

**Ontwikkeling van een snelle
meetmethode voor
pyrofosfaat ten behoeve
van de aardappel-
verwerkende industrie**

VERTROUWELIJK

1998-06-12

ato-dlo





ato-dlo

Ontwikkeling van een snelle meetmethode voor pyrofosfaat ten behoeve van de aardappelverwerkende industrie

VERTROUWELIJK

Ir. B. Krebbers
Drs. J. Sinke
Ir. J. Otten
Ir. E.S.A. Biekman
Dr. ir. A. Braaksma

**Instituut voor
Agrotechnologisch
Onderzoek (ato-dlo)**

Bornsesteeg 59
Postbus 17
6700 AA
Wageningen
tel. 0317.475000
fax. 0317.475347

*Eigendom van ato-dlo. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermeerderd of
gedistribueerd zonder schriftelijke toestemming van ato-dlo*

2251648

Inhoud

pagina

Samenvatting.....	2
1. Achtergrond en doel van het project.....	4
1.1 Probleemstelling.....	4
1.2 Doel van het project.....	4
1.3 Fasering.....	5
2. Onderzoeksaanpak.....	6
2.1 Opzet selectie analysemethoden voor pyrofosfaat.....	6
2.2 Experimentele opzet voor ontwikkeling van de meetmethode voor pyrofosfaat	6
2.2.1 Hydrolyse van pyrofosfaat als functie van tijd, temperatuur en zuurgraad	6
2.2.2 Effect van “dipbad” medium op de meting van pyrofosfaat	7
2.2.3 Karakterisatie van “dipbad” monsters	8
2.2.4 Effect van voorbehandeling monsters op pyrofosfaatbepaling.....	8
3. Resultaten	9
3.1 Inventarisatie van bruikbare systemen voor het meten van orthofosfaat en pyrofosfaat (literatuurstudie)	9
3.1.2 Directe meting van pyrofosfaat	11
3.1.3 Andere methoden voor bepaling van pyrofosfaat.....	11
3.1.4 Commercieel verkrijgbare on-line fosfaatmeters	11
3.2 Verkenning en ontwikkeling van bepalingmethoden voor pyrofosfaat.....	12
3.2.1 Molybdaatblauwmethode met enzymatische hydrolyse (methode 1a: zie tabel 2)	13
3.2.2 Methode van Rouser et al.: Hydrolyse en kleuring in één stap (methode 2: zie tabel 3).....	14
3.2.3 Terugtitratie na neerslag met zinksulfaat (methode 3: zie tabel 3).....	15
3.3 Verdere ontwikkeling van de indirecte meetmethode van pyrofosfaat: molybdovanadaatmethode (methode 2: zie tabel 3)	17
3.3.1 Versnelling van de hydrolyse van pyrofosfaat tot fosfaat	17
3.3.2 Versnellen kleurcomplexvorming van fosfaat met molybdovanadaat.....	20
3.3.3 Invloed van aardappelmedium op de molybdovanadaatmethode.....	22
3.3.4 Overzicht van de reactieprocedure voor de molybdovanadaatmethode	24
3.4 Ontwikkeling van een directe meetmethode voor bepaling pyrofosfaat: de turbiditeitsmethode (methode 4: zie tabel 3).....	25
3.4.1 Ontwikkeling van een directe meetmethode: de turbiditeitsmethode.....	26
3.4.2 De turbiditeitsmethode: Effect aardappelmedium op meting pyrofosfaat	27
3.5 Invloed van verschillende meetmethoden op bepaling pyrofosfaat in praktijkmonsters.....	29
4 Conclusies en vervolgonderzoek	30
5. Literatuur	32

Bijlage I t/m X

Samenvatting

Het doel van het project “Ontwikkeling van een snelle meetmethode voor pyrofosfaat ten behoeve van de aardappelverwerkende industrie” is het ontwikkelen van een snelle meetmethode om “at-line” pyrofosfaat in een dipunit te kunnen meten. Deze meetmethode zal de basis vormen voor de ontwikkeling van een “on-line” meetsysteem voor het pyrofosfaatgehalte in de dipunit. Het meten van het pyrofosfaatgehalte in de dipunit gedurende het proces biedt duidelijke voordelen op productkwalitatief, economisch en milieuhygiënisch niveau. Dit project maakt deel uit van een onderzoeksprogramma dat ATO-DLO voor de Vereniging Aardappelverwerkende Industrie (VAVI) uitvoert, mede gefinancierd door NOVEM-Milieu.

Fase 1 van het project bestaat uit de volgende onderdelen:

- 1. Inventarisatie van bruikbare systemen voor het meten van pyrofosfaat,
- 2. Selectie, ontwikkeling, optimalisatie en standaardisatie van een indirecte meetmethode voor pyrofosfaat,
- 3. Selectie, ontwikkeling, optimalisatie en standaardisatie van een directe meetmethode voor pyrofosfaat.

In de indirecte meetmethoden wordt pyrofosfaat bepaald na hydrolyse tot fosfaat en opeenvolgende kleuring van fosfaat met molybdaat. De directe methoden zijn gebaseerd op een complexvorming van pyrofosfaat met een geschikt (kleurings)reagens.

ad. 1. Inventarisatie van bruikbare systemen voor het meten van pyrofosfaat

Het doel van dit onderdeel is de selectie van een optimaal meetsysteem voor bepaling van pyrofosfaat. Aan de hand van een literatuuronderzoek en verkennende experimenten zijn enkele meetmethoden voor pyrofosfaat geselecteerd (zie tabel). Criteria voor de selectie van een geschikte meetmethode zijn: A. eenvoud en aantal bewerkingsstappen, B.analyseduur, C. verwachte kosten van detectiesysteem, D. verwachte kosten van reagentia (Hfl.), E. houdbaarheid van reagentia, F. effect van het “aardappelmedium” op de meting van pyrofosfaat, G. potentie voor on-line toepassing in aardappelverwerkende industrie.
(A-G corresponderen met de tabel)

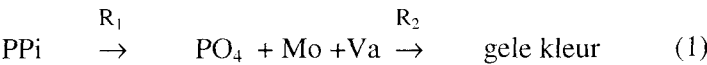
Tabel: Geselecteerde analysemethoden voor meting van pyrofosfaat in de dipunit

	A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.
Indirecte meetmethoden							
MB	+ / -	-	+	45.000	-	nb	-
MV	+	+	+	500	+	+	+
Directe meetmethoden							
TI	+	+	+	500	+	-	-
TU	+	+	+	2000	+	+	+

MB : molybdaatblauwmethode, MV: molybdovanadaatmethode, TI: titratiemethode, TU: turbiditeitsmethode, nb: niet bepaald

ad 2. Selectie, ontwikkeling, optimalisatie en standaardisatie van een indirecte meetmethode voor pyrofosfaat.

Het doel van dit onderdeel is het versnellen van de huidige (indirecte) molybdaatblauwmethode (enzymatische hydrolyse van pyrofosfaat). De molybdovanadaatmethode bestaat uit een hydrolysestap (R₁) van pyrofosfaat (PPi) tot fosfaat (PO₄), waarna fosfaat vervolgens reageert (R₂) met molybdaat (Mo) en vanadaat (Va) tot een geelgekleurd complex (1).



- Optimalisatie van hydrolysesnelheid (R_1) van pyrofosfaat tot fosfaat

Aan de hand van de hydrolyse van pyrofosfaat functie van de tijd, temperatuur en zuurgraad werden reactieconstanten van de kinetiek bepaald. Met deze reeactieconstanten is berekend en geverifieerd dat bij een temperatuur van 90°C en een zuurconcentratie van 2.5 M H_2SO_4 na 5 minuten 99% pyrofosfaat omgezet wordt.

- Versnelling van de complexvorming (R_2)

De complexvorming van fosfaat met molybdovanadaat is onder andere afhankelijk van de zuurconcentratie. Bij een eindconcentratie van 0.5 M H_2SO_4 is de complexvorming volledig na enkele seconden.

De totale meetmethode van pyrofosfaat kan “at-line” dus in principe minder dan 7 minuten in beslag nemen.

- Invloed aardappelmedium

Ongeacht de samenstelling van het aardappelmedium is de gemiddelde relatieve meetfout van deze methode kleiner dan 10%. De verklaarde variantie van het regressiemodel is 98%.

ad 3. Selectie, ontwikkeling, optimalisatie en standaardisatie van een directe meetmethode voor pyrofosfaat

Dit onderdeel beschrijft de ontwikkeling van een snelle directe meetmethode voor pyrofosfaat die weinig invloed van het aardappelmedium ondervindt.

In deze methode wordt pyrofosfaat (versneld) gecomplexeerd met mangaan, waarna de gevormde troebeling gestabiliseerd wordt met een verdikkingsmiddel. De extinctie van de ontstane troebeling kan spectrofotometrisch bepaald worden.

Isobutanol is de meest geschikte component om pyrofosfaat snel en volledig te complexeren.

Gelatine blijkt qua prijs en stabiliserende kwaliteit de meest geschikte stabilisator te zijn.

De totale meetmethode van pyrofosfaat kan “at-line” in principe minder dan 6 minuten in beslag nemen.

- Invloed aardappelmedium

Ongeacht de samenstelling van het aardappelmedium is de meetnauwkeurigheid ± 1.2 g/L. De verklaarde variantie van het regressiemodel is 98%.

De meetfout van zowel de molybdovanadaatmethode als de turbiditeitsmethode lijkt afhankelijk te zijn van het gebied waarin gemeten wordt. Afhankelijk van het gewenste meetbereik voor pyrofosfaat kunnen deze methoden verder geoptimaliseerd worden.

Voor (in)directe meting van pyrofosfaat is nog geen “on-line” meetapparatuur verkrijgbaar.

Applikon en Dr. Lange hebben de kennis in huis om op basis van het principe van de indirecte meetmethode totaal fosfaat te bepalen.

Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat er twee methoden zijn die potentie hebben om “at-line” pyrofosfaat te bepalen met de vereiste minimale frequentie van vier keer per uur. Deze methoden hebben eveneens de mogelijkheid om “on-line” toegepast te worden.

De oriënterende experimenten met aardappelmedia (nabootsing van de praktijksituatie in het dipbad) geven aan dat de samenstelling (celresten, zetmeel etc.) de nauwkeurigheid van de methode slechts in geringe mate beïnvloedt.

In Fase 2 zal onderzoek aan de nauwkeurigheid in de praktijksituatie worden vervolgd. Er zal aandacht besteed worden aan onder ander snelle voorbehandelingstechnieken en methode-optimalisatie ter verhoging van de nauwkeurigheid van de pyrofosfaatmetingen

1. Achtergrond en doel van het project

1.1 Probleemstelling

Grauwverkleuring is een ernstig kwaliteitsgebrek van voorgebakken frites. De potentie van de aardappel om grijs te verkleuren wordt bepaald door de grondstofkarakteristieken en het verwerkingsproces.

Grauwverkleuring wordt toegeschreven aan de reactie van ijzer met difenolen; in de aardappel is dit met name chlorogeenzuur. Er zijn ook aanwijzingen dat enzymatische reacties kunnen bijdragen aan grijsverkleuring. Deze enzymatische reactie is tot op zekere hoogte te voorkomen door intensiever te blancheren. Het meest effectieve middel om (niet-enzymatische) grijsverkleuring te voorkomen, is het dippen van de geblancheerde fritesstaafjes in een oplossing van pyrofosfaat.

De concentratie van pyrofosfaat in het dipbad en de potentie van de aardappelen om grijs te verkleuren bepalen samen het resultaat van de dipbehandeling. Momenteel gebeurt het toevoegen van pyrofosfaat op basis van een visueel oordeel van de voorgebakken frites. Hoewel dit tot op zekere hoogte zal leiden tot een goed product, is deze methode onbevredigend vanwege:

- slechte stuurbaarheid,
- weinig controle op effectiviteit van pyrofosfaat (kwaliteit van de frites),
- onnodige emissies van fosfaat in het milieu en extra belasting van afvalwaterzuivering.

De oorzaak van de meet- en regelproblematiek ligt in het feit dat pyrofosfaat niet stabiel is in het dipbad, maar onder invloed van temperatuur wordt afgebroken tot het inactieve orthofosfaat. Tot op heden is er geen betrouwbaar direct meetsysteem voor pyrofosfaat. Huidige labmethoden om pyrofosfaat te meten zijn gebaseerd op een verschilmeting, waarbij de orthofosfaatconcentratie bepaald wordt vóór en na enzymatische omzetting van pyrofosfaat tot orthofosfaat [1]. Omdat onder andere de kosten en de analyseduur van deze methode niet optimaal zijn, is voor toepassing in de aardappelverwerkende industrie verdere ontwikkeling van deze methode vereist.

1.2 Doel van het project

Ten behoeve van de aardappelverwerkende industrie wordt een instrumentele methode ontwikkeld voor het on-line meten van de pyrofosfaatconcentratie in de dipunit van de aardappelverwerkingslijn. Meting van pyrofosfaat in de dipunit staat indirect in relatie tot het meten van de potentie van de frites om grijs te verkleuren. Dit meetsysteem wordt in de eerste fase van dit project geselecteerd en geoptimaliseerd op basis van de gestelde randvoorwaarden tot een snelle en eenvoudige labexperimentele methode voor bepaling van pyrofosfaat.

Het project is voornamelijk gericht op het voorkomen en/of reduceren van de milieubelasting door gebruik van pyrofosfaat. Bij toepassing van het meetsysteem zal dan ook geen verschuiving plaatsvinden naar vervuiling met reagentia benodigd voor pyrofosfaatmeting.

