het relatief sterke ionogene karakter van SACCH ligt keuze van een tegenion in de vorm van een quaternaire ammoniumverbinding voor de hand. Toepassing hiervan bij de bepaling van SACCH wordt beschreven door Henning (3) en Jushcyhshyn (17). Experimenten werden uitgevoerd met hexadecyltrimethylammoniumbromide (CTAB) omdat deze verbinding beschikbaar was. Gestart werd met de volgende eluenssamenstelling: acetaatbuffer pH 4,5 (0,01 M)/acetonitril (60:40), concentratie CTAB 0,003 M (op totale eluens).

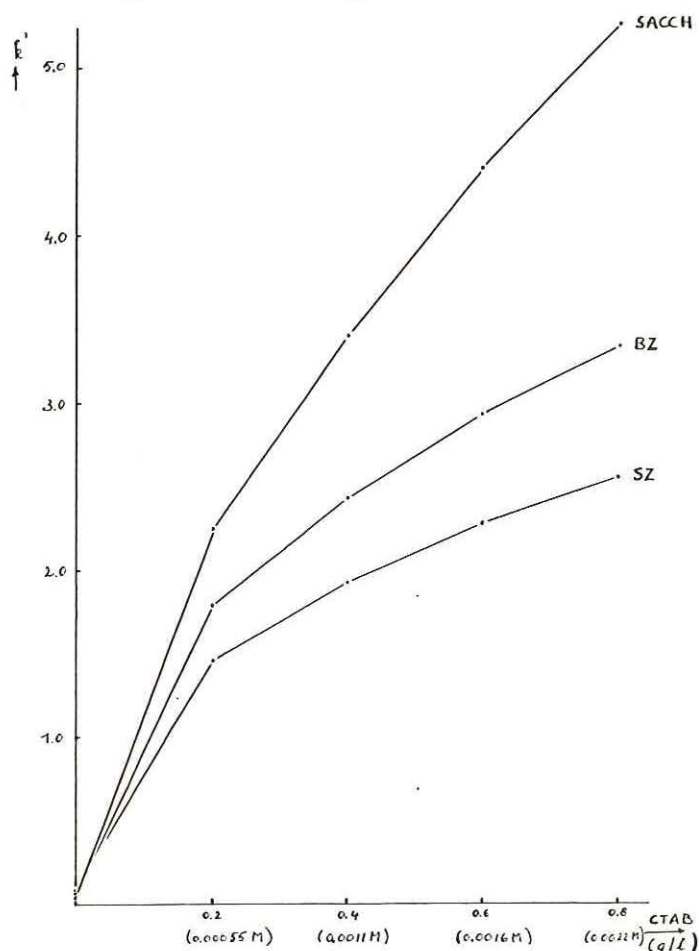
Dit geeft de gewenste verdeling van pieken in het chromatogram, echter SZ vertoont een "schouder". Verhoging van de bufferconcentratie ($\rightarrow 0,02$ M) van het eluens geeft geen verbetering van de piekvorm van SZ. Door vervanging van acetonitril door methanol in het eluens blijkt dat de storende piek die oorspronkelijk op de plaats van SACCH verscheen dusdanig klein geworden is, dat hiervan geen interferentie meer te verwachten is bij de analyse van de monsters salade.

Onderstaande figuur 1 geeft een goede weergave van de uitstekende mogelijkheden die gebruik van CTAB biedt. Het blijkt nu zelfs mogelijk onder isocratische kondities in korte tijd BZ, SZ en de parabenen te scheiden, een toepassing die tot op heden niet in de literatuur gerapporteerd werd.



Figuur 1 Scheiding sorbinezuur, benzoëzuur, 4-hydroxybenzoëzure methyl-, ethyl-, propylester en saccharine
kolom Microspher C18 100 x 4,6 mm, det. 235 nm, eluens
acetaatbuffer (0,01 M) pH 4,5/methanol (40:60) CTAB 0,005 M,
flow 1 ml/min.

