

Project 505.9010

Ontwikkeling en verbetering van onderzoeksmethoden voor de bepaling van voedingszuren in eieren en eiprodukten.

Projectleider: drs B.G. Muuse

RAPPORT 89.22

Maart 1988

Voedingszuren in eieren: Ontwikkeling
van een gaschromatografische methode

M.L. Essers

Afdeling Vetchemie

Goedgekeurd door: drs B.G. Muuse

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

Copyright 1989, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-
produkten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bron-
vermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

Directeur

Sectorhoofden

Drs J.M.P. den Hartog

Afdeling AC

Programmabeheer en Informatieverzorging

Bibliotheek

EXTERN:

DLO (2x)

VKA

Spelderholt

Drs B.G. Muuse (IBVL)

L.M.H. Frijns (CLRVV)

INHOUD	blz.
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 HOOFDLIJNEN VAN HET ONDERZOEK	5
3 BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKDELEN VAN DE METHODE	6
3.1 Monstervoorbewerking (klaring)	6
3.2 Extractie van de zuren	7
3.3 Methylering en gc analyse	7
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	7
4.1 Extractie van de zuren	7
4.2 Methylering en gc analyse	8
4.3 Nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de methode	9
5 CONCLUSIES	10
LITERATUUR	11
BIJLAGEN	
A Schematische weergave van de methode	
B Chromatogram van standaarden	
C Chromatogram van monster zonder toevoegingen	
D Ontwerp analysevoorschrift	

SAMENVATTING

Onderzoek is gedaan om een minder bewerkelijke en snellere methode te verkrijgen voor de bepaling van enkele organische zuren in ei producten. De organische zuren melkzuur en barnsteenzuur zijn parameters voor de hygiënische kwaliteit van de gebruikte heelei grondstof.

3-Hydroxyboterzuur is een parameter om broedeieren aan te tonen. De huidige methode bevat een bewerkelijke clean up en ook een arbeidsintensieve stap om de organische zuren, met behulp van extrelut, vanuit de waterfase in de organische fase te brengen.

Bovendien zijn de resultaten van de kwantitatieve bepaling van melkzuur en barnsteenzuur met de huidige methode niet zo betrouwbaar.

Door toepassing van een andere clean up en het gebruik van natriumsulfaat in plaats van extrelut is het mogelijk gebleken om de bepaling aanmerkelijk sneller en beter uit te voeren. In dit onderzoek is de methode stap voor stap gecontroleerd. De methode is bruikbaar gebleken voor toepassing als routinemethode voor het screenen van eieren en ei producten op gehalten aan melkzuur, 3-hydroxyboterzuur en barnsteenzuur. De betrouwbaarheid van de methode moet nader worden vastgesteld aan de hand van praktijkmonsters en vergelijking met de enzymatische methode.

()

()

1 INLEIDING

Bij de bereiding van eiprodukten is de kwaliteit van de grondstoffen van groot belang voor de uiteindelijke kwaliteit. De microbiologische toestand van de oorspronkelijk gebruikte eieren is ook na pasteurisatie in het eindprodukt nog na te gaan door de bepaling van het melkzuur (Mz) en barnsteenzuur (Bz) gehalte (Mulder et al., 1987, Littmann et al., 1982a en 1982b). Om het gebruik van eieren die bevrucht en bebroed zijn te controleren is inmiddels een wettelijke regeling en controle ingesteld door de EEG waarbij gebruik wordt gemaakt van het 3-hydroxyboterzuur (3-HBA) gehalte (Steeverink et al., 1984, Uijtenboogaart et al., 1986). In de literatuur zijn gaschromatografische analysemogelijkheden voor deze drie zuren beschreven door met name Littman (1985). De methode is echter zeer tijdrovend en is voor 3-HBA veel sneller uit te voeren door toepassing van een extrelut kolom in de extractie procedure. Deze methode is beschreven in intern RIKILT voorschrift A425 en gepubliceerd door Elenbaas et al. (1986). Deze methode is echter minder geschikt gebleken voor Bz en nog minder voor Mz. Voor Mz is een recovery gevonden van circa 60% hetgeen te wijten is aan onvolledig elueren van het Mz van de extrelut kolom. Bovendien is de methode met extrelut nog steeds tijdrovend. Doel van het onderhavige onderzoek is de ontwikkeling van een routinematige GC methode voor de analyse van de drie genoemde zuren. Hiertoe is voor de cleanup en extractie van de zuren uit de waterfase een snellere en betere methode ontwikkeld. Het gaschromatografische deel van de bepaling is gelijk gebleven aan het reeds bestaande analysevoorschrift voor de gaschromatografische bepaling van 3-HBA (intern RIKILT voorschrift A 425).

2 HOOFDLIJNEN VAN HET ONDERZOEK

Voor het onderzoek zijn 30 scharreleieren gebruikt. Ze zijn ontdaan van schil en gehomogeniseerd met behulp van een Waring blender. Van het homogenaat zijn porties van circa 100 gram bij -20°C bewaard en vlak voor gebruik ontdooid. Daar de enzymatische methode, in een door

Duitse onderzoekers georganiseerde ringtest, geschikt is gebleken voor de bepaling van Mz, 3-HBA en Bz is voor wat betreft de extractie van de zuren uit het ei en het klaren van de oplossing de procedure van deze methode gebruikt. Uit de ringtest is ook gebleken dat de extrelut procedure niet geschikt is voor alle drie de zuren. Nagegaan is of het water niet eenvoudigweg met behulp van watervrij natriumsulfaat verwijderd kon worden. Tenslotte is de methylering van de zuren ten opzichte van het interne RIKILT voorschrift (A425) voor de bepaling van 3-HBA enigszins maar niet fundamenteel gewijzigd. In het onderzoek zijn de diverse stappen in de bepaling per fase gecontroleerd op betrouwbaarheid en tenslotte is de totale methode getoetst door aan de monsters standaarden toe te voegen van Mz, 3-HBA en Bz in oplopende concentraties tot circa 1,25 maal het toegestane gehalte in eieren. Op drie verschillende dagen zijn deze monsters ei zonder en met vijf verschillende niveaus van toevoegingen geanalyseerd.