1.3 Fasering

Dit project is onderverdeeld in twee fasen. In de eerste fase wordt een methode ontwikkeld voor het meten van pyrofosfaat. De ontwikkelde methode stelt de bedrijven in staat de pyrofosfaat-concentratie in het dipbad op eenvoudige wijze minimaal vier keer per uur te meten.

De eerste fase, methode-ontwikkeling, bestaat uit enkele onderdelen:

- 1.1 Inventarisatie van bruikbare systemen voor meting van (pyro)fosfaat.
- 1.2 Selectie, ontwikkeling en standaardisatie van een methode voor indirecte bepaling van pyrofosfaat.
- 1.3 Selectie, ontwikkeling en standaardisatie van een methode voor directe bepaling van pyrofosfaat.

De tweede fase van het project omvat een aantal activiteiten die nodig zijn voor praktische toepassing van de meetmethode. Deze activiteiten zijn:

- 2.1 Inpassen van de ontwikkelde methoden in een methode geschikt voor “at-line”. meting van pyrofosfaat in de aardappelverwerkende industrie.
- 2.2 Vaststellen van de specifieke eisen van het systeem met betrekking tot monsternamen uit het dipbad, monstervoorbereiding en monstergrootte.
- 2.3 Uitwerken van het concept in een prototype voor “on-line” toepassing (hierbij kan het nodig zijn een derde partner te betrekken).
- 2.4 Testen, optimaliseren en valideren van het “on-line” systeem.

Dit rapport bevat de resultaten van de werkzaamheden uitgevoerd in het eerste onderzoeksjaar.

Dit project maakt deel uit van een onderzoeksprogramma dat ATO-DLO voor de Vereniging Aardappelverwerkende Industrie (VAVI) uitvoert, mede gefinancierd door NOVEM-Milieu.

2. Onderzoeksaanpak

2.1 Opzet selectie analysemethoden voor pyrofosfaat

Middels een literatuuronderzoek is een inventarisatie gemaakt van verschillende methoden om pyrofosfaat en fosfaat te meten. Aan de hand van de volgende criteria is een selectie gemaakt van enkele indirecte en directe methoden om pyrofosfaat te meten:

- eenvoud van bewerkingsstappen,
- aantal verwerkingsstappen,
- kosten van detectiesysteem en van reagentia,
- potentie voor on-line toepassing.

In de indirecte meetmethoden wordt pyrofosfaat bepaald via een hydrolyse tot fosfaat en opeenvolgende kleuring van fosfaat met molybdaat. Vervolgens levert het verschil met een meting van de initiële fosfaatconcentratie de aanwezige pyrofosfaatconcentratie.

De directe meting zal gebaseerd zijn op een kleuring van pyrofosfaat met een “dye”, of een aanverwante meetmethode.

Na dit literatuuronderzoek zijn enkele, op het ATO-DLO beschikbare, meetmethoden gescreend op eenvoud, analyseduur, stabiliteit van de reagentia en geschiktheid voor “on-line” toepassing.

In verder experimenteel onderzoek en methode-ontwikkeling en optimalisatie werd met name aandacht besteed aan:

- versnelling van de hydrolyse van pyrofosfaat in fosfaat en versnelling van de kleurreactie met fosfaat voor de indirecte meetmethode,
- betrouwbaarheid, reproduceerbaarheid en het effect van het “aardappelmedium” op de meting van pyrofosfaat,
- kosten, veiligheid en houdbaarheid van reagentia,
- geschiktheid voor on-line toepassing.

2.2 Experimentele opzet voor ontwikkeling van de meetmethode voor pyrofosfaat

In deze paragraaf wordt ten eerste de opzet van de hydrolyse van pyrofosfaat in fosfaat beschreven. Het volgen van deze hydrolyse is van belang voor optimalisatie van de indirecte meetmethode voor pyrofosfaat (2.2.1).

Ten tweede worden de methoden beschreven voor het creëren van verschillende aardappelmedia om het effect van aardappelcomponenten op de pyrofosfaatbepaling na te gaan voor zowel de indirecte als de directe meetmethoden (2.2.2-2.2.4).

2.2.1 Hydrolyse van pyrofosfaat als functie van tijd, temperatuur en zuurgraad

In deze experimenten werd de omzetting van pyrofosfaat tot fosfaat gevolgd als functie van de tijd (0-10 minuten), de temperatuur (20°C-95°C), de zuurgraad (0-5 N) en het zuurtype (H₂SO₄, HCl). Fosfaat gevormd gedurende de zure hydrolyse werd gemeten volgens de methode beschreven in paragraaf 3.3.

2.2.2 Effect van “dipbad” medium op de meting van pyrofosfaat

Het effect van het dipbadmedium op de meting werd bepaald door aan alle hieronder beschreven media zuur pyrofosfaat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) toe te voegen (in een range van 0 tot 20 g/L). In deze media werd vervolgens met de geselecteerde meetmethoden het gehalte aan pyrofosfaat bepaald. Aardappels die in onderstaande experimenten werden gebruikt, werden met een messenschiller geschild en vervolgens mechanisch gesneden in staafjes van 10 bij 10 mm.

Simulatie van “dipbad” media

- Dipbadmedium ADi en BDi

Aardappelstaafjes (0.4 kg van cultivar Bintje en Agria) werden 10 minuten geblancheerd in 500 ml water bij 80°C. De geblancheerde fritesstaafjes werden vervolgens overgebracht in 500 ml water en nogmaals 10 minuten verhit bij 80°C (dipwater).

Het aldus verkregen blancheewater werd gebruikt als “dip” medium. Pyrofosfaat-oplossingen in “dip” media van Agria (1) en Bintje (3) werden respectievelijk Ai en Bi1, Bi2 en Bi3 genoemd.

- Dipbadmedium Z

Aardappelzetmeel werd in oplossingen van 0.5, 1 en 2% verstijfseld (66°C, 30 min.). In dit medium werden vervolgens oplossingen gemaakt van zuur pyrofosfaat in een range van 0.5 tot 20 g/l (medium Z).

- Dipbadmedium B, BM en BMi

De concentratie aan opgeloste aardappelcomponenten werd vergroot door maceratie (monsters BM) van geblancheerde aardappelstaafjes van cultivar Bintje (B). Op deze manier werd een aantal media gecreëerd, die de praktijksituatie benadert.

Maceratie van aardappelstaafjes

In de praktijk wordt een dipbad langdurig gebruikt (tot zes dagen, 24 uur per dag); het drogestofgehalte zal daardoor oplopen. De concentratie aan uitgeloopte stoffen en aardappelcellen werd in de simulatiemonsters verhoogd door gedipte aardappelstaafjes met het enzym polygalacturonase te macereren. De middenlamel van de aardappelcellen wordt door dit enzym afgebroken, waardoor een suspensie van losse intacte cellen ontstaat. Vervolgens werd bij 70°C geïncubeerd, resulterende in een destructie van aardappelcellen en vrijkomen van zetmeel. Het dipbadmedium (monster B) werd met 0.05M citraatbuffer op pH 4.0 gebracht. Aan 100 gram aardappelstaafjes werd 160 ml dipbadmedium toegevoegd en 1.0 ml Rohament P (enzym suspensie van endopolygalacturonase)-oplossing. De oplossing werd gedurende 1.5 uur bij 40°C en een snelheid van 180 rpm geschud. Na afloop werd de oplossing over een zeef gegoten en het filtraat (monster BM) opgevangen.

De invloed van dipbadmedium op de meting van de pyrofosfaatconcentratie is onderzocht door simulatie van “dipbadmedium” door behandeling aardappelstaafjes van cultivar Bintje volgens schema 1.

- Dipbadmedium BM en BMi

Monster BM werd verkregen door maceratie van aardappelstaafjes (zoals hierboven schreven). Het verschil met de hierboven beschreven monsters is, dat aardappelstaafjes ongeblancheerd zijn gemacereerd. Monster BMi werd verkregen door 2 uur incubatie van BM bij 70°C.

- Dipbadmedium uit de praktijk (P)

Aan een monster afkomstig van de industrie (P1) werd pyrofosfaat toegevoegd (0-20 g/L).

Schema 1: Simulatie van dipbadmedium

10 minuten Blancheren aardappelstaafjes bij 70°C

Monstercodering:



1 minuut Dikken aardappelstaafjes
(6 x 0.1 g/ml, 70°C)

(B)



1.5 uur Maceratie aardappelstaafjes
(0.625 g/ml, 40°C)

onverdund	(BM1)
2.5 x verdunnen	(BM2)
5 x verdunnen	(BM3)
10 x verdunnen	(BM4)



1.5 uur incubatie bij 70°C

(BMi)

2.2.3 Karakterisatie van “dipbad” monsters

De gesimuleerde “dipbad” monsters werden in sommige gevallen gekarakteriseerd met de volgende parameters:

- pH
- drogestofgehalte
- blauwwaarde-index
- deeltjesgrootte-verdeling

Bepaling blauwwaarde

De blauwwaarde is een maat voor de hoeveelheid vrij zetmeel, die vrij is gekomen bij destructie van aardappelcellen.

De monsteroplossing werd gedurende 5 minuten bij 66°C verhit en over een vouwfilter gefiltreerd. Van het filtraat werd 0.5 ml gepipetteerd in een reageerbuis, waarin zich 4.4 ml demiwater en 0.1 ml 0.02 N jodiumoplossing (8.74 mg KI/ml 0.02 N I₂-oplossing) bevond. De absorptie van de blauwkleuring werd bij 660 nm gemeten.

Deeltjesgrootte-bepaling

De deeltjesgrootte van de verschillende aardappelsuspensies werd instrumenteel bepaald met de Sympatec Helos RODOS.

Een overzicht van de karakterisering van de monsters is weergegeven in bijlage 8.

2.2.4 Effect van voorbehandeling monsters op pyrofosfaatbepaling

Praktijkmonster (P1) werd op verschillende manieren voorbehandeld:

- grof filter
- 0.45 µm filter
- centrifugatie (10 minuten, 10.000 g bij 4°C)

Vervolgens werd in het filtraat of supernatant het gehalte pyrofosfaat bepaald volgens de molybdovanadaatmethode, de molybdaatblauwmethode (enzymatische omzetting), de turbiditeitsmethode en de titratiemethode.

3. Resultaten

3.1 Inventarisatie van bruikbare systemen voor het meten van orthofosfaat en pyrofosfaat (literatuurstudie)

In dit onderdeel is een overzicht gemaakt van de analysemethoden beschreven in de literatuur voor het meten van ortho- en pyrofosfaat. Daarnaast is een onderzoek verricht naar commercieel verkrijgbare on-line meetsystemen voor het meten van orthofosfaat en totaal fosfaat.

In het rapport “Inventarisatie van bruikbare systemen voor het meten van orthofosfaat en pyrofosfaat” [3] staan deze resultaten in detail beschreven.

De meetprincipes zijn onder te verdelen in: precipitatiemethoden, kleuringmethoden, chromatografische methoden, gekoppelde enzymatische reacties, ion-selectieve elektroden en infraroodmetingen. Criteria voor geschiktheid van een analysemethode als on-line systeem zijn genoemd in 2.1.

Veel in de literatuur beschreven methoden om pyrofosfaat of fosfaat te bepalen zijn relatief zeer gevoelig; methodes zijn ontwikkeld om concentraties in $\mu\text{g/l}$ te detecteren [8, 9, 12]. Toepassing van deze methoden in het pyrofosfaaddipbad op industriële schaal, waar concentraties van 3 tot 10 gram per liter pyrofosfaat kunnen voorkomen, zou een monstervolume van enkele microliters of een zeer grote verdunningsstap inhouden. Een laag monstervolume heeft een lage nauwkeurigheid en een verdunningsproces is een extra stap in een al gecompliceerde methode. Het is dus nodig om een ontwerp en aanpassing te maken van een methode die meer is ingericht voor metingen van de relatief hoge concentraties pyrofosfaat (3-10 g/l) in het dipbad.

Aan de hand van de genoemde randvoorwaarden zijn drie indirecte en twee directe meetmethoden voor pyrofosfaat geselecteerd (tabel 1)

Tabel 1 Selectie van indirecte en directe meetmethoden voor pyrofosfaat

Indirecte meetmethoden		In:
1a	Hydrolyse van pyrofosfaat gevolgd door kleuring met molybdaatblauw	3.1.1
1b	Hydrolyse van pyrofosfaat gevolgd door kleuring met molybdovanadaat	3.1.1
2	Hydrolyse van pyrofosfaat en kleuring met molybdaatblauw in één stap	3.1.1
Directe meetmethoden		
3	Titratiemethode	3.1.2
4	Turbiditeitsmethode	3.1.2

De principes van de meetmethoden 1a, 1b en 2 worden beschreven in 3.1.1 en van de meetmethoden 3 en 4 in 3.1.2.

De meest toegepaste methoden om orthofosfaat te meten zijn de molybdaatblauwmethode en molybdovanadaatmethode. Alle bestaande on-line meters voor de bepaling van orthofosfaat zijn op één van deze twee kleuringsmethoden gebaseerd. Voor de bepaling van de pyrofosfaatconcentratie is geen industriële on-line meter commercieel verkrijgbaar. Wel wordt in de literatuur melding gemaakt van FIA (flow-injection-analysis)-systemen om pyrofosfaat te meten via een omzetting naar orthofosfaat (3.1.3).