Inleidende experimenten met extracten van monsters huzarensalade, waarbij geextraheerd werd volgens de methode beschreven door Gieger (1), toonden aan dat SZ zich minder ideaal gedraagt. De piekvorm van SZ bleek niet symmetrisch en bij kwantificering van SZ werden slecht reproduceerbare resultaten verkregen. Verhoging van de bufferconcentratie in de extraktievloeistof gaf geen verbetering. Gezien het feit dat de bovenbeschreven problemen met SZ niet optreden als geen tegen-ion gebruikt wordt, werd de invloed van de concentratie CTAB onderzocht. In figuur 2 is de relatie tussen k' en de concentratie CTAB uitgezet. Toetsing van het verband tussen $\log(k' - \Delta k')$ en $\log(\text{concentratie CTAB})$ geeft voor



concentratie CTAB) geeft voor SZ, BZ en SACCH lineaire relaties met correlatiecoëfficiënten (r^2) groter dan 0,999. Dit komt uitstekend overeen met het theoretisch voorspelde ideale ionpaar chromatografische gedrag.

Figuur 2 Eluens: Buffer ammoniumacetaat (0,01 M) pH 4,5/methanol (40:60).

In figuur 3 zijn de chromatogrammen van drie identieke extracten salade bij drie verschillende CTAB-concentraties weergegeven. Uitgaande van een ideale piek (Gausscurve, Opp. = $\sqrt{2\pi} \cdot \sigma \cdot h$) en een konstant schotelgetal ($t_R/\sigma = \sqrt{N}$) kan afgeleid worden dat bij ideaal chromatografisch gedrag $t_R \cdot h$ konstant is.

Zoals uit tabel 3 blijkt gedraagt BZ zich redelijk ideaal, SZ blijkt echter bij een concentratie CTAB van 0,8 g/l (0,0022 M) sterk af te wijken. Een verklaring hiervoor is dat bij deze concentratie tegenion piekverbreding optreedt waardoor de piekhoogte afneemt. Deze piekverbreding veroorzaakte bij de beginexperimenten, waarbij de concentratie CTAB 0,003 M en 0,005 M was, problemen.

Voor de scheiding van SZ, BZ en SACCH is dus de meest optimale concentratie tegenion 0,6 g/l (0,0016 M) CTAB, waarbij een goede scheiding mogelijk is.



Figuur 3: Eluens: Buffer ammoniumacetaat (0,01 M) pH 4,5/methanol (40:60)

Tabel 3 $t_r * h$ berekend uit figuur 3.

Conc. CTAB g/l	SZ	BZ
0,4	5257	2530
0,6	5120	2723
0,8	3853	2847

3.2 Extraktie van BZ, SZ en SACCH uit huzarensalade

Extrakties beschreven bij de HPLC-methodes zijn over het algemeen bewerkelijk (zie tabel 1). De eenvoudige extraktie met een verdunde $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -oplossing beschreven door Ueta (16) geeft echter problemen bij toepassing in combinatie met Reversed-phase HPLC, en is verder niet onderzocht (zie hoofdstuk 3.1). Henning (3) en Gieger (1) extraheren met een water-methanolmengsel. Met de extraktie volgens Gieger werd bij de bepaling van conserveermiddelen in een aantal produkten als yoghurt, kwark en garnalen al positieve ervaring opgedaan, zodat deze extraktie verder onderzocht werd.

Aangezien salade van zichzelf zuur is, werd de concentratie van de buffer verhoogd met een factor 5 (3,854 g ammoniumacetaat en 6 ml gec. azijnzuur in 600 ml water + 400 ml methanol). In plaats van de voorgeschreven extraktie met behulp van een ultrasoonbad werd voor malen met een Warring Blendor gekozen.