3 BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKDELEN VAN DE METHODE

Een schema van de diverse stappen in de bepaling is weergegeven in bijlage A. Het onderzoek op de betrouwbaarheid van deze stappen wordt hier achtereenvolgend beschreven.

3.1 Monstervoorbewerking (klaring)

Als basis hiervoor diende de enzymatische methode uit de Duitse ringtest. De monsterhoeveelheden zijn aangepast om een geschikte concentratie van de zuren voor een gaschromatografische analyse te verkrijgen. Verder is de pH vlak voor filtratie, anders dan in het enzymatische voorschrift, verlaagd tot 3,5 om alle zuren in de zuurvorm te houden. De monstervoorbewerking is als volgt uitgevoerd: Aan 10 gram ei is 22 ml water en 300 μ l van een glutazarzuuroplossing toegevoegd (interne standaard, 100 mg/100ml). Door de oplossing gedurende 20 min bij 100°C te plaatsen worden de eiwitten gedenatureerd. De klaring van de oplossing is verder uitgevoerd met behulp van Carrez I en II. Tenslotte is aangezuurd met 200 μ l 8N HCL tot een pH van circa 3,5. Door filtratie is tenslotte een heldere waterige oplossing van de zuren verkregen.

3.2 Extractie van de zuren

De extractie van de zuren uit de waterige oplossing met behulp van extractrelut is zoals eerder vermeld niet geschikt voor Mz en Bz. Nagegaan is of de zuren met behulp van watervrij natriumsulfaat uit de waterfase in de ethylacetaat kon worden overgevoerd. Ter vermijding van in-sluitsels is 2 ml filtraat en 40 ml ethylacetaat met behulp van een magnetische roerder geroerd onder voorzichtig toevoegen van 3,5 gr watervrij natriumsulfaat. Na nog eens krachtig schudden is de ethylacetaat gefiltreerd en nogmaals met 40 ml ethylacetaat geschud en de ethylacetaat gefiltreerd. De 80 ml ethylacetaat is daarna tot droog ingedampt. Met behulp van een eimonster met toegevoegde standaarden is nagegaan of deze extractie volledig was voor de drie zuren.

3.3 Methylering en gc analyse

De methylering is afgezien van een kleine wijziging uitgevoerd volgens de methode genoemd in intern voorschrift A 425. De wijziging bestond uit het gebruik van een reacti-therm met vials in plaats van reageerbuizen en extra toevoeging van NaHCO_3 (watervrij) tot volledige neutralisatie. Verder is voor filtreren de oplossing op 4°C gebracht om zo veel mogelijk zouten in de oplossing te laten uitkristalliseren om dichtslibben van de gc kolom tegen te gaan. De gc analyse is conform het interne voorschrift A 425 uitgevoerd. Een chromatogram van standaarden en een chromatogram van een monster zonder toevoegingen zijn weergegeven in respectievelijk bijlage B en C.

4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 Extractie van de zuren

Dit is een toetsing van de totale analyseprocedure zonder invloeden van de klaring. Voor het overbrengen van de zuren van water naar ethylacetaat is gebruik gemaakt van 2 maal 40 ml ethylacetaat. Om deze stap te controleren is van een monster met toevoegingen het waterige filtraat, verkregen na de klaring, in vijfvoud geanalyseerd. De gemiddelden en standaardafwijkingen (s) staan vermeld in tabel 1. Om de effectiviteit van de extractie van de zuren na te gaan zijn ook andere

hoeveelheden ethylacetaat gebruikt. Aan een monster ei met 68 ppm Mz is 515 ppm Mz toegevoegd en het waterige filtraat met verschillende hoeveelheden ethylacetaat geextraheerd. Er is voor Mz gekozen omdat bekend is dat dit zuur ten opzichte van de andere zuren het slechts oplosbaar is in ethylacetaat. Uit de resultaten bleek dat met aflopen de hoeveelheden ethylacetaat de recovery van Mz navenant daalde. Het gebruik van 2 maal 40 ml ethylacetaat is dus noodzakelijk.

Tabel 1. Resultaten van de onderdelen van de methode

		gemiddeld in mg/kg	s
ad 4.1 extractie van de zuren	Mz n=5	202	5,51
	3-HBA n=5	2,17	0,09
	Bz n=5	14,05	1,45
ad 4.2 methylering	Mz n=5	105	8,23
	3-HBA n=5	1,42	0,12
	Bz n=5	8,43	0,41
ad 4.2 gc analyse		gemiddeld verschil (X)	s (0,89 x X)
	Mz n=8	10,4	9,3
	3-HBA n=9	0,25	0,22
	Bz n=9	0,97	0,86

4.2 Methylering en gc analyse

Dit is een toetsing van de totale analyse echter zonder de invloeden van klaring en extractie met ethylacetaat. Vijf maal 2ml van een waterig filtraat van een monster met toevoegingen is volgens schema behandeld met ethylacetaat. De ethylacetaat frakties zijn bij elkaar gebracht in ingedampt waarna de methylering en gcc analyse in vijfvoud

werd uitgevoerd. De gemiddelden en standaardafwijkingen (s) staan vermeld in tabel 1. Uit de resultaten van 4.1 (extractie van de zuren) en 4.2 (methylering) blijkt dat de spreidingen in de analyses in hoofdzaak absoluut en niet van het niveau afhankelijk zijn. Bz vormt hierop een uitzondering. Bij Bz bestaat het probleem dat in het gc chromatogram een piek voorkomt vlak na Bz die soms stoort bij de kwantificatie.