3.1.1 Methoden voor indirecte bepaling van pyrofosfaat

Algemene methode: Hydrolyse van pyrofosfaat gevolgd door een kleuring met molybdaat (1: zie tabel 1)

Het algemene principe van de indirecte bepaling van pyrofosfaat is gebaseerd op een hydrolyse van pyrofosfaat tot fosfaat, waarna fosfaat reageert met molybdaat tot een gekleurd complex. Voor de bepaling van pyrofosfaat en fosfaat in oplossing wordt gebruik gemaakt van een verschilmeting; in de eerste meting wordt de fosfaatconcentratie bepaald en in de tweede meting wordt, na hydrolyse, van pyrofosfaat het totale gehalte aan fosfaat bepaald. Deze hydrolyse kan gerealiseerd worden met behulp van het enzym pyrofosfatase of met behulp van zure hydrolyse bij verhoogde temperatuur (zie 3.3.1). De hieronder beschreven methoden zijn beide gebaseerd op deze hydrolysestap, maar verschillen in de methode waarop het fosfaat vervolgens gekleurd wordt.

- Kleuring van fosfaat: molybdaatblauwmethode (**1a**: zie tabel 1)

De momenteel op het ATO-DLO toegepaste standaard methode om ortho- en pyrofosfaat in frites en pureevlokken/granules te bepalen maakt gebruik van de kleuringmethode volgens de molybdaatblauwmethode [1]. Het voordeel van deze methode is de enzymspecificiteit voor pyrofosfaat. Het nadeel is dat een verschilmeting nodig is en dat sommige (combinaties) van chemicaliën beperkt houdbaar zijn. Dit neemt niet weg dat het principe van deze kleuring veel gebruikt wordt in commerciële on-line meters om orthofosfaat te meten.

Principe van molybdaatblauwkleuring:

De molybdaatblauwmethode (volgens Boehringer, pyrofosfaat/fosfaat colorimetrische methode, 1989) methode is gebaseerd op het principe dat fosfaationen in een zure oplossing met molybdaationen reageren tot een fosfomolybdaat-complex. Dit complex kan met een geschikte reducerende component, bijvoorbeeld een combinatie van 4-methylaminofenolsulfaat en natriumdisulfiet, gereduceerd worden tot het gekleurde complex fosfomolybdaatblauw. De som van de hoeveelheid pyrofosfaat en fosfaat in de monsters moet tussen 12 en 360 mg $P_2O_7^{4-}$ (of PO_4^{3-}) per liter oplossing liggen.

De extinctie kan vervolgens worden gemeten bij 578 nm.

- Kleuring van fosfaat: molybdovanadaatmethode (**1b**: zie tabel 1)

Een alternatieve kleuringmethode die wordt toegepast in de vleeswarenindustrie voor de bepaling van orthofosfaat is de molybdovanadaat methode. Deze methode wordt ook veel toegepast in on-line meters voor orthofosfaat. Om het gehalte aan pyrofosfaat vast te stellen moet een verschilmeting worden uitgevoerd op monsters behandeld met en zonder pyrofosfatase [2].

Principe van molybdovanadaatkleuring:

De molybdovandaatmethode is gebaseerd op het principe dat fosfaationen in een zwakzure oplossing met molybdaationen en vanadaationen reageren tot een geelgekleurd complex. In het juiste meetbereik is de fosfaatconcentratie evenredig met de intensiteit van het gevormde complex en kan fotometrisch gemeten worden tussen 360 en 420 nm.

De experimentele procedures staan in detail vermeld in bijlage 1 en 2.

Methode van Rouser et al.: Hydrolyse van pyrofosfaat en kleuring met molybdaatblauw in één stap (2: zie tabel 1)

Een andere variant op de bepaling van pyrofosfaat is de methode afgeleid van Rouser et al. [4]. In deze methode worden fosforbevattende componenten gehydrolyseerd met perchloorzuur. De gevormde fosfaten vormen een complex met molybdaat en kunnen vervolgens gereduceerd worden met ascorbinezuur tot een blauwgekleurde verbinding, waarvan de intensiteit bij 797 nm gemeten kan worden. In deze methode zouden hydrolyse van pyrofosfaat en kleuring van fosfaat in één stap plaats kunnen vinden (bijlage 4).

3.1.2 Directe meting van pyrofosfaat

Terugtitratie na precipitatie met zinksulfaat (3: zie tabel 1)

Principe

Bij deze methode wordt pyrofosfaat geprecipiteerd met zinkionen. De hoeveelheid vrijgekomen waterstofionen bij deze reactie is een maat voor de hoeveelheid pyrofosfaat en wordt bepaald door terugtitratie met 0.05 N natronloog (bijlage 5).

De titratiemethode wordt bij sommige bedrijven reeds toegepast. Deze methode is eenvoudig en snel. Het nadeel van deze methode is dat de pyrofosfaatmeting sterk wordt beïnvloed door bufferende stoffen afkomstig uit de aardappel.

Turbiditeitsmethode (4: zie tabel 1)

Principe

Een directe methode om pyrofosfaat te bepalen is door pyrofosfaat selectief neer te slaan met mangaan (Mn)-ionen. Deze methode is speciaal ontwikkeld voor de bepaling van pyrofosfaat in blancheerwater [5]. De precipitatievorming kan versneld worden door toevoegen van een component met een lage diëlectrische constante, zodat een snelle en volledige precipitatie bereikt wordt. De gevormde "troebeling" wordt gestabiliseerd door toevoegen van een stabilisator of verdikkingsmiddel, zoals bijvoorbeeld gelatine of guar gom. De absorptie van deze troebeling kan gemeten worden bij 625 nm.

Een gedetailleerd protocol is gegeven in bijlage 3.

3.1.3 Andere methoden voor bepaling van pyrofosfaat

Op basis van de genoemde selectiecriteria zijn de volgende methoden niet verder gespecificeerd in dit rapport. Chromatografische methoden lijken ongeschikt voor on-line toepassing vanwege kosten en analyseduur. Ion-selectieve elektroden zijn niet selectief genoeg voor pyrofosfaat en hebben zich nog onvoldoende bewezen. Infraroodmeting is ongeschikt voor meting in waterige oplossing.

Enkele andere directe methoden staan vermeld in bijlage 6. Op basis van de selectiecriteria is besloten deze methoden niet verder uit te zoeken.

3.1.4 Commercieel verkrijgbare on-line fosfaatmeters

On-line meters voor bepaling van orthofosfaat en / of totaal fosfaat

Commercieel verkrijgbare on-line meters voor orthofosfaat bezitten een hoge gevoeligheid en maken daarom voor de beoogde toepassing een verdunning van het monster noodzakelijk. De prijzen van de on-line meters variëren in de range van Hfl. 20.000,- tot Hfl. 70.000,- [6]. De operationele kosten variëren volgens Thomsen en Kisbey [6] van Hfl. 600,- tot Hfl. 5000,- per jaar.

Alle commerciële on-line meters maken gebruik van de molybdaatblauw methode of de molybdovanadaat methode (tabel 2).

Tabel 2. Specificatie van commercieel verkrijgbare on-line meters voor orthofosfaat en totaal fosfaat

Model		Meetprincipe	Meetbereik mg/L fosfaat	Cyclustijd (minuten)	
				Fosfaat	Totaal fosfaat
1	Applikon ADI 2014/2015	MB ¹	0-30	10	10
2	Bran&Luebbe Monitor 90	MB	0-300	15	n.v.t.
3	Dr. Lange Phosphax-inter	MV ²	0-45	5	10
4	Hach/Aquapur Series 5000 model 60001	MV/MB	0-150	11	n.v.t.
5	Hydrochem Fosfa-tec AT5002	MV	0-90	15	n.v.t.
6	ME Meerestechnik AP 5003	MB	0-300	10	n.v.t.

¹ MB, molybdaatblauwmethode, ² MV, molybdovanadaatmethode

On-line meters voor bepaling van pyrofosfaat.

On-line meters voor directe meting van pyrofosfaat zijn niet commercieel verkrijgbaar. In de literatuur zijn wel Flow-Injectie-Analyse (FIA)-systemen bekend om on-line pyrofosfaat te meten. De meeste FIA-systemen bepalen pyrofosfaat na hydrolyse tot orthofosfaat.

FIA-systemen zijn vaak niet robuust genoeg om in een industriële omgeving dienst te doen: voor de uiteindelijke toepassing is een industriële on-line meter vereist.

Voor (in)directe meting van pyrofosfaat bestaat nog geen commerciële on-line meter. Applikon en Dr. Lange hebben de technische kennis om via een destructie-unit totaal fosfaat te bepalen. Deze methoden zijn er echter op ingericht om fosfaatgehalten in afvalwater te meten. Dit houdt in dat de methoden een relatief laag meetbereik hebben. Tevens meten deze methoden totaal fosfaat (inclusief organisch gebonden fosfaat) in plaats van pyrofosfaat. Er zullen dus aanpassingen nodig zijn op toegepaste methode en / of de voorbehandeling van het monster (bijvoorbeeld verdunningsunits). Het is echter mogelijk een on-line meter voor pyrofosfaat op maat te laten maken op basis van een bestaande of te ontwikkelen analysemethode.

De on-line meting op basis van een verschilmeting via hydrolyse van pyrofosfaat (indirecte meetmethode) zal bestaan uit de volgende analysestappen gedurende één cyclus:

- 1 monsterneming 1
- 2 monstervoorbereiding 1(eventueel)
- 3 destructie van het monster voor bepaling pyrofosfaat + fosfaat
- 4 kleuring van monster 1
- 5 monsterneming 2
- 6 monstervoorbereiding 2 (eventueel)
- 7 kleuring van monster 2
- 8 spoelen van systeem

De kosten voor dergelijke apparaten zullen liggen in de orde van grootte van Hfl. 50.000 en Hfl. 100.000.

3.2 Verkenning en ontwikkeling van bepalingsmethoden voor pyrofosfaat

Aan de hand van de in 2.1 genoemde criteria is een selectie gemaakt van enkele methoden om pyrofosfaat te meten. Deze meetmethoden staan nogmaals opgesomd in tabel 3.

Tabel 3 Selectie van indirecte en directe meetmethoden voor pyrofosfaat

Indirecte meetmethoden		In:
1a	Hydrolyse van pyrofosfaat gevolgd door kleuring met molybdaatblauw	3.2.1
1b	Hydrolyse van pyrofosfaat gevolgd door kleuring met molybdovanadaat	3.3
2	Hydrolyse van pyrofosfaat en kleuring met molybdaatblauw in één stap	3.2.2
Directe meetmethoden		
3	Titratiemethode	3.2.3
4	Turbiditeitsmethode	3.4

Deze methoden zullen nog getest en eventueel geoptimaliseerd moeten worden op de volgende criteria:

- analyseduur, met name het versnellen van de hydrolyse van pyrofosfaat in fosfaat voor de indirecte meting en versnelling van de kleurreactie van fosfaat,
- kosten, veiligheid en houdbaarheid van reagentia,
- betrouwbaarheid, reproduceerbaarheid en het effect van het "aardappelmedium" (storende componenten uitgeloozd uit aardappelproducten) op de meting van pyrofosfaat,
- geschiktheid voor on-line toepassing.

In eerste oriënterende experimenten zijn enkele beschikbare methoden (1a, 2 en 3) getest op de geschiktheid voor meting van pyrofosfaat. Meetmethoden 1b en 4 zijn in een latere fase getest en geoptimaliseerd.

3.2.1 Molybdaatblauwmethode met enzymatische hydrolyse (methode 1a: zie tabel 2)

De molybdaatblauwmethode bestaat uit een (enzymatische) hydrolyse (R₁) van pyrofosfaat (PPi) tot fosfaat, waarna fosfaat reageert (R₂) met molybdaat (Mo) en een reductor (Red) tot een blauwgekleurd complex (1).



De reactie R₁ vindt plaats met behulp van het enzym pyrofosfatase. Industriële toepassing van dit enzym voor kwantificering van pyrofosfaat is prijstechnisch niet haalbaar. Daarom zal gekeken worden naar de mogelijkheid om pyrofosfaat via een zure hydrolyse om te zetten en vervolgens te meten (zie 3.3.1 voor verdere uitwerking en optimalisatie van deze zure hydrolyse).

Enkele karakteristieken van deze meetmethode staan vermeld in tabel 4.

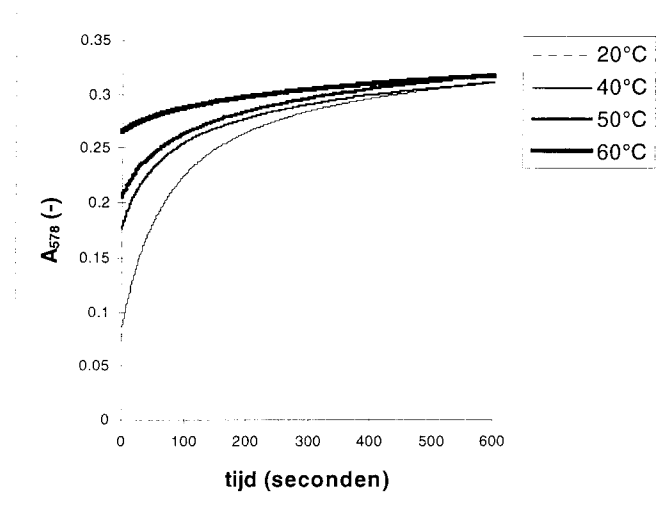
Tabel 4 Parameters van de molybdaatblauwmethode.

Parameter				
Gevoeligheid ε (M fosfor cm ⁻²)		variabel ± 0.13*10 ³		
Meetbereik		1-18 mg/L (PO ₄ ³⁻ of P ₂ O ₇ ⁴⁻)		
Verdunningsfactor		minimaal 10* verdunnen		
Minimale analyseduur (minuten)			20°C	60°C
	R1	hydrolyse pyrofosfaat	5	2
	R2	kleuring totaal fosfaat	10	
		kleuring vrij fosfaat	10	
		totaal	25	17
Operationele kosten*		± Hfl. 45.000,-		

* berekend op jaarbasis bij 4 keer per uur bepalen van pyrofosfaat

Snelheid van de kleuringreactie.