Voor de recoveryproeven werd één monster huzarensalade (samenstelling: 10,3% zetmeel, 69,0% vocht) volledig gehomogeniseerd met behulp van een Moulinex. Hieruit werd 5 gram in achtvoud ingewogen respectievelijk 2 maal blanco, 2 maal blanco + 100, 200 en 300 ppm sorbinezuur, benzoëzuur en saccharine. De salade werd gehomogeniseerd met ca. 35 ml extraktievloeistof in de Warring Blendor gedurende 30 seconden en kwantitatief overgespoeld in een maatkolf van 100 ml met extraktievloeistof. Vervolgens werden 1 ml Carrez I en II toegevoegd, aangevuld met extraktievloeistof gemengd, en bleef de kolf 10 minuten staan. De inhoud van de maatkolf werd hierna gefiltreerd, 4 maal verdund met extraktievloeistof en geïnjecteerd. De gevonden gehalten zijn vermeld in onderstaande tabel.

	SZ (ppm)			BZ (ppm)			SACCH (ppm)		
		gem.	recov.		gem.	recov.		gem.	recov.
Blanko	329 338	333,5		580 599	589,5		afwezig		
+ 100 ppm	410 430	420,0	86,5%	670 691	680,5	90,5%	93 92	92,5	92,5%
+ 200 ppm	510 516	513,0	89,8%	776 784	780,0	95,3%	190 190	190,0	95,0%
+ 300 ppm	614 616	615,0	93,8%	884 883	883,5	98,0%	289 290	289,5	96,5%
		gem. recov.	89,9%			94,6%			94,7%

4. Conclusies

- Extraktie van SZ, BZ en SACCH met methanol/water en klaring van de extrakten met Carrez blijkt voor huzarensalade geschikt, waarbij resp. de volgende gemiddelde recovery's verkregen werden: 89,9%; 94,6% en 94,7%.
- Met een Reversed-phase HPLC-systeem kunnen door gebruik te maken van het tegenion CTAB, SZ, BZ en SACCH in één run isocratisch snel bepaald worden.
- De tegenionconcentratie blijkt kritisch voor de piekvorm van SZ (conc. CTAB $\leq$ 0,0016 M).
- Gebruik van CTAB biedt perspectieven voor de gelijktijdige bepaling van SZ, BZ, SACCH en de parabenen, waarbij onder isocratische condities een snelle scheiding mogelijk is. De optimale condities hiervoor zullen echter nog nader onderzocht moeten worden.

5. Literatuur

1. U. Gieger, Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie 36 (1982) 109-110.
2. P.G. Ramappa e.a., Analyst 108 (1983) 966-970.
3. W. Henning, Deutsche Lebensmittel Rundschau 79 (1983) 16-19.
4. E.R. Clark, Analyst 107 (1982) 414-421.
5. G. Krueger, Lebensmittelindustrie 27 (1980) 264-266.
6. E.C.P. Gillyon, Chromatogr. Newsl. 8 (1980) 50-51.
7. A.M. Szokolay, J. Chromatogr. 187 (1980) 249-254.
8. W. Holak e.a., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63 (1980) 163-167.
9. G. Sontag e.a., Fresenius Z. Anal. Chem. 294 (1979) 278-283.
10. B.B. Woodward e.a., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62 (1979) 1011-1019.
11. U. Leuenberger e.a., J. Chromatogr. 173 (1979) 343-348.
12. M. Tenenbaum e.a., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60 (1977) 1321-1323.
13. Ramappa, Fresenius Z. Anal. Chem. 292 (1978) 413.
14. Lemieszek, Anal. Abstr. 36 (4), (1979) 4F58.
15. Sumimoto T., Imaida M., Anal. Abstr. 39 (6), (1980) 6F5.
16. Ueta M., Masaki M., Anal. Abstr. 36 (2), (1979) 2F7.
17. Jushchyshyn J. e.a., Anal. Abstr. 40 (1), (1981) 1E6.
18. Palermo P. e.a., J. Pharm. Sci., 68 (7), (1979) 878.
19. Ciruolo, L. e.a., Anal. Abstr. 36 (4), (1979) 4F55.
20. Kitada, Y. e.a., Anal. Abstr. 42 (3), (1982) 3F51.