Ter toetsing van de gc bepaling zijn verschillende monsters na de gc analyse nogmaals in de gc geïnjecteerd en geanalyseerd. De gevonden gemiddelde verschillen en standaardafwijkingen (s) staan vermeld in tabel 1. Dit gaf nagenoeg dezelfde spreiding als bij de extractie van de zuren (4.1) en methylering (4.2) zodat geconcludeerd werd dat de spreidingen in de analyses in hoofdzaak worden veroorzaakt door de gc procedure.

4.3 Nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de methode

Ter indicatieve vaststelling van de betrouwbaarheid van de methode zijn op drie verschillende dagen een monster zonder en met vijf verschillende toevoegingen geanalyseerd. De toevoegingen waren zodanig dat de gehalten van de te bepalen zuren circa 25, 50, 75, 100 en 125% van de toegestane gehalten in eieren waren. De gemiddelde gehalten van de drie monsters zonder toevoegingen waren: Mz 52 mg/kg, 3-HBA 0,9 mg/kg en Bz 3,0 mg/kg.

Van alle 15 monsters zijn de recovery's van elk van de toegevoegde zuren bepaald. Hierna is de gemiddelde recovery van elk toegevoegd zuur met standaardafwijking berekend. Recovery's die meer dan 2 maal de standaardafwijking verschilden van het gemiddelde zijn verworpen waarna opnieuw het gemiddelde met standaardafwijking en variatiecoëfficiënt (cv) is berekend. De resultaten hiervan zijn als volgt:

		gemiddelde recovery%	s	cv
Mz	n=14	102,2	11,5	11,3
3-HBA	n=14	104,3	28,2	27,0
Bz	n=12	93,7	7,3	7,8

Hieruit blijkt dat Mz en Bz goed te bepalen zijn met de nieuwe methode. De gemiddelde recovery van 3-HBA is goed echter de spreiding is groot (cv 27%). Indien de resultaten gesplitst worden in monsters met een toevoeging van kleiner en groter dan 1,5 mg/kg (gehalten van respectievelijk kleiner en groter dan circa 2 mg/kg) dan zijn de resultaten als volgt:

		toevoeging	gemiddelde	s	cv
		mg/kg	recovery%		
3-HBA	n=6	<1,5	133,0	38,9	29,2
3-HBA	n=8	>1,5	88,8	13,0	14,6

Hieruit blijkt dat bij gehalten aan 3-HBA kleiner dan circa 2 mg/kg de methode minder nauwkeurig is. Voor screenen van praktijkmonsters is de methode echter geschikt. De methode zal in de praktijk getoetst moeten worden en de resultaten vergeleken met de enzymatische methode zodat de betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid bepaald kunnen worden.

5 CONCLUSIES

Uit het onderzoek van de diverse stappen in de methode blijkt dat deze geen noemenswaardige invloed hebben op het eindresultaat daar de standaardafwijking niet daalde naarmate later in de methode werd begonnen. De spreidingen in de analyse worden in hoofdzaak veroorzaakt door de gc procedure.

De nieuwe methode, weergegeven in een ontwerp analysevoorschrift in bijlage D, is bruikbaar voor het screenen van monsters.

De betrouwbaarheid en interne reproduceerbaarheid van de methode zal moeten worden vastgesteld door middel van praktijkmonsters en vergelijking met de enzymatische methode.

LITERATUUR

Elenbaas H.L., Muuse B.G., Haasnoot W., Rutjes B., Stouten P., Uijttenboogaart T.G. and Steverink T.G. (1986)
Determination of Incubator-Reject Eggs in Egg Products by means of the 3-Hydroxybutyric Acid Content. 1. Improved Enzymatic and Gas Chromatographic Assays.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986, 34, 663-666.

Littmann S., Schulte E. und Acker L. (1982a)
Beurteilung des hygienische Zustandes von Eiprodukten vor der Pasteurisierung über das Muster der organische Säuren.
1. Gaschromatographische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung der organischen Säuren des Hühnereis.
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1982, 175, 101-105.

Littmann S., Acker L. und Schulte E. (1982b)
Beurteilung des hygienische Zustandes von Eiprodukten vor der Pasteurisierung über das Muster der organische Säuren.
2. Das Säuremuster in Eiprodukten in Abhängigkeit von der hygienischen Situation
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1982, 175, 106-112.

Littmann S. (1985)
Zur chemisch-analytischen Untersuchung von Eiprodukten und Beurteilung ihres hygienischen Zustandes an Hand des Gehaltes an verderbsspezifischen organischen Säuren.
Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 1985, 81 Jahrg., 11, 345-350.

Mulder R.W.A.W., Bolder N.M., Muuse B.G., Cazemier G. en den Hartog J.M.P. (1987).
Het vaststellen van de microbiologische kwaliteit van eiprodukten aan de hand van gehalten aan barnsteenzuur en melkzuur.
VMT, 1987, nr 4, 20-23.

Steverink A.T.G., Uijttenboogaart Th.G. en Elenbaas H.L. (1984)
Aantonen van uitgeschouwde broedeieren in eiprodukten.
Pluimveehouderij (14e jaargang), 2 november 1984, 9-11.

Uijttenboogaart T.G., Steverink T.G., Elenbaas H.L., Haasnoot W.,
Muuse B.G., and Stouten P. (1986).

Determination of Incubator-Reject Eggs in Egg Products by means of the
3-Hydroxybutyric Acid Content. 2. Levels of 3-HBA in Different Kinds
of Eggs and Egg Products and the Development of 3-HBA during
Incubation.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986, 34, 667-670.