De reactietijd van R₂ is bij 20°C ongeveer 10-15 minuten.
De vereiste cyclustijd voor toepassing van de meting in de industrie is 15 minuten. Toepassing op industriële schaal vereist dus, afhankelijk van de snelheid van R₁, een versnelling van de complexvorming van de reagentia met fosfaat. Deze versnelling kan gerealiseerd worden door verhoging van de temperatuur (zie figuur 1).



Figuur 1. Fosfomolybdaatblauwkleuring als functie van de tijd en de temperatuur

In deze figuur is het duidelijk dat door verhogen van temperatuur naar 60°C de complexvorming van fosfaat na 2 minuten vrijwel volledig is. Echter bij deze temperatuur en zuurtegraad (0.5 N HCl) zal bij de meting van fosfaat het aanwezige pyrofosfaat gedeeltelijk hydrolyseren, wat resulteert in een onderschatting van het gehalte pyrofosfaat. Ook is in deze grafiek te zien dat we te maken hebben met een “non-endpoint” kleuring: dit houdt in dat de kleuring langzaam verder verloopt, doordat de overmaat molybdaat een kleuringsreactie aan kan gaan met andere molybdaationen.

Houdbaarheid van de kleuringreagentia

Een nadeel van de huidige methode is dat de reagentia beperkt houdbaar zijn. De kwaliteit van de reagentia voor R₂ zijn sterk onderhevig aan oxidatie; deze reagentia dienen onder koeling bewaard (4°C) te worden. Dit resulteert in sterke variatie in absolute waarden afhankelijk van reagens samenstelling, wat regelmatige controlemetingen noodzakelijk maakt. Een probleem voor on-line toepassing van deze meetmethode is tevens het gebruik van meerdere afzonderlijk te bewaren reagentia.

3.2.2 Methode van Rouser et al.: Hydrolyse en kleuring in één stap (methode 2: zie tabel 3)

De methode volgens Rouser et al. [4] is gebaseerd op hetzelfde principe als de molybdaatblauwmethode (zie (1)). Echter, in deze methode vindt de hydrolyse, R₁, en de kleurvorming, R₂, gelijktijdig plaats. De reductor is in deze methode ascorbinezuur. Ook dit agens heeft slechts een beperkte houdbaarheid: ongeveer vier weken bij 4°C.

Snelheid van de reactie

De kleurvorming is in deze methode volledig na 2 minuten verhitten bij 95°C. De totale reactiesnelheid wordt echter beperkt door de omzetting van pyrofosfaat tot fosfaat: in 1.7 M perchloorzuur is deze volledig na 5 minuten.

Deze methode is direct geschikt voor de bepaling van het totale fosfaat gehalte (pyrofosfaat plus fosfaat). Voor de bepaling van fosfaat kan deze methode niet gebruikt worden, aangezien onder de reactie-omstandigheden pyrofosfaat wordt afgebroken. Hierdoor is tevens een andere methode nodig om fosfaat te bepalen.

Tabel 5. Parameters van de molybdaatblauwmethode.

Parameter			
Gevoeligheid ε (M fosfaat cm ⁻²)	variabel ± 0.5*10 ³		
Meetbereik	4-142 mg/L (PO ₄ ³⁻ of P ₂ O ₇ ⁴⁻)		
Verdunningsfactor	minimaal 30* verdunnen		
Minimale analyseduur (minuten)	R ₁ + R ₂	• hydrolyse en kleuring pyrofosfaat + fosfaat	5
		• kleuring fosfaat andere methode	10
		totaal	15
Operationele kosten*	± Hfl. 1500,-		

* berekend op jaarbasis bij 4 keer per uur bepalen van pyrofosfaat

Naar aanleiding van de verkennende experimenten van bovenstaande methoden, 1a, 1b en 3 (zie tabel 3) is het duidelijk dat de beschreven methoden nog geoptimaliseerd en aangepast moeten worden ten aanzien van analyseduur, gebruik van reagentia en verwerkingsstappen. Voor “at-line” en “on-line” toepassing is het gewenst om gebruik van instabiele en veel verschillende reagentia zoveel mogelijk te mijden.

Ook moet de methode qua gevoeligheid aansluiten op de concentratie waarin het pyrofosfaat op industriële schaal gebruikt wordt (3-10 g/L).
Op basis van bovengenoemde nadelen is besloten deze methoden verder niet uit te diepen.

3.2.3 Terugtitratie na neerslag met zinksulfaat (methode 3: zie tabel 3)

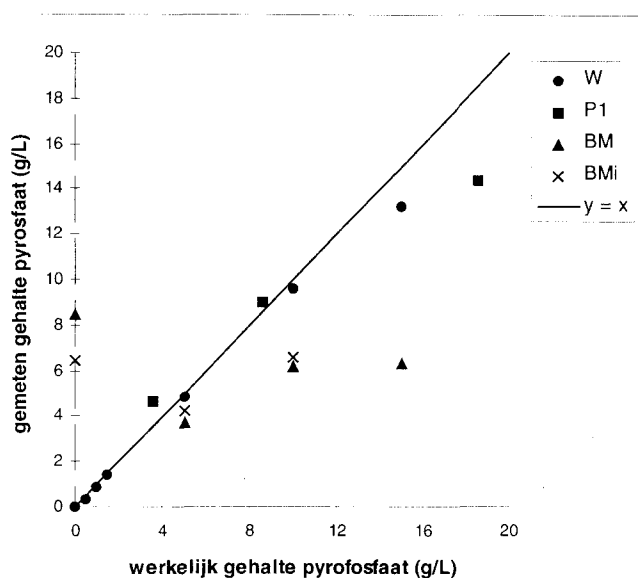
Pyrofosfaat kan gemeten worden door een neerslag te vormen van zink met zuur pyrofosfaat en de vrijkomende protonen terug te titreren met loog naar een referentie pH.
In figuur 2 zijn de resultaten weergegeven van het gehalte gemeten pyrofosfaat als functie van het verrijkte gehalte pyrofosfaat.
In de figuur zijn gemiddelde waarden van ijkreeksen (0.5 tot 15.0 g/l Na₂H₂P₂O₇) weergegeven van drie typen monsters die een aardappelmatrix bevatten en van een standaardreeks in water. De variatie tussen duplobepalingen lag tussen 1 en 2%.

- Ijkreeks in water
Voor de watermonsters (W) kan de concentratie pyrofosfaat (1 tot 15 g/l), met een onderschatting van maximaal 10% van de verwachte waarde bepaald worden. Wanneer monsters alleen pyrofosfaat bevatten, kan de concentratie dus met een redelijke nauwkeurigheid bepaald worden.
- Ijkreeks van gesimuleerde dipbadmonsters
Monster BM en BMi (drogestofgehalte 3.5%) zijn gesimuleerde dipbadmonsters. BM bevat intacte losse aardappelcellen afkomstig van enzymatisch gemacereerde aardappelstaafjes van cv. Bintje (zie 2.2.2). Monster BMi bevat veel vrij zetmeel (voor verdere karakterisering zie bijlage 8). In figuur 2 is te zien dat wanneer géén pyrofosfaat is toegevoegd, met de titratiemethode wél pyrofosfaat bepaald wordt (> 6 g/l). Monster BM en BMi laten een sterke afname in de “recovery” zien met toenemende concentratie pyrofosfaat. Deze trend wordt veroorzaakt door bufferende componenten in het aardappelmedium.
- Ijkreeks in praktijkmonster
Figuur 2 geeft weer dat pyrofosfaat in praktijkmonster P1 (drogestofgehalte 1.5%) met een afwijking van 12 tot 35% van de verwachte waarde bepaald kan worden.

De blanco-waarde (zonder pyrofosfaat-additie) bepaald met deze methode is 4.6 g/l en geeft een afwijking van 28% vergeleken met de concentratie pyrofosfaat bepaald met de molybdovanadaat-methode (3.6 g/l). Deze afwijking wordt veroorzaakt door bufferende componenten die uit de aardappel geloofd (bijvoorbeeld organische zuren) zijn en andere zure verbindingen zoals fosfaat.

In de simulatie monsters is de invloed van het aardappelmedium op de titratiemethode hoger dan in het praktijkmonster. De nauwkeurigheid van de methode hangt dus af van het drogestofgehalte. Mogelijk is de nauwkeurigheid van deze methode te verbeteren door de concentratie aan uitgeloopte aardappelcomponenten tot een minimum te beperken.

Omdat een blanco-waarde, dat wil zeggen een monster zonder de aanwezigheid van pyrofosfaat, in de praktijk moeilijk bepaald kan worden, kan geconcludeerd worden dat de aanwezigheid van bufferende en zure componenten in het aardappelmedium het aantonen van pyrofosfaat met deze titratiemethode vooralsnog onmogelijk maakt.



Figuur 2. Gemeten gemiddelde gehalte pyrofosfaat als functie van de werkelijke hoeveelheid pyrofosfaat (g/L). Standaardadditie van pyrofosfaat in W: watermonsters, P1: praktijkmonster, BM en Bmi: gesimuleerde dipmedia (2.2.2)

Op grond van deze verkennende indirecte en directe meetmethoden voor pyrofosfaat is het duidelijk geworden welke gebieden nog geoptimaliseerd moeten worden om tot een bruikbare methode te komen. Enkele bottlenecks bij toepassing zijn nog analyseduur, meetbereik, houdbaarheid en veiligheid van de reagentia en betrouwbaarheid en nauwkeurigheid van de meting in dipbadmedium. Op deze bottlenecks zal in de verdere methode-ontwikkeling van de indirecte (paragraaf 3.3) en directe (paragraaf 3.4) meetmethoden ingegaan worden.

3.3 Verdere ontwikkeling van de indirecte meetmethode van pyrofosfaat: molybdovanadaatmethode (methode 2: zie tabel 3)

Doel

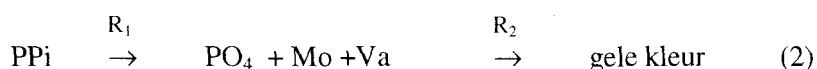
Versnellen van de huidige indirecte meetmethoden (molybdaatblauwmethode) voor pyrofosfaat.

Aanpak

De verkennende experimenten van enkele indirecte meetmethoden geeft aan dat kan worden ingeleverd op de gevoeligheid van de methode, omdat pyrofosfaat in het dipbad in de praktijk in relatief hoge concentraties (3-10 g/l) voor kan komen. Ook is behoefte aan een methode die gebruik maakt van zowel weinig verschillende als oxidatie-ongevoelige reagentia.

De totale analyseduur van de molybdaatblauwmethode (25 minuten bij 20°C) moet gereduceerd worden tot een maximale cyclustijd van 15 minuten. Een methode die mogelijk aan deze eisen kan voldoen is de molybdovanadaatmethode (2). In deze methode is een volgende stap dan ook het versnellen en vereenvoudigen van de totale pyrofosfaatmeting.

De molybdovanadaatmethode bestaat uit een hydrolysestap (R₁) van pyrofosfaat (PPi) naar orthofosfaat (PO₄), die afhankelijk van temperatuur en zuurtegraad een bepaalde tijd in beslag neemt (2).



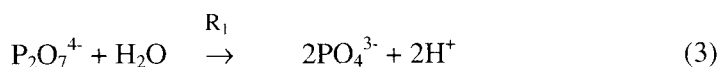
Een mogelijkheid voor de versnelling van de pyrofosfaatmeting ligt, in de eerste fase, in het optimaliseren van de pyrofosfaathydrolyse (3.3.1). De tweede stap in de pyrofosfaatmeting is de complexvorming (R₂) van molybdaat (Mo) en vanadaat (Va) met het gevormde orthofosfaat. In de tweede fase zal de versnelling van de complexvorming worden onderzocht (3.3.2).

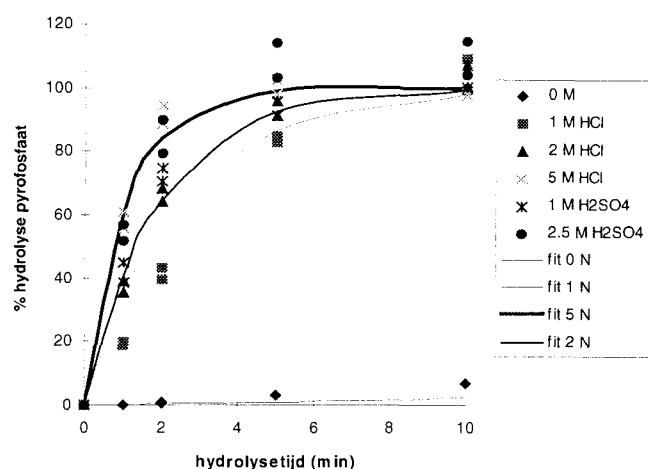
Verder zal ook nagegaan moeten worden of er aardappelcomponenten in het dipbadmedium aanwezig zijn, die de hydrolyse- of molybdaatkleurreactie zouden kunnen verstoren (3.3.4). Hierbij kan men denken aan organisch gebonden fosfaten en oxiderende en / of reducerende componenten die de kleuring kunnen beïnvloeden.

3.3.1 Versnelling van de hydrolyse van pyrofosfaat tot fosfaat

Reactie R1 in de molybdovanadaatmethode, de omzetting van pyrofosfaat naar orthofosfaat (3), werd gevolgd als functie van:

- de temperatuur
- de zuurconcentratie (HCl en H₂SO₄)





Figuur 3. Percentage gehydrolyseerd pyrofosfaat uitgezet als functie van de tijd en de zuurconcentratie (bij 90°C). De doorgetrokken lijnen geven de voorspelde waarden op basis van 1^{ste} orde kinetiek

In figuur 3 is het percentage gehydrolyseerd pyrofosfaat weergegeven als functie van de tijd en de zuurconcentratie (bij 90°C). Uit deze figuur is duidelijk dat pyrofosfaat in water of in gebufferd milieu (◆; 0 M HCl) slechts langzaam wordt afgebroken: zelfs bij 90°C is het percentage gehydrolyseerd pyrofosfaat kleiner dan 10% na 10 minuten.

De afbraaksnelheid van pyrofosfaat neemt toe naarmate het milieu zuurder wordt en de temperatuur toeneemt. Bij 90°C en 5 N zuur is de afbraak van pyrofosfaat vrijwel volledig na minder dan 5 minuten verhitten. De hydrolyse-snelheid van pyrofosfaat met zwavelzuur is vergelijkbaar met die van HCl.

Hydrolysekinetiek als functie van zuurgraad en temperatuur

Aan de hand van onder andere de gegevens uit figuur 3 werden parameters voor de reactiekinetiek bepaald.

De afbraak van pyrofosfaat wordt gegeven door:

$$C_t = C_0 * \exp[-k * t]$$

Tevens wordt aangenomen dat temperatuursafhankelijkheid van de reactieconstante k beschreven kan worden met de Arrhenius vergelijking:

$$k = k_0 * \exp\left[\frac{-E_a}{R * T}\right]$$

waarin C_t = concentratie van pyrofosfaat op tijdstip t
 C_0 = concentratie van pyrofosfaat op tijdstip 0
 k = reactieconstante (1/minuten)
 k_0 = evenredigheidsfactor (1/minuten)
 E_a/R = activeringsenergie / universele gasconstante (K)
 T = reactietemperatuur (K)

Met behulp van de experimentele gegevens kan de meest ideale temperatuur en pH voor een snelle hydrolyse van pyrofosfaat tot fosfaat geëxtrapoleerd worden.

Aan de hand van de experimentele gegevens over de hydrolyse als functie van verschillende temperaturen werden de reactieconstanten bij verschillende concentraties zuur bepaald:

Tabel 6. Reactieconstanten k_0 (min^{-1}) en E_a/R (K) bij verschillende concentraties zuur

	$\ln(k_0)$ (min^{-1})	$-(E_a/R)$ (K)
0.5 N zuur	35.2	13690
1 N zuur	30.3	11796
2 N zuur	24.7	9410
5 N zuur	20.0	7297
water	24.5	11100

Op basis van deze reactieconstanten kan berekend worden bij welke temperatuur en bij welke concentratie zuur een voldoende snelle omzetting van pyrofosfaat naar orthofosfaat bewerkstelligd kan worden.

Bij een temperatuur van 90°C en 5 N zuur kunnen we berekenen dat na $t_r = 5$ minuten 99% pyrofosfaat is omgezet (berekening: zie bijlage 7).

Eventueel kan toevoeging van een katalysator de reactiesnelheid nog verder opvoeren. Het is bekend dat de toevoeging van het oxiderende agens peroxodisulfaat de reactie kan versnellen [7]. Echter dit agens blijkt ook invloed op de oxidatietoestand van het gevormde fosfomolybdovanadaatcomplex te hebben. Het effect van de katalysator peroxodisulfaat is in het molybdovanadaatsysteem verwaarloosbaar klein onder “standaard”-hydrolyse condities (2.5 M H_2SO_4 bij 90-95°C).

Mogelijkheden om hydrolyse van pyrofosfaat momentaan stop te zetten

Het is eventueel ook mogelijk om de zure hydrolyse na bepaalde tijd stop te zetten en initiële concentraties met behulp van reactieconstanten terug te rekenen. Hiervoor is echter een goed-gecontroleerd proces nodig; er moeten onder andere eisen gesteld worden aan de controle van temperatuur en zuurgraad. Ook zullen dan de kinetische parameters de omzetting van pyrofosfaat tot fosfaat voldoende nauwkeurig moeten kunnen beschrijven.

Volgens een voorspelling met een niet-lineair regressiemodel (berekend in Genstat) kan de hydrolyse van pyrofosfaat tot fosfaat voor 98% verklaard worden. Dit houdt in dat de hydrolyse eventueel ook momentaan gestopt kan worden (bijvoorbeeld snel afkoelen van het monster tot kamertemperatuur door verdunnen in water).

Op basis van het model voor voorspelling van pyrofosfaathydrolyse kan vervolgens de initiële pyrofosfaatconcentratie berekend worden. Een nadeel hiervan is dat het monster zich nog steeds in een (zwak) zuur milieu bevindt, waardoor hydrolyse langzaam verder zal verlopen; als dit afkoelen ongecontroleerd verloopt zullen er grotere meetfouten ontstaan. Hiervoor zullen procescondities, met name temperatuur, goed gecontroleerd moeten zijn.

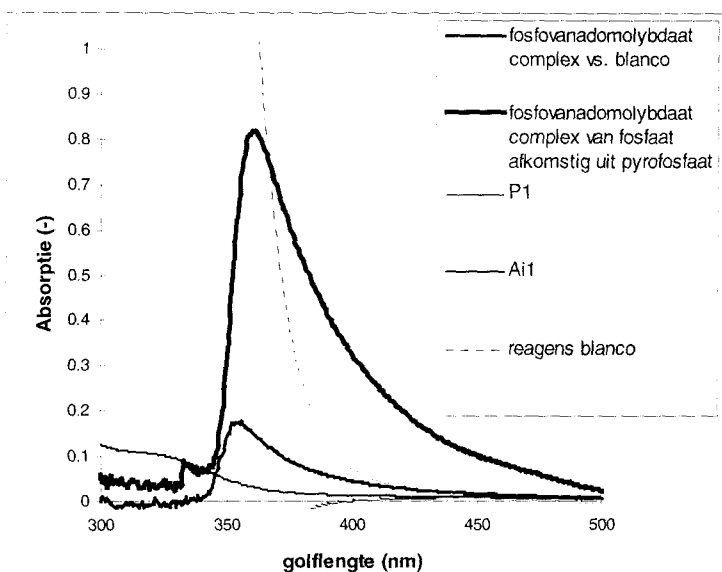
Aangezien onder genoemde condities een snelle hydrolyse van pyrofosfaat tot fosfaat (in 5 minuten) bewerkstelligd kan worden, is afgeweken van een deel van de werkzaamheden omschreven in het onderzoeksvoorstel (namelijk mogelijkheden onderzoeken voor het momentaan stopzetten van de reactie).

3.3.2 Versnellen kleurcomplexvorming van fosfaat met molybdovanadaat

Karakteristieken van kleurcomplexvorming en absorptie

In 3.2 hebben we gezien dat de kleurvorming van fosfaat met molybdaat relatief traag verloopt bij kamertemperatuur. De kleurcomplexvorming van fosfaat met molybdaat blijkt afhankelijk te zijn van temperatuur en samenstelling van de kleurende reagentia.

In figuur 4 is de complexvorming van fosfaat met molybdaat en vanadaat weergegeven. Tevens is het absorptiepatroon van enkele praktijkmonsters weergegeven.

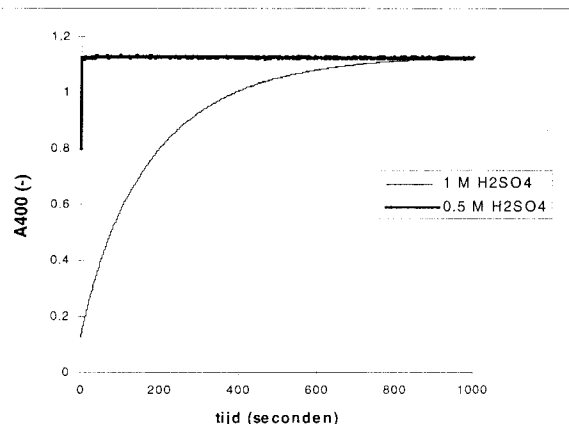


Figuur 4. Spectrale karakteristieken van het fosfovanadomolybdaat complex en enkele aardappelmedia (beschrijving van praktijkmonster P1 en simulatie dipbadmonster Ai1 in 2.2.2)

In deze figuur is te zien dat het spectrum van het fosfovanadomolybdaatcomplex zich uitstrekt tot in het zichtbare gebied (> 340 nm), zodat metingen verricht kunnen worden met een relatief goedkope tungsten-lamp colorimeter. In verdere experimenten is besloten om metingen te verrichten bij 400 nm., omdat het verschil tussen monsters en blanco absorptie bij deze golflengte maximaal is en de absorptie van de gele kleur van de aardappelmonsters (P1 en Ai1) minimaal is.

Snelheid van de kleurvorming

In de molybdovanadaatmethode wordt het gevormde lichtgeel gekleurde fosfomolybdaatcomplex geïntensiveerd met vanadaat. Voor zowel de omzetting van pyrofosfaat tot fosfaat als de kleurvorming van fosfaat met molybdaat is de aanwezigheid van een zuur milieu vereist. Echter de aanwezigheid van zuur heeft invloed op de snelheid van de complexvorming (zie figuur 5).

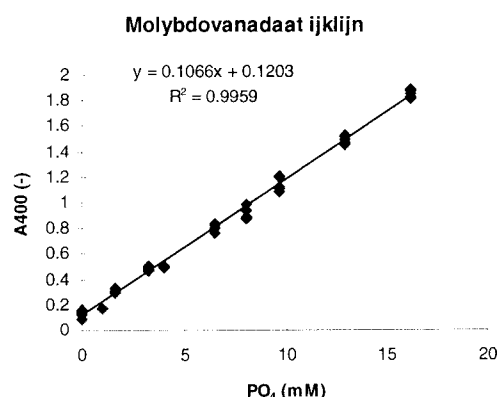


Figuur 5. Invloed van de zuurconcentratie in reactiemengsel op de snelheid van de complexvorming.

In deze figuur is te zien dat met een eindconcentratie van 0.5 M zwavelzuur de complexvorming volledig is na enkele seconden (bij kamertemperatuur). De kleur is vervolgens minimaal 2 uur stabiel.

Houdbaarheid van de reagentia

Het voordeel van een langere houdbaarheid van de reagentia is dat er minder vaak ijkmetingen bepaald hoeven worden. De reproduceerbaarheid van de molybdovanadaatijklijnen is bepaald door over een periode van vier maanden reagentia van deze methode te testen op hun respons bij 400 nm (figuur 6). In deze ijklijn is de variatie in reagentia, fosfaatoplossingen en bewaarduur opgenomen. Variatie in reagentia, fosfaatoplossingen en bewaarduur blijken nauwelijks invloed op de trend van de molybdovanadaatijklijn. Het percentage verklaarde variantie met deze regressielijn is ongeveer 100%; op deze manier is het mogelijk om een universele ijklijn te produceren die slechts incidenteel gecheckt hoeft te worden.



Figuur 6. Variatie in absorpties van molybdovanadaatcomplex bepaald als functie van de fosfaatconcentratie

3.3.3 Invloed van aardappelmedium op de molybdovanadaatmethode

Karakterisatie van dipbadmonsters

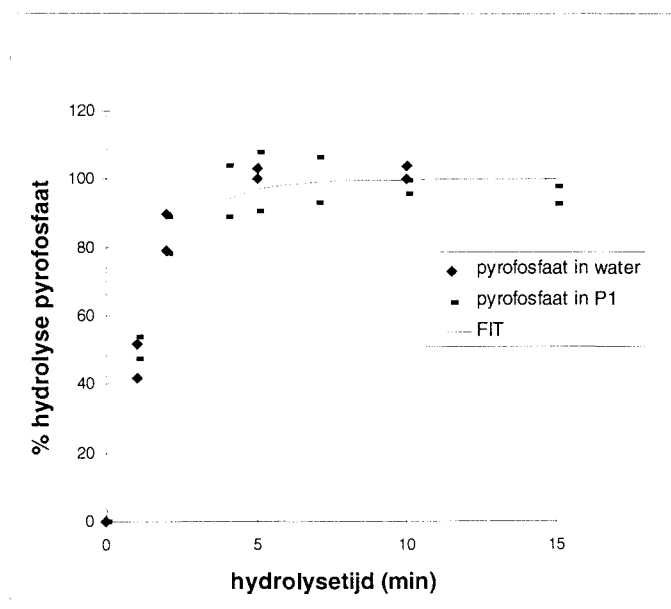
Zoveel mogelijk verschillende aardappelmedia zijn gecreëerd, variërend in verwerkt ras, concentratie aardappelcomponenten en type voorbehandeling. Enkele parameters om deze monsters te karakteriseren waren: drogestofgehalte, blauwwaarde, deeltjesgrootteverdeling en pH. Daarbij werden situaties nagebootst, die extreme waarden van deze omschrijvende parameters bezitten. Een overzicht van deze resultaten is weergegeven in bijlage 8.

De gesimuleerde dipbadmonsters hebben een breed bereik wat betreft deeltjesgrootte verdeling, drogestof gehalte en gehalte vrij amylose. Een geanalyseerd praktijkmonster (P1) blijkt qua samenstelling binnen de range van de gesimuleerde dipbadmonsters te vallen. De verwachting is dus dat de geproduceerde “dipbad” media (zie 2.2.2) gebruikt kunnen worden als simulatiemonsters voor de praktijk.

De invloed van de aardappelmatrix op de meetmethoden voor pyrofosfaat zal door analyse van meer praktijkmonsters bevestigd moeten worden.

Effect van aardappelmedium op de hydrolyse van pyrofosfaat

In figuur 7 is de hydrolyse van pyrofosfaat als functie van de tijd in zowel water als aardappelmedium (P1) weergegeven. Het is duidelijk dat de absorptie na 5 minuten hydrolyse niet meer toeneemt; ook na 15 minuten hydrolyse onder de standaardcondities vindt geen additionele hydrolyse van andere fosfor-bevattende componenten plaats.