Schematische weergave van de methode

gehomogeniseerd heelei
of eipoeder

monster zonder toevoegingen

+ interne standaard
+ water

monster met toevoegingen

+ standaard zuren
+ interne standaard
+ water

20 minuten 100°C

carrez I en carrez II

afkoelen

200 µl 8 N zoutzuur

15 minuten laten staan

filtreren

2 cc filtraat extraheren met

2 x 40 cc ethylacetaat en watervrij
natriumsulfaat

ethylacetaat indampen

methylering met 1 ml HCL/methanol 2 mol/l

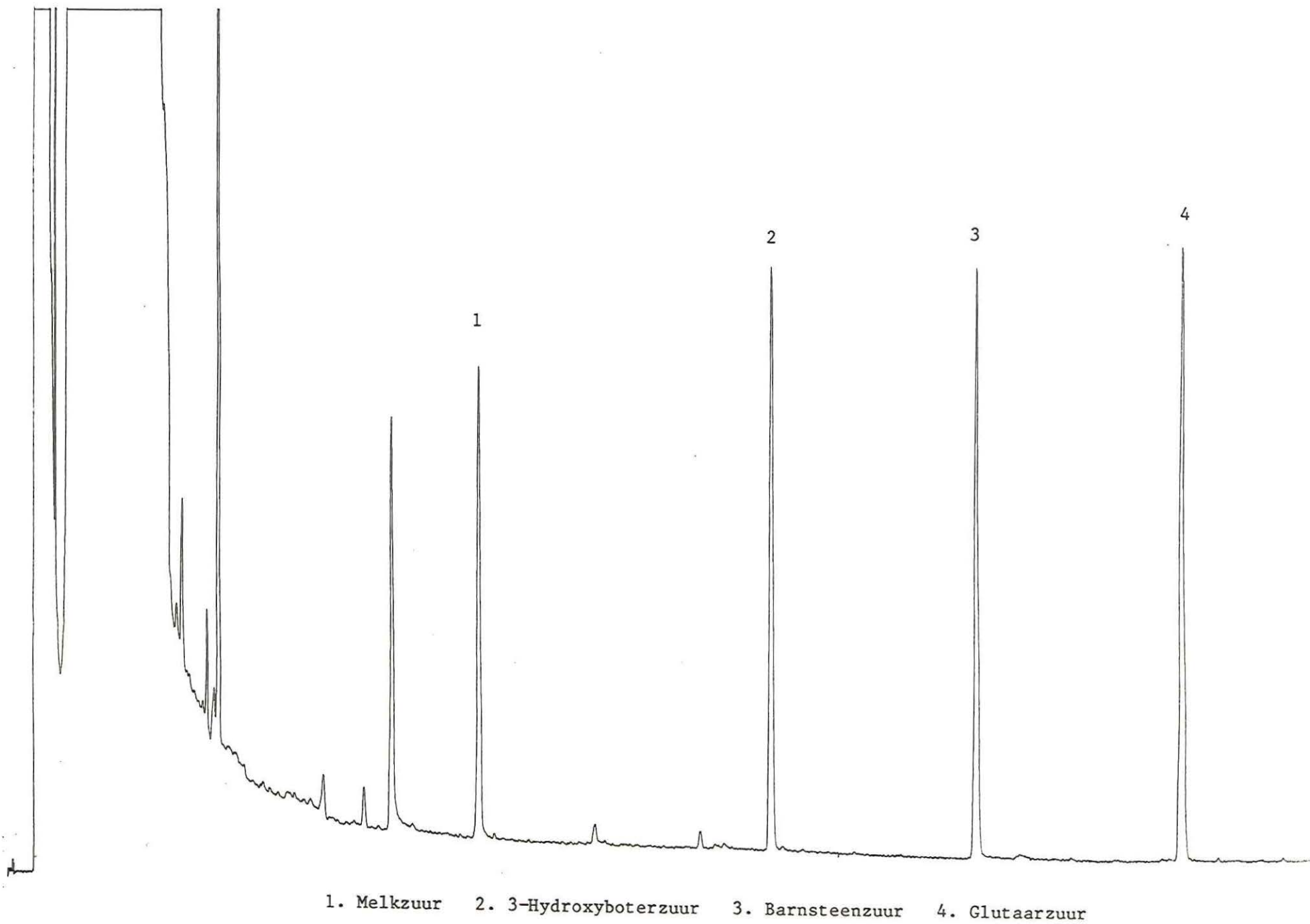
neutraliseren met 0,25 ml ammonia/methanol 5 mol/l