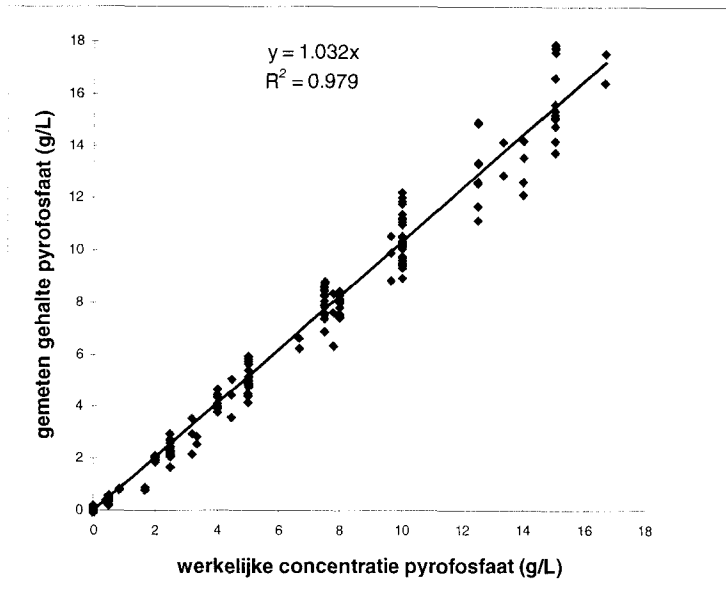


Figuur 7. Hydrolyse onder standaardomstandigheden van pyrofosfaat in aardappelmedium (P1) en in waterig medium. De doorgetrokken lijn geeft de voorspelde waarden op basis van 1^{ste} orde kinetiek.

Hiervoor zijn twee mogelijke verklaringen: 1) de hoeveelheid fosfor-bevattende componenten uitgeloozd uit aardappels en / of het gehalte vele malen kleiner is dan de concentratie pyrofosfaat in het dipbad en 2) is het mogelijk dat organisch gebonden fosfaat, bijvoorbeeld aan zetmeel, onder deze omstandigheden nog niet gehydrolyseerd wordt. Uit figuur 7 kan voorlopig geconcludeerd worden dat het “aardappelmedium” niet van invloed is op de hydrolysesnelheid van pyrofosfaat.

Effect van aardappelmedium op meting absolute pyrofosfaatconcentraties

Invloed aardappelmedium op de meting van pyrofosfaat met de molybdovanadaatmethode
 IJkreksen van pyrofosfaat gemaakt in diverse aardappelmedia werden geanalyseerd met de ontwikkelde molybdovanadaatmethode. De gemeten waarden zijn vervolgens uitgezet tegen de werkelijke waarden (zie figuur 8).



Figuur 8. Gemeten gehalte pyrofosfaat uitgezet tegen het referentiegehalte pyrofosfaat door standaardaddities van pyrofosfaat aan verschillende aardappelmedia (onvoorbehandeld)

Op basis van deze gegevens kan uitspraak gedaan worden over de “performance” van de methode: nauwkeurigheid en invloed van de aardappelmatrix op de meting.

Uit figuur 8 lijken hogere initiële pyrofosfaatgehalten te resulteren in een grotere variantie van de meting dan lagere gehalten pyrofosfaat. Het percentage verklaarde variantie (R^2) van dit regressiemodel is 98%. Dit regressiemodel ($y = 1.03 \cdot X$) komt goed overeen met de ideale meting ($Y = X$). Ongeacht de samenstelling van het aardappelmedium, is de gemiddelde relatieve meetfout van de metingen kleiner dan 10%. De meetfout bij een bepaalde pyrofosfaatconcentratie wordt veroorzaakt door verschillende factoren, onder andere door verstoringen door aardappelcomponenten en onnauwkeurigheid van de meetmethode zelf. Metingen van pyrofosfaat in aardappelmedium resulteren in een grotere variantie van de meting in vergelijking met waterige oplossingen van pyrofosfaat.

Afhankelijk van de eisen voor de nauwkeurigheid van de bepaling zal deze methode verder geoptimaliseerd worden.

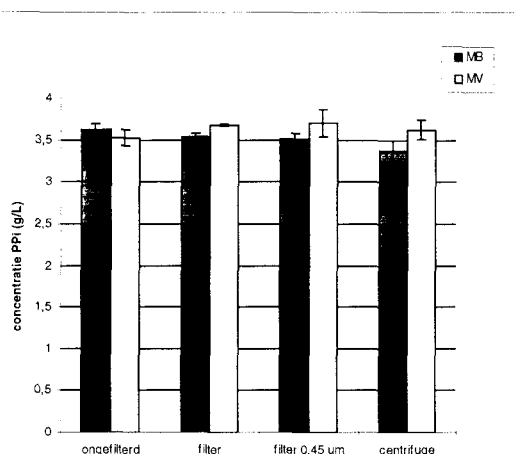
Monstervoorbereiding

De monsters afkomstig uit het pyrofosfaatdipbad behoeven mogelijk verdunning of filtratie, om de variantie in de metingen verder te reduceren. Het is de bedoeling dat de meetmethode zodanig wordt ontwikkeld dat deze voorbehandelingen tot een minimum beperkt worden.

Eventueel onopgeloste deeltjes uit het dipbadmedium kunnen de absorptiemeting verstoren: zij zorgen voor verstrooiing van het licht. Het is daarom in ieder geval aan te raden een grof filter of zeef te gebruiken om grotere delen van de aardappelstaafjes uit te filteren.

Bij een goed geroerd systeem bleek meer dan 50% van de onopgeloste deeltjes in de (gesimuleerde) dipbadmonsters kleiner te zijn dan 240 μm .

Enkele praktijkmonsters zijn op verschillende manieren voorbehandeld, waarna de pyrofosfaatconcentratie met verschillende meetmethoden bepaald is (figuur 9).



Figuur 9. Invloed voorbehandeling van P1 (praktijkmonster) op gemeten gehalte pyrofosfaat (g/l) volgens molybdaatblauwmethode (MB) en molybdovanadaatmethode (MV)

Variantie-analyse laat zien dat er geen significant verschil is in de gemeten pyrofosfaat concentratie van de verschillende voorbehandelingen. Dit houdt in dat er door filtratie of centrifugatie geen pyrofosfaat weggevangen wordt, bijvoorbeeld door binding van pyrofosfaat aan onopgeloste deeltjes. Tevens zijn dit de eerste aanwijzingen dat in de praktijksituatie geen filtratie-voorbehandeling nodig is.

In een latere fase zullen praktijkmonsters moeten uitwijzen of door het overslaan van een filterstap de metingen al dan niet verstoord worden.

Bij on-line toepassing zouden zanddeeltjes een belemmering kunnen zijn voor de werking van de pompkleppen; zachte onopgeloste deeltjes zoals celresten zullen bij een goed spoelsysteem geen probleem vormen.

3.3.4 Overzicht van de reactieprocedure voor de molybdovanadaatmethode

Monstervoorbehandeling

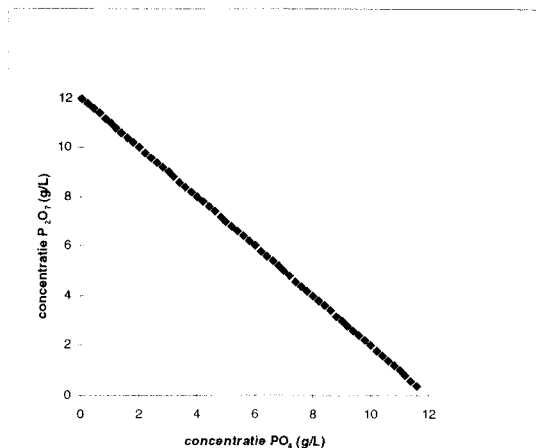
Enkele verkennende experimenten wijzen erop dat voorbehandelingen, zoals filtratie, niet vereist zijn voor een betrouwbare bepaling van pyrofosfaat. Het is belangrijk om voor de verschilmeting beide monsters zo homogeen mogelijk uit het dipbad te nemen.

Keuze hydrolyse-omstandigheden

De totale analyseduur van pyrofosfaat moet binnen 15 minuten voltooid zijn. Dit heeft dan ook gevolgen voor de maximale duur van de hydrolyse van pyrofosfaat tot fosfaat. Zoals uit de resultaten blijkt, kan bij extreme temperaturen en hoge zuurconcentraties een zeer snelle omzetting van pyrofosfaat gerealiseerd worden. In deze fase is echter de toepassing op labschaal (veiligheid) ook een belangrijke weegfactor in de keuze van een optimum tussen temperatuur en zuurconcentratie enerzijds en analyseduur anderzijds. Daarom is gekozen voor een zuurconcentratie van 5N en een reactietemperatuur van 90-95°C. Op basis van deze parameters is de reactieduur voor 99% omzetting 5 minuten. Voor de hydrolyse van pyrofosfaat is gekozen voor zwavelzuur, omdat dit type zuur ook benodigd is bij de complexvorming van fosfaat met molybdaat.

Meetbereik van de molybdovanadaatmethode

Het huidige meetbereik van de molybdovanadaatmethode met zure hydrolyse ligt in de range 0.5-17 g/L pyrofosfaat oftewel 0.5-17 g/L totaal fosfaat. Deze meetmethode is dus gelimiteerd door de fosfaatconcentratie (uitgeloogd uit aardappels en gevormd na afbraak pyrofosfaat) in dipbad (figuur 10).



Figuur 10. Meetbereik van de molybdovanadaatmethode als functie van de initiële fosfaatconcentratie in het dipbad

Voor toepassing van deze methode zal dus een maximale concentratie fosfaat vastgesteld moeten worden.

Invloed van temperatuur en pH op de hydrolyse en kleurvorming

De temperatuur en pH van het monster heeft geen invloed op je meetmethode omdat je gaat verdunnen in een milieu met een begintemperatuur (60-80°C), waardoor het monster voor pyrofosfaathydrolyse in enkele seconden een temperatuur van 90-95°C zal bereiken.

Verdunning van het gehydrolyseerde monster in het kleurreactiemengsel kan vervolgens de temperatuursprong naar 20-25°C, gestandaardiseerd voor kleuring van fosfaat, in enkele seconden overbruggen.

Kosten van de molybdovanadaatmethode

De kosten van de molybdovanadaat methode zijn op jaarbasis (bij een bepaling van pyrofosfaat vier keer per uur) ongeveer Hfl. 500,-. Afvalproductie is ongeveer 8 kg per jaar. Kosten en afvalproductie zijn gebaseerd op verbruik van reagentia op labexperimentele schaal. Toekomstige toepassing van de meting “at-line” of “on-line” kan mogelijk wijzigingen in deze hoeveelheden met zich meebrengen.

3.4 Ontwikkeling van een directe meetmethode voor bepaling pyrofosfaat: de turbiditeitsmethode (methode 4: zie tabel 3)

Uit studie naar chromofore verbindingen voor bepaling van pyrofosfaat blijkt dat enkele directe bepalingen zijn ontwikkeld voor de moleculaire biologie (bijlage 6). Deze zijn niet niet interessant om verder uit te zoeken, vanwege extreem lage gevoeligheid voor pyrofosfaat.

De titratiemethode met behulp van neerslag met zinksulfaat is ook een directe meetmethode voor pyrofosfaat. In de verkennende experimenten van deze methode (paragraaf 3.2) introduceerden metingen van pyrofosfaat in aardappelmedium afwijkingen tot meer dan 35% van de standaard toegevoegde hoeveelheid. Het is noodzakelijk om een snelle, eenvoudige directe meetmethode te ontwikkelen die minder invloed van de aardappelmatrix ondervindt.

3.4.1 Ontwikkeling van een directe meetmethode: de turbiditeitsmethode

De turbiditeitsmeting van pyrofosfaat (opgezet door Nakai et al., 1982) is interessant voor directe bepaling van pyrofosfaat vanwege snelheid en eenvoud. Deze methode is gebaseerd op een precipitatiereactie van pyrofosfaat met mangaanchloride.

Standaardisatie van de turbiditeitsmethode

De precipitatievorming wordt versneld door toevoegen van een component met een lage diëlectrische constante, zodat een snelle en volledige precipitatie bereikt wordt.

Enkele chemicaliën om deze precipitatiereactie te versnellen zijn getest (tabel 7).

Tabel 7. Onderzochte precipitiemiddelen

	Turbiditeit en precipitatie	Veiligheid
Isopropanol	+/-	+/-
Isobutanol	+	+/-
Glycerol	-	+
CaCl ₂	+/-	+
Azijnzuurbuffer	-	+

De meetnauwkeurigheid van CaCl₂ blijkt onvoldoende reproduceerbaar om pyrofosfaat te kunnen meten, vooral monsters in aardappelmedium resulteren in een sterke spreidingen tussen herhaalde metingen. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door neerslag van calciumpectinaat.

Enkele eerste experimenten met *isopropanol* voor versnelling van precipitatie van pyrofosfaat gaven nog geen bevredigende resultaten wat betreft nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid.

Isobutanol is een ontvlambare vloeistof, dus qua veiligheid minder geschikt (zie bijlage 9 voor de veiligheidsnormen). Hierbij moet vermeld worden dat slechts lage concentraties gebruikt worden (~5 v/v %). Het gebruik van isobutanol zorgt tevens voor een verlenging van de houdbaarheid van het reagens. Hieruit kunnen we concluderen dat isobutanol het meest geschikt is om te gebruiken voor versnelling van precipitatie van pyrofosfaat.

Vervolgens zijn concentratie en type stabilisator (tabel 8), concentratieverhoudingen reagens en pyrofosfaat geoptimaliseerd om een stabiele troebeling te krijgen.