op pH brengen met NaHCO₃

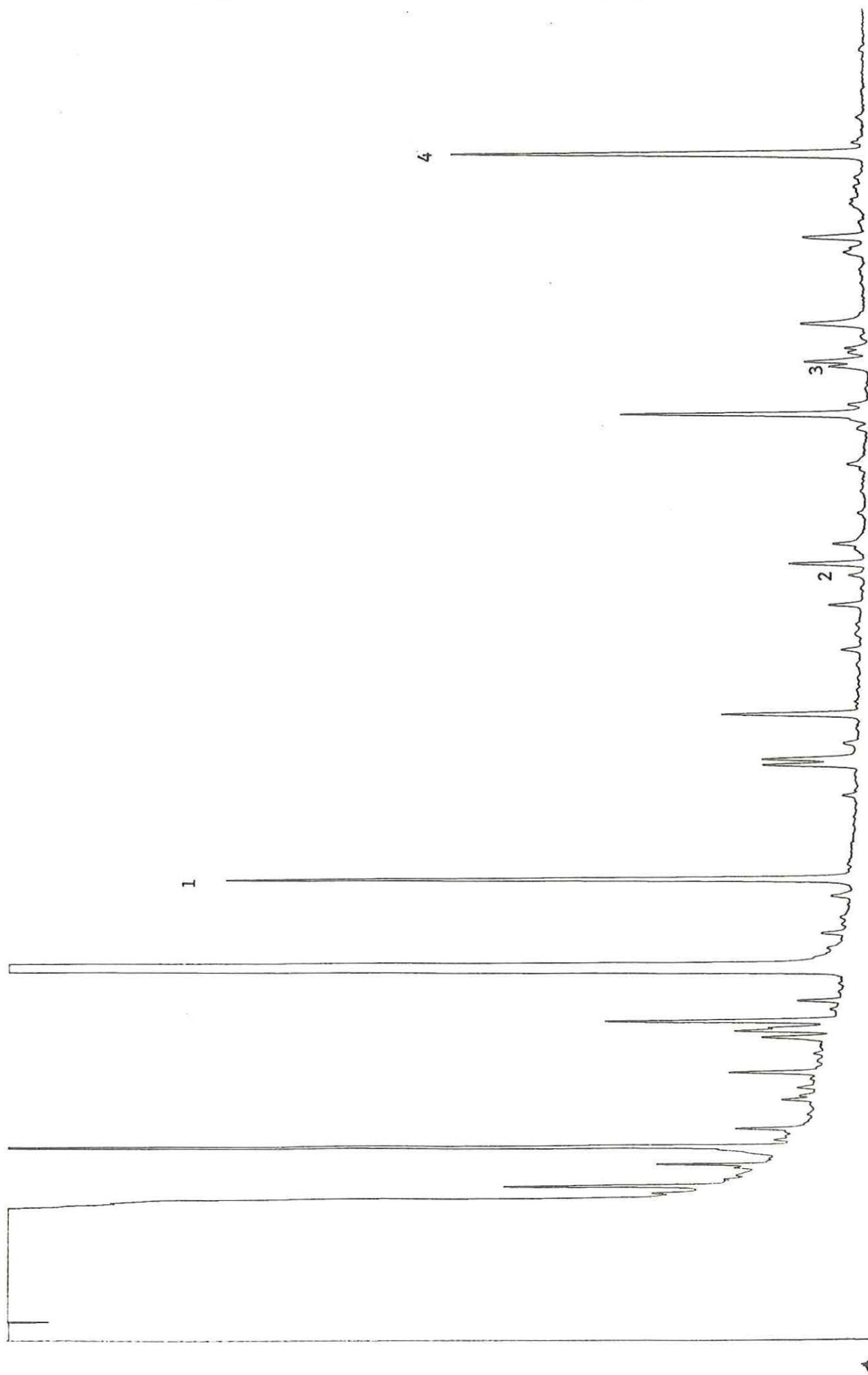
10 minuten bij 4°C

filtreren over acrodisc 0,45 µm

GC analyse



Chromatogram van een monster zonder toevoegingen



1. Melkzuur 2. 3-Hydroxyboterzuur 3. Barnsteenzuur 4. Glutaarzuur

ONTWERP ANALYSEVOORSCHRIFT

EIEREN:

GASCHROMATOGRAFISCHE BEPALING VAN MELKZUUR, 3-HYDROXYBOTERZUUR
EN BARNSTEENZUUR

1. Toepassingsgebied

De methode is van toepassing voor eieren en eiprodukten.

2. Definitie

Het gehalte aan melkzuur, 3-hydroxyboterzuur en barnsteen-
zuur wordt gaschromatografisch bepaald en uitgedrukt in mg/kg monster.

3. Beginsel

Een gehomogeniseerd monster wordt na verhitten geklaard met behulp van carrez I en carrez II. Na aanzuren van de oplossing tot pH 3,5 en filtreren wordt een heldere waterige oplossing verkregen. De organische zuren worden uit de waterfase overgebracht in ethylacetaat door binding van het water aan watervrij natriumsulfaat. Na indampen van de ethylacetaat worden de zuren onder verwarming met zoutzure methanol gemethyleerd. Het zoutzuur wordt vervolgens met ammoniakale methanol geneutraliseerd en de oplossing op pH gebracht met natriumbicarbonaat. Na afkoelen tot 4°C en filtreren is deze oplossing geschikt voor de gaschromatografische analyse met een Cp Wax 57 cb capillair kolom. De kwantificatie berust op interne standaardisatie met glutaarzuur.

Vervolg Bijlage D

4. Reagentia

Alle reagentia zijn van analysekwaliteit indien niet anders is vermeld. Gebruik gedestilleerd water of water van tenminste gelijkwaardige zuiverheid.

4.1 Zoutzuur, 8 N

4.2 Carrez I oplossing. Los 15 gram $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ op in water en vul aan met water tot 100 ml.

4.3 Carrez II oplossing. Los 30 gram $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ op in water en vul aan met water tot 100 ml water.

4.4 Amylalcohol (antischuimmiddel).

4.5 Natriumsulfaat, watervrij.

4.6 Methanolische zoutzuuroplossing, 2 mol/L.
Bereiding volgens bijlage I.

4.7 Methanolische ammoniakoplossing, 5 mol/L.
Bereiding volgens bijlage II.

4.8 Natriumbicarbonaat ($NaHCO_3$)

4.9 Ethylacetaat (Uvasol Merck 863), of ethylacetaat p.a. mits een blanco analyse daarmee geen storende stoffen vertoont.

4.10 Glutaarzuur (interne standaard), oplossing in water (100mg/100 ml).

Weeg circa 100 mg glutaarzuur, op 0,1 mg nauwkeurig, af in een maatkolf van 100 ml. Los op in water en vul aan met water tot 100 ml.

4.11 Lithiumzout van melkzuur.

4.12 3-Hydroxyboterzuur.

4.13 Barnsteenzuur.

5. Toestellen en hulpmiddelen

Naast gebruikelijke laboratoriumapparatuur en hulpmiddelen:

5.1 Gaschromatograaf met een FID detector geschikt voor capillaire kolommen en splitless injectie.

5.2 Vial van 4 ml met septum en schroefdop.

5.3 Reacti-therm heating module (Pierce) geschikt voor vials van 4 ml.

5.4 Rotavapor.

5.5 Magnetische roerder.

5.6 0,45 μ m filter, b.v. Acrodisc Cr (Gelman).

5.7 Flesje van 100 ml met schroefdop, hoog model.

5.8 Waterbad, instelbaar op 100°C

6. Werkwijze

Een schema van de werkwijze is weergegeven in bijlage III.

6.1 Monster voorbereiding.

6.1.1 Heelei

Weeg af in duplo 10 gram gehomogeniseerd ei, op 2 decimalen nauwkeurig, in een flesje van 100 ml (5.6). Voeg toe 22 ml water en 300 μ l glutaarzuuroplossing (4.10). Homogeniseer de oplossing goed met behulp van een roervlo. Handel verder volgens 6.2.

Vervolg Bijlage D

6.1.2 Eipoeder

Weeg af in duplo 2,5 gram gehomogeniseerd eipoeder, op 2 decimalen nauwkeurig, in een flesje van 100 ml (5.6.). Voeg toe 29 ml water en 300 μ l glutaarzuuroplossing (4.10). Homogeniseer de oplossing goed met behulp van een roervlo. Handel verder volgens 6.2.

6.2 Klaring en extractie

Voeg toe 1 druppel amylalcohol, sluit het flesje af met aluminiumfolie en plaats gedurende 20 minuten in een kokend waterbad.

Haal het flesje uit het waterbad, laat gedurende circa 3 minuten afkoelen, en voeg toe 1,5 ml Carrez I oplossing (4.2). Sluit het flesje af en schud krachtig. Voeg toe 1,5 ml Carrez II oplossing, sluit flesje af en schud nogmaals krachtig. Laat afkoelen tot kamertemperatuur en voeg 200 μ l 8 N HCL toe, meng en laat 15 minuten staan. Meng en filtreer over een normaal vouwfilter. (pH van filtraat is circa 3,5). Pipetteer circa 2 ml van het heldere filtraat in een erlenmeyer met slijpstuk van 200 ml. Voeg 40 ml ethylacetaat (4.9) toe.

Breng een roervlo in de erlenmeyer en voeg onder goed roeren 3,5 gr natriumsulfaat (4.5) toe. Verwijder de roervlo uit de oplossing (afspoelen met ethylacetaat), sluit de erlenmeyer af met een stop, en schud krachtig gedurende 30 seconden en filtreer de ethylacetaat over een normaal vouwfilter in een indampkolf van 250 ml. Voeg aan het residu in de erlenmeyer nogmaals 40 ml ethylacetaat toe, sluit af, en schud nogmaals krachtig en filtreer. Damp het filtraat in tot plus minus 2 ml aan de rotavapor (5.4) bij 40°C en breng de vloeistof met een pasteurpipet over in een vial van 4 ml (5.2). Plaats de vial in de reacti-therm module (5.3) en damp het monster droog onder een stikstof stroom, bij 40°C. Het monster is nu geschikt voor methylering.

6.3 Methylering

Voeg 1 ml methanolische zoutzuuroplossing toe aan het droge extract in de vial. Sluit de vial goed af en verhit gedurende 1 uur bij 60°C.

Koel de vial af met koud stromend water. Voeg toe 0,25 ml methanolische ammoniakoplossing (4.7) en meng. Voeg een spatelpunt natriumbicarbonaat toe en meng voorzichtig (schuimvorming).

Vervolg bijlage D

Blijf spatelpuntjes natriumbicarbonaat toe voegen en mengen (eventueel met een tubemixer) totdat geen schuimvorming meer optreedt. Sluit de vial af met een nieuwe schroefdop plus septum en koel gedurende 10 minuten bij 4°C. Verwijder zoutkristallen uit het gemethyleerde monster met een 0,45 µm filter (5.5) en vul een monsterflesje voor de gaschromatograaf. Vul het flesje aan met methanol. Het monster is nu geschikt voor de gaschromatografische scheiding.

7. Bereiding van een standaardoplossing voor bepaling van de responsfactoren (Kf)

Weeg af 110 mg lithiumzout van melkzuur (afhankelijk van de zuiverheid komt dit overeen met circa 100 mg melkzuur), 100 mg 3-hydroxyboterzuur, 100 mg barnsteenzuur en 100 mg glutaarzuur, op 0,1 mg nauwkeurig, in een erlenmeyer van 200 ml. Los de zouten op in circa 50 ml methanol en vul aan tot circa 100 ml met ethylacetaat.

Pipeteer uit deze oplossing circa 30 µl in een vial van 4 ml en damp met behulp van een stikstof stroom bij 40°C in tot droog. Handel verder volgens 6.3

8 Gaschromatografische analyse

Omstandigheden:

- kolom: capillair CP Wax 57 CB fused silica, 25 meter lang met een interne diameter van 0,22 mm (Chrompack).
- Injektortemperatuur: 280°C
- Detektortemperatuur: 280°C
- Draaggas: Helium, 1,1 bar
- Kolomtemperatuur: tijdens injectie 50°C, daarna met 3°C/min naar 200°C en 15 minuten constant op 200°C
- Injectie: 2 µl, splitless. De splitter wordt geopend na 120 seconden met een splitverhouding van 1:100

Piekidentificatie:

De piekidentificatie geschied met behulp van de standaarden. Een chromatogram van standaarden en een chromatogram van een monster zijn weergegeven in bijlage IV.

9. Berekening

9.1 Responsfactoren (Kf)

Bereken de Kf waarden van melkzuur, 3-hydroxyboterzuur en barnsteen-
zuur ten op zichte van glutaarzuur op de volgende manier:

$$\text{Kf t.o.v. glutaarzuur} = \frac{\text{opp. glutaarzuur}}{A} \times \frac{B}{\text{mg glutaarzuur}}$$

waarin A = oppervlak van te bepalen zuur.