Tabel 8. Onderzochte stabilisatoren

Stabilisator	Turbiditeit en Precipitatie	Prijs/kg (Hfl.)
0.1% gelatine	+	67-152
0.2% arabische gom	-	118
1% arabische gom	-	
0.2% CMC ¹	-	94

¹ carboxymethylcellulose

In tabel 8 is aangegeven dat gelatine de meest geschikte stabilisator is voor de pyrofosfaat-MnCl₂ troebeling, zowel qua prijs als stabiliteit.

De concentraties pyrofosfaat in de dipunit die effectief zijn tegen grauwwerking kunnen variëren tussen 2 en 10 g/l. Het meetbereik van de methode moet afgestemd zijn op dit concentratiebereik. Een volumeverhouding van 1:40 van pyrofosfaatoplossing: reagens (zie bijlage 5), resulteert in een stabiele troebeling (gelatinegehalte van 0.1%) met de volgende experimentele parameters:

Tabel 9. Parameters van de turbiditeitsmethode.

Parameter		
Gevoeligheid ϵ (M P_2O_7 cm ⁻²)	22*10 ³	
Meetbereik	1-15 g/l ($P_2O_7^{4-}$)	
Verdunningsfactor	-	
Minimale analyseduur (minuten)	Mengen	15 seconden
	Vorming troebeling	5
	Totaal	5.15

Opwekken van de troebeling gebeurt door krachtig mengen van het monster met de reagentia. De vorming van de pyrofosfaat-mangaan troebeling is reeds na 2 minuten compleet. Vervolgens is 3 minuten wachttijd benodigd. In deze tijd blijken eventueel andere onopgeloste componenten, zoals zetmeel, neer te slaan. De methode van het opwekken van de turbiditeit bleek van invloed te zijn op de gemeten absorptie; deze is gestandaardiseerd op 15 seconden vortexen (2500 rpm.). Onder bovengenoemde condities is de absorptie van de troebeling evenredig met de pyrofosfaatconcentratie tot een gehalte van 15 g/L. De gevormde troebeling was vervolgens minimaal één uur stabiel. Hogere concentraties pyrofosfaat (20 g/L) resulteerden in een directe neerslag van het pyrofosfaat-mangaan complex.

Keuze absorptieoptimum

De absorptie van de troebeling als functie van de golflengte neemt toe met toenemende golflengte.

Uit enkele scans van praktijkmonsters en simulatiemonsters is gebleken dat de absorptie van deze monsters zelf afneemt met toenemende golflengte. Vanaf 600 nm. is de storende invloed van de donkere kleur van de geteste monsters te verwaarlozen. Verdere metingen werden verricht bij een golflengte van 625 nm.

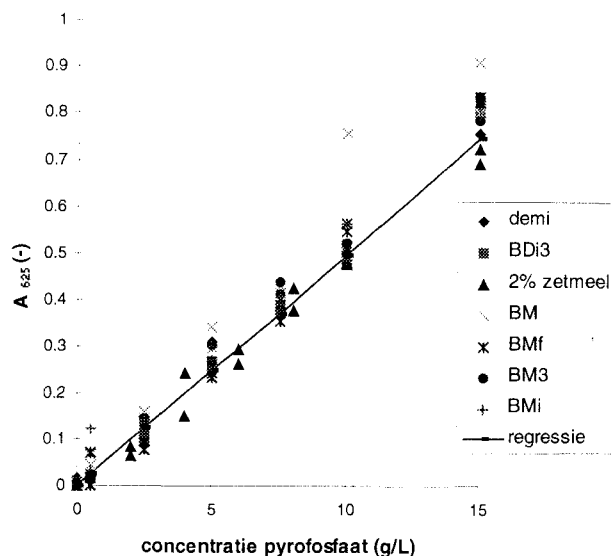
Houdbaarheid van reagentia

De houdbaarheid van de reagentia voor de turbiditeitsmethode is getest en blijkt minimaal 1 maand te zijn. Om inhomogeniteit na reactie met pyrofosfaat te voorkomen, wordt aangeraden het precipitatieagens mangaanchloride gescheiden te houden en de mengsels steeds vers aan te maken. De reagentia kunnen bij kamertemperatuur bewaard worden.

De kosten van de turbiditeitsmethode zijn op jaarbasis (bij een bepaling van pyrofosfaat vier keer per uur) relatief zeer laag: ongeveer Hfl. 2000,-. De afvalproductie ligt rond de 16 kg per jaar. Kosten en afvalproductie zijn gebaseerd op verbruik van reagentia op labexperimentele schaal. Toekomstige toepassing van de meting "at-line" of "on-line" kan mogelijk wijzigingen in deze hoeveelheden met zich meebrengen.

3.4.2 De turbiditeitsmethode: Effect aardappelmedium op meting pyrofosfaat

Verschillende aardappelmedia werden gecreëerd variërend in ras, concentratie aardappelcomponenten, en type voorbehandeling. Daarbij werd de praktijksituatie in het pyrofosfaaddipbad zo sterk mogelijk nagebootst. De parameters om deze monsters te karakteriseren zijn weergegeven in bijlage 8. Het drogestofgehalte (voornamelijk bestaande uit zetmeel) van praktijk- en simulatiemonsters ligt in de range van 0.9-1.5%. Ook werd de invloed van verstijfseld aardappelzetmeel (tot 2 %) bepaald. Op deze manier kan de invloed van uitgeloopte aardappelcomponenten op de meetmethode bepaald worden. Resultaten van deze ijklijnen zijn weergegeven in figuur 11.



Figuur 11. Invloed van aardappelmedium op de pyrofosfaatmeting. Bi3, BM, BMf (gefilterd), BM3, en BMi zijn gesimuleerde dipbadmedia (zie 2.2.2)

Enkele metingen van pyrofosfaat in monster BM, het monster met een relatief hoge concentratie aan aardappelcomponenten, wijken sterk af van de voorspelde waarde. Mogelijk kan de standaardafwijking van deze monsters verminderd worden door te corrigeren voor een blanco-monster, met een reagens zonder mangaanchloride. Daarbij is het van belang om voor de verschilmeting een monster te nemen uit een goed homogene oplossing.

Het percentage verklaarde variantie (R^2) van dit regressiemodel ($y = 0.054 \cdot X$) is 98%. Voor de onnauwkeurigheid van de regressielijn geldt: voorspelde waarde $\pm 2 \cdot se$ (standaardfout van de metingen). Ongeacht de samenstelling van het aardappelmedium wordt een onnauwkeurigheid van ± 1.2 g/l pyrofosfaat gevonden. Deze onnauwkeurigheid wordt veroorzaakt door het verschil in samenstelling tussen de monsters en het verschil in de bepalingen van de monsters onderling.

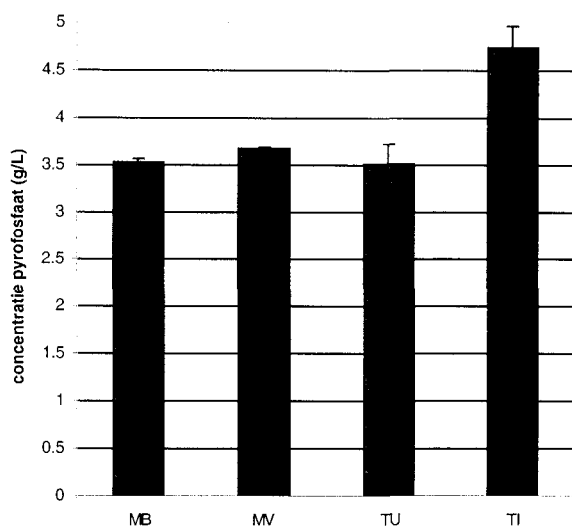
Concentraties pyrofosfaat kleiner dan 2 g/l resulteren in een relatief grote afwijking en zijn dus ongeschikt om te kunnen bepalen met deze methode.

3.5 Invloed van verschillende meetmethoden op bepaling pyrofosfaat in praktijkmonsters

Het absolute pyrofosfaatgehalte werd in het praktijkmonster (P1) bepaald volgens:

- 1) de molybdaatblauwmethode via enzymatische hydrolyse van pyrofosfaat (MB),
- 2) de ontwikkelde en gestandaardiseerde molybdovanadaatmethode via zure hydrolyse van pyrofosfaat (MV),
- 3) de titratiemethode (TI),
- 4) de ontwikkelde en gestandaardiseerde turbiditeitsmethode (TB).

In deze bepalingen werd de molybdaatblauwmethode, vanwege de enzymatische specificiteit voor pyrofosfaat, gebruikt als referentiebepaling. Het resultaat van deze analyses is weergegeven in figuur 12.



Figuur 12. Pyrofosfaatgehalten in P1, gemeten met MB, MV, TI en TB (voor verklaring: zie tekst)

Zowel de bepaling van pyrofosfaat via de ontwikkelde molybdovanadaatmethode als via de turbiditeitsmethode resulteerde in vergelijkbare gehalten geanalyseerd pyrofosfaat met de molybdaatblauwmethode. De bepaling van pyrofosfaat volgens de titratiemethode resulteerde in een sterke overschatting van pyrofosfaat (28%). Deze metingen bevestigen de werking van de ontwikkelde molybdovanadaatmethode en de turbiditeitsmethode in een monster met een willekeurige aardappelmatrix, pyrofosfaat- en fosfaatgehalte.

4 Conclusies en vervolgonderzoek

De ontwikkeling van een meetmethode voor pyrofosfaat, geschikt voor de aardappelverwerkende industrie, is gebaseerd op de volgende randvoorwaarden:

- eenvoud en aantal bewerkingsstappen,
- analyseduur,
- verwachte kosten van detectiesysteem,
- verwachte kosten van reagentia,
- houdbaarheid van reagentia,
- effect van het “aardappelmilieu” op de meting van pyrofosfaat,
- potentie voor on-line toepassing in aardappelverwerkende industrie.

Aan de hand van deze randvoorwaarden zijn enkele meetmethoden voor pyrofosfaat, geselecteerd uit opties genoemd in de literatuur, getest of geoptimaliseerd.

Indirecte meetmethoden	
1a	Hydrolyse van pyrofosfaat gevolgd door kleuring met molybdaatblauw
1b	Hydrolyse van pyrofosfaat gevolgd door kleuring met molybdovanadaat
2	Hydrolyse van pyrofosfaat en kleuring met molybdaatblauw in één stap
Directe meetmethoden	
3	Titratiemethode
4	Turbiditeitsmethode

Indirecte meetmethoden: molybdaatblauwmethode (1a en 2)

De molybdaatblauwmethode is een indirecte methode voor de bepaling van pyrofosfaat via (enzymatische) hydrolyse tot fosfaat en vervolgens een kleuring van fosfaat. Deze methode is vanwege analyseduur, kosten, instabiliteit en hoeveelheid aan verschillende benodigde reagentia ongeschikt voor ontwikkeling als meetmethode voor toepassing in de aardappelverwerkende industrie.

Directe meetmethode: titratiemethode (3)

De titratiemethode is een snelle en eenvoudige methode voor directe bepaling van pyrofosfaat. Deze methode blijkt echter een sterke afwijking te geven in de bepaling van het pyrofosfaatgehalte in aardappelmedium (tot meer dan 50% relatieve fout), afhankelijk van het drogestofgehalte. Dit wordt veroorzaakt door bufferende componenten uitgelooft uit de aardappels.

Indirecte meetmethode: molybdovanadaatmethode (1b)

De molybdovanadaatmethode is een indirecte methode ontwikkeld voor de bepaling van pyrofosfaat via zure hydrolyse tot fosfaat en vervolgens een snelle kleuring van fosfaat. Ongeacht de samenstelling van de aardappelmatrix is de gemiddelde relatieve meetfout kleiner dan 10%. Pyrofosfaatconcentraties groter dan 10 g/L hebben een grotere spreiding dan concentraties kleiner dan 10 g/L.

Criterium	
Analyseduur	< 7 minuten
Kosten	~ Hfl. 500,-*
Veiligheid	+
Stabiliteit reagens	+
Voorbehandeling	-

* analyse van pyrofosfaat 4 keer per uur

Directe meetmethode: turbiditeitsmethode (4)

De turbiditeitsmethode is een directe methode voor bepaling van pyrofosfaat via de vorming van een gestabiliseerde pyrofosfaat-mangaan troebeling. De aardappelmatrix heeft een beperkt effect op de nauwkeurigheid van de meting en resulteert in een 95%-betrouwbaarheidsinterval: voorspelde waarde ± 1.2 g/L pyrofosfaat. Pyrofosfaatgehalten kleiner dan 2 g/L kunnen slechts met een lage nauwkeurigheid bepaald worden.

Criterium	
Analyseduur	< 6 minuten
Kosten	~ Hfl. 2000,-*
Veiligheid	+
Stabiliteit reagens	+
Voorbehandeling	-

* analyse van pyrofosfaat 4 keer per uur

De molybdovanadaatmethode en de turbiditeitsmethode voldoen dus beide aan de gestelde randvoorwaarden en hebben potentie om tot zowel “at-line” als “on-line” methode ontwikkeld te worden. Deze meetmethoden worden als zodanig nog niet toegepast in commercieel verkrijgbare on-line meters.

Vervolgonderzoek

Afhankelijk van het gewenste meetbereik voor pyrofosfaat kunnen methoden 1b en 4 verder geoptimaliseerd worden. Tevens zal een keuze gemaakt moeten worden voor uiteindelijke “at-line” en “on-line” toepassing.