B = mg van te bepalen zuur in oplossing (7)

9.2 Berekening monsters

Bereken uit de gevonden piekoppervlakten en de responsfactoren het
gehalte aan melkzuur, 3-hydroxyboterzuur en barnsteen-
zuur.

$$F = \frac{A \times C \times E \times 1000}{B \times D}$$

waarin:

F = gehalte van het betreffende zuur in mg/kg oorspronkelijk
materiaal.

A = oppervlak van het te bepalen zuur.

B = oppervlak van glutaarzuur.

C = hoeveelheid glutaarzuur in mg, toegevoegd aan monster.

D = g ei ingewogen.

E = Kf van te bepalen zuur ten opzichte van glutaarzuur.

10 Herhaalbaarheid

Deze dient nog nader te worden vastgesteld.

Vervolg Bijlage D

11 Opgave van de resultaten

Deze resultaten worden weergegeven in mg/kg heelei of eipoeder.

De afronding van de resultaten zijn afhankelijk van de nog te bepalen herhaalbaarheid.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Samensteller: M.L. Essers

Bijlage I

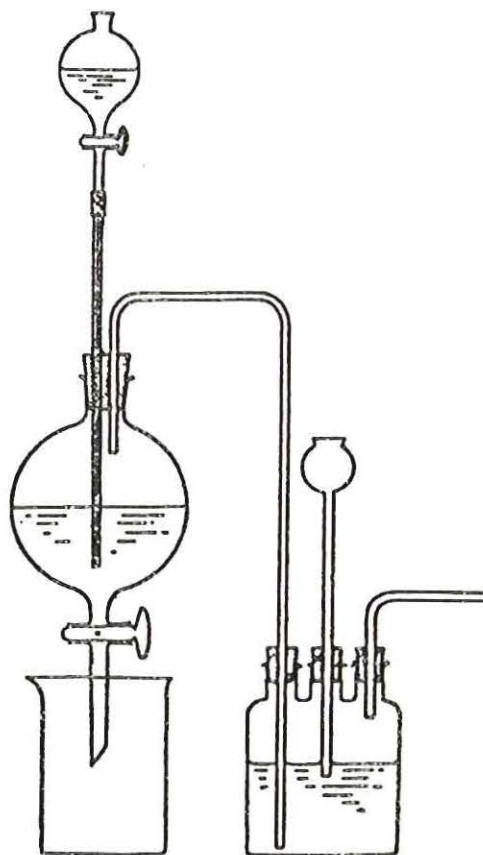
Bereiding van een zoutzure methanoloplossing.

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 (dit is een gewichtstoename van 7,5 g per 100 ml methanol).

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

Apparatuur:



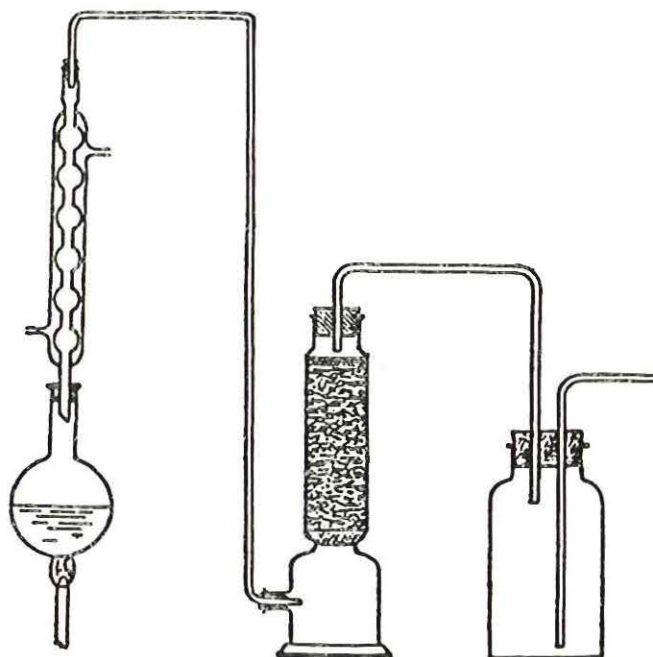
Bijlage II

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. Het vrijkomende gas wordt gedroogd door het door ongebluste kalkbrokjes te leiden en wordt vervolgens door methanol geleid.

Uit de gewichtstoename van de methanol is de ammoniacconcentratie te berekenen. Deze dient ca. 5 mol/L te zijn (dit is een gewichtstoename van 8,5 g per 100 ml methanol).

Apparatuur:



Schematische weergave van de methode

gehomogeniseerd heelei
of eipoeder

+ interne standaard
+ water

20 minuten 100 °C

carrez I en carrez II

afkoelen

200 µl 8 N zoutzuur
15 minuten laten staan

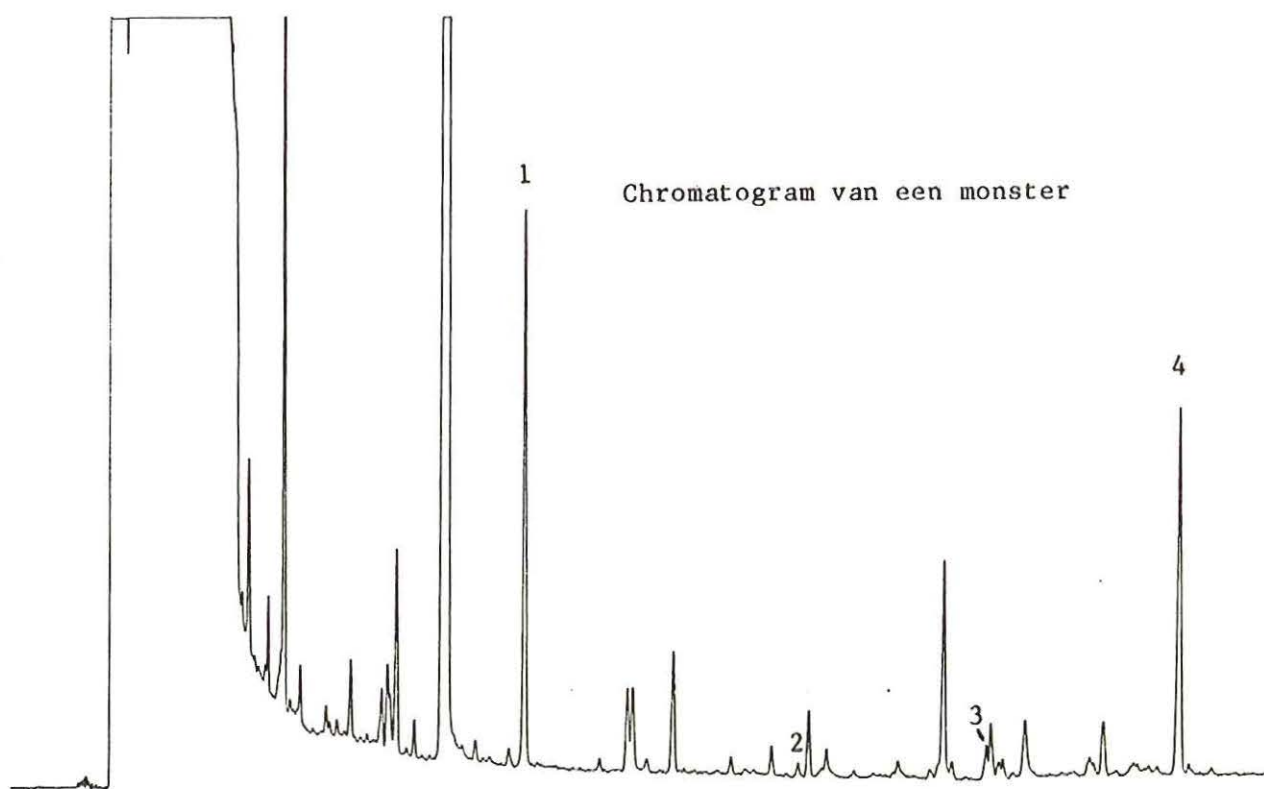
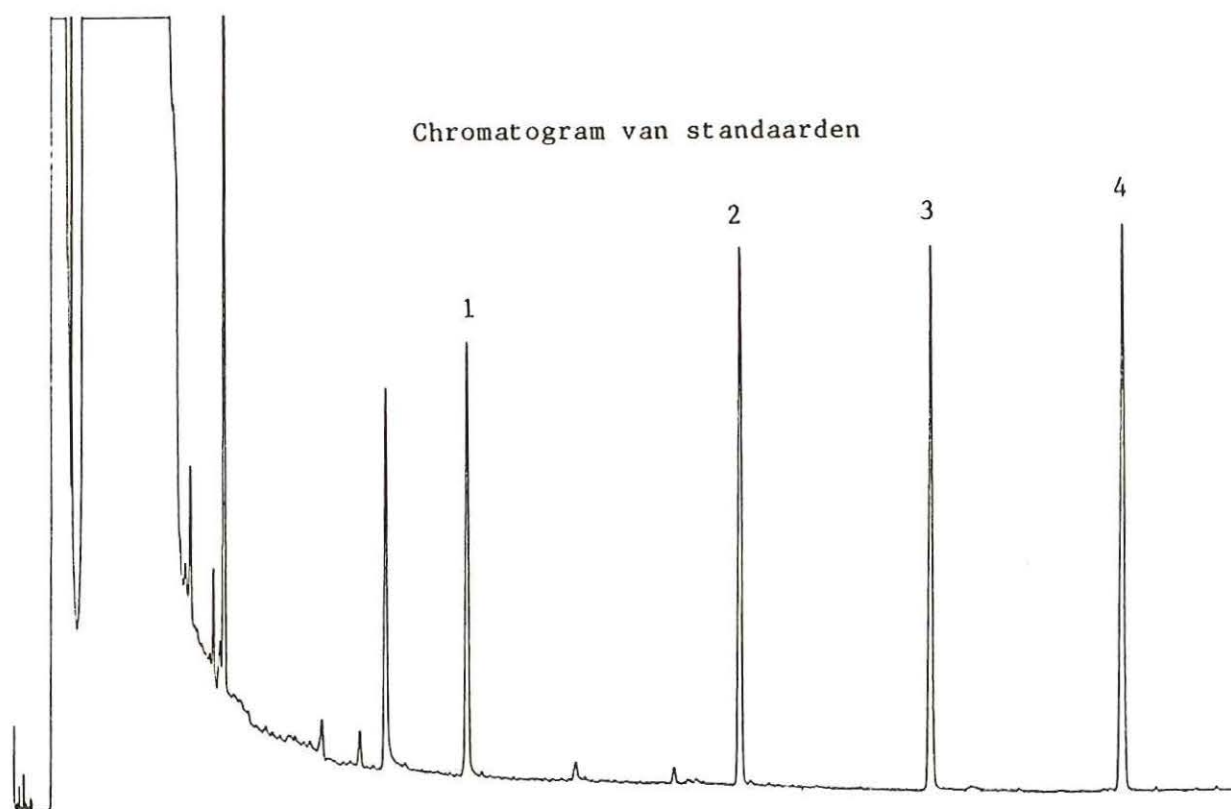
filtreren

2 cc filtraat extraheren met
2 x 40 cc ethylacetaat en watervrij
natriumsulfaat

ethylacetaat indampen

methylering met 1 ml HCL/methanol 2 mol/l
neutraliseren met 0,25 ml ammonia/methanol 5 mol/l
op pH brengen met NaHCO₃

10 minuten bij 4 °C
filtreren over acrodisc 0,45 µm
GC analyse



1. Melkzuur 2. 3-Hydroxyboterzuur 3. Barnsteenzuur 4. Glutaarzuur