Het is belangrijk de meetfout te correleren aan de “setpoint” van het pyrofosfaatgehalte in het dipbad. De dosering van pyrofosfaat staat direct in relatie met de potentie van de aardappelstaafjes tot grauwwerking. Het benodigde pyrofosfaat-gehalte kan voorspeld worden door na te gaan wat de effectiviteit van pyrofosfaat tegen grauwwerking is. Op deze manier kan de ingangscontrole voor grauw een maat zijn voor de te af te stemmen setpoint van het pyrofosfaat-gehalte.

De indirecte meetmethode voor pyrofosfaatbepaling heeft als voordeel ten opzichte van de directe meetmethode, dat de aanwezige fosfaatconcentratie tevens bepaald wordt. Monitoring van de fosfaatconcentratie is ook van belang voor de kwaliteit van de frites: te hoge fosfaatconcentraties in het dipbad kunnen de frites een bittere chemische smaak geven [8].

In het eerste jaar van Fase 2 zullen de ontwikkelde methoden ingepast worden in een methode geschikt voor “at-line” meting van pyrofosfaat in de aardappelverwerkende industrie. Hierin kunnen de volgende activiteiten onderscheiden worden:

- * Validatie meetmethoden in praktijkomgeving en met behulp van praktijkmonsters,
- * Standaardisatie meetmethode(n) voor eenvoudige toepassing in praktijk, bijvoorbeeld door inpassen methode in eenvoudige cuvettestest.

Meting van pyrofosfaat in de dipunit staat indirect in relatie tot het meten van de potentie van de frites om grauw te verkleuren. Wanneer de grauwwerking van de frites voorspeld kan worden, kan vervolgens via een feed-forward controle de dosering van pyrofosfaat veranderd worden. Voor een optimale ontwikkeling van het pyrofosfaatmeetsysteem voor “at-line” of “on-line” toepassing is het nodig om de effectiviteit van pyrofosfaat op de grauwwerking op te nemen in deze projecten.

In het tweede jaar van Fase 2 zal de ontwikkeling van de “at-line” methode tot een “on-line” methode voor de meting van pyrofosfaat plaatsvinden.

5. Literatuur

1. Voorschrift fosfaat- en pyrofosfaatbepaling in frites en pureevlokken/granules.
2. Langner, H.J., Teufel, U., Malek, E. Die quantitative bestimmung von Pyrophosphat in Fleischwaren mit Hilfe von anorganischer pyrophosphatase. Die Fleischwirtschaft, nr 6 (1974) 1063-1065.
3. Otten, J. ATO-DLO rapport, Inventarisatie van bruikbare systemen voor het meten van orthofosfaat en pyrofosfaat, december 1997.
4. Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A., Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. Lipids, 1966, 5, 494-496.
5. Nakai, S., Helbig, N.B., Fung, C.P. A rapid method for determining pyrophosphate in blanching solution. Can. Inst. Food Sci. Technol. 15, (1982) 137-139.
6. Thomsen, H.A., Kisbye, K. N and P on-line meters: requirements, maintenance and stability. Wat. Sci. Tech. 1996, 33, p.147-157.
7. Ormaza-González, F.I., Statham, P.J. Wat. Res. 1996. 30 p. 2739-2747. A comparison of methods for the determination of dissolved and particulated phosphorus in natural waters.
8. Ng, K.C., Weaver, M.L., Effect of pH and temperature on the hydrolysis of disodium acid pyrophosphate (SAPP) in potato processing. American Potato Journal, vol 56, 1979, 63-69.
9. Putnins, R.F. and Yamada, E.W. Colorimetric Determination of Inorganic Pyrophosphate by a Manual or Automated Method, Analytical Biochemistry, 68 (1975) 185-195.
10. Marle, J.T., Van Dijk, C., Voragen, A.G.J., Biekman, E.S.A. Comparison of the cooking behaviour of the potato cultivars Nicola and Irene with respect to pectin breakdown and the transfer of ions. Potato Research. 1994. 37, p. 183-195.
11. Sharma, C.L. Spectrofotometric determination of pyrophosphate with trans-dichlorobis(ethylenediamine)cobalt (III), Indian J. Chem 9 (1971) 279.
12. Czarnik, A.W. Fluorescent Chemosensors of Ion and Molecule Recognition, ACS Symp. Ser. (1994). 561(Interfacial design and chemical sensing) 314-323.

Bijlage I

Molybdaatblauwmethode: bepaling fosfaat- en pyrofosfaatgehalte

1. Onderwerp
Deze methode beschrijft de bepaling van het gehalte aan fosfaat en pyrofosfaat in aardappelproducten en blancheer / dipbaden.
2. Toepassingsgebied
Deze methode is geschikt voor frites, pureevlokken / aardappelgranules en blancheerbaden.
3. Definitie
n.v.t.
4. Beginsel
Anorganisch pyrofosfaat wordt m.b.v. het enzym pyrofosfatase omgezet in orthofosfaat:
$$\text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{PO}_4^{3-} + 2 \text{H}^+$$

Het in neutraal milieu ontstane orthofosfaat vormt met ammoniummolybdaat en een geschikt reductiemiddel een gekleurde complexe verbinding. De kleurintensiteit van deze verbinding wordt gemeten bij een golflengte van 578 nm en is evenredig met de fosfaatconcentratie.

Met deze methode wordt zowel het uit pyrofosfaat gevormde orthofosfaat als het reeds aanwezige orthofosfaat bepaald. Door het meenemen van een blanco (monster zonder pyrofosfatase) wordt de initiële orthofosfaatconcentratie bepaald.

Anorganisch pyrofosfatase splitst specifiek anorganisch pyrofosfaat. Andere fosfaten zoals bijvoorbeeld trifosfaten en polyfosfaten worden niet gesplitst.

5. Reagentia, grond- en hulpstoffen
 - KH_2PO_4 Kaliumdihydrogeenfosfaat (Merck 4873).
 - $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (TRIS) Tris (hydroxymethyl) aminomethaan (Merck 8382).
 - HCl (1 mol/l) Zoutzuur (Merck 9970).
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Magnesiumchloride (Merck 5833).
 - H_2SO_4 (2.5 mol/l) Zwavelzuur (Merck 731 (gec.) / Merck 9912).
 - $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ 4-methylaminofenolsulfaat (= fotorex) (Merck 7299).
 - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Ammoniumheptamolybdaat (Merck 1182).
 - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ Natriumdisulfiet (Merck 6528).
 - Pyrofosfatase Anorganische pyrofosfatase (Boehringer B108987).
 - Frites, pureevlokken / aardappelgranules of blancheerwater.
6. Toestellen en hulpmiddelen
 - Spectrofotometer + cuvetten met 1 cm lichtweg.
 - Cutter.
 - Ultraturrax (homogenisator).
 - Magneetroerder.
 - Bekers van roestvrijstaal (1.4 liter).
 - Reageerbuizen met een afmeting van 16 x 160 mm
(of erlenmeyers met een inhoud van 25-50 ml, of centrifugebuizen met een inhoud van 50 ml).
 - Erlenmeyers (1000 ml).
 - Bekerglazen (1000 ml).
 - Maatkolven (100, 200 & 1000 ml).
 - Maatcilinders (25, 50, 100, 250 & 500 ml).
 - Wegwerp filterhouders Spartan 30/B 0.45 μm (S&S ref. nr. 463 050).
 - Injectiespuiten 3 cc Syringe (Becton en Dickinson nr. 9585).

- Eventueel trechters met vouwfilters S&S 595½ (240 mm.) i.p.v. wegwerp filterhouders en injectiespuiten.
 - Analytische balans; nauwkeurigheid 0.0001 gram.
 - Balans; nauwkeurigheid 0.01 gram.
 - Microliterpipetten (10, 200, 400 & 500 µl).
 - Instelbare finnpipet (5 ml).
 - Instelbare finnpipet met aanzuigslang (10 ml).
 - RVS-zeef met maaswijdte 2 mm. DIN 4188.
7. Monstername
n.v.t.
8. Voorbehandeling monster
- Frites:
Ca. 500 gram frites wordt in een cutter gemalen en goed gehomogeniseerd. Hiervan wordt 50 gram als monster afgewogen in een RVS-beker en hieraan wordt 500 ml water toegevoegd. Dit geheel wordt gedurende 45 sec. met een ultraturrax gehomogeniseerd en overgeschonken in een erlenmeyer van 1000 ml (afdichten met stop of parafilm).
Deze erlenmeyer wordt gedurende 15 min. geroerd met een magneetroerder. Van dit gehomogeniseerde monster wordt 3 cc afgefilterd m.b.v. de Spartan wegwerpfilters en de Syringe injectiespuiten. Indien dit niet mogelijk is dan filtreren of centrifugeren. Van het filtraat wordt 500 µl gepipetteerd als analysemonster.
 - Pureevlokken / aardappelgranules:
Pureevlokken met een heterogeen uiterlijk (bijv. te grote vlokken) worden eerst fijn gemaakt met de RVS-zeef. Aardappelgranules worden eventueel met een fijnere zeef fijn gemaakt. Van de gezeefde vlokken en granules wordt 10 gram afgewogen in een RVS-beker en hieraan wordt 500 ml water toegevoegd. Vervolgens (net als bij frites) homogeniseren, roeren en filtreren. Van het filtraat wordt 500 µl gepipetteerd als analysemonster.
 - Blancheerbaden:
Met behulp van de Spartan wegwerpfilters en de Syringe injectiespuiten wordt 3 cc van de blancheerbadmonsters afgefilterd. De gefilterde blancheerbadmonsters worden, afhankelijk van de SAPP-concentratie, verdund. (SAPP= sodium acid pyrophosphate = $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$)

Concentratie SAPP	Verdunningsfactor
0 - 0.5 %	F = 10
> 0.5 %	F = 20

Na verdunnen wordt er 500 µl gepipetteerd als analysemonster.
9. Werkwijze
1. Bereiden oplossingen (met demi water):
- I. TRIS-buffer (pH = 7.0):

6 gram trisaminomethaan	Oplossen in 400 ml H_2O ,
+	pH instellen op 7.0 met HCl,
200 gram magnesiumchloride	en aanvullen tot 500 ml
	(houdbaar 1 maand bij 4 °C)
 - II. Standaard fosfaatoplossing (1 mmol/l):
136 mg KH_2PO_4 aanvullen tot 1 liter (houdbaar tot 1 jaar bij 4 °C)
 - III. Anorganisch pyrofosfatase (1 mg/ml):
Suspensie onverdund gebruiken (Let op de uiterste houdbaarheidsdatum op verpakking !).
 - IV. Ammoniummolybdaat-oplossing:
25 gram ammoniummolybdaat onder verwarmen oplossen en na afkoelen aanvullen tot 1 liter. (houdbaarheid tot 1 jaar bij 4 °C)

- V. Reductieoplossing:

1 gram 4-methylaminofenolsulfaat (fotorex)

oplossen + aanvullen tot 100 ml

+

(elke dag vers bereiden)

2.7 gram natriumdisulfiet
- VI. Zwavelzuur (H₂SO₄):

139 ml geconcentreerd zwavelzuur (Merck 731) toevoegen aan 861 ml water

of

onverdund gebruiken Merck 9912 (2.5 mol/l)
- VII. Fosfaatreagens 1 (zonder molybdaat, E₀; geen blauwkleuring):

125 ml H₂O

25 ml H₂SO₄ (= VI.)

25 ml reductieoplossing (= V.)

mengen

in donker bewaren

vlak voor de bepaling bereiden!
- VIII. Fosfaatreagens 2 (met molybdaat, E_b en E_m, wel blauwkleuring)

200 ml H₂O

50 ml H₂SO₄ (= VI.)

50 ml ammoniummolybdaat (= IV.)

50 ml reductieoplossing (= V.)

mengen

in donker bewaren

vlak voor de bepaling bereiden!

- Als het filtraat een hoge concentratie aan PO₄ of P₂O₇ bevat, dan verdunnen volgens schema:

PO ₄ /P ₂ O ₇ (mg/l)	verdunnen met water	verdunningsfactor (F)
< 360	-	1
360 - 3600	1 + 9	10
> 3600	1 + 99	100

2. Analyse:

- Vooraf de buffer opwarmen tot 20-25 °C.
- Iedere analyseserie bestaat uit een blanco (= H₂O), een standaard fosfaatoplossing en de monsters; van alle drie wordt zowel E₀ als E_b en E_m gemeten !

- Pipetteerschema:

	E ₀	E _b	E _m
TRIS buffer	2.50 ml	2.50 ml	2.50 ml
Blanco, Standaard fosfaatopl. Monster	500 µl	500 µl	500 µl
Water	10 µl	10 µl	-
Anorg. pyrofosfatase	-	-	10 µl
Na toevoegen van het anorganische pyrofosfatase goed mengen en daarna 10 minuten wachten. Daarna toevoegen:			
	E0	Eb	Em
Fosfaatreagens 1		7 ml	-
Fosfaatreagens 2	-	7 ml	7 ml

Mengen, vervolgens 15 minuten wachten en daarna overschenken in cuvetten en met een spectrofotometer bij 578 nm de extinctie t.o.v. lucht of demiwater meten.

10. Berekeningen

- LET OP: **Alle** gemeten waarden (E_0 , E_b en E_m van zowel de standaard fosfaatoplossing als de monsters) moeten gecorrigeerd worden m.b.v. de bijbehorende waarde van de blanco !!! (bijv. $E_{0\text{ monster}} - E_{0\text{ blanco}}$)

- Gehalte aan PO_4 (fosfaat): in ppm. of mg/kg of mg/liter
$$[\text{PO}_4] = \frac{95.046 * (E_b - E_0) * F}{E_{\text{standaard}}}$$

- Gehalte aan P_2O_7 (pyrofosfaat): in ppm. of mg/kg of mg/liter
$$[\text{P}_2\text{O}_7] = \frac{87.048 * (E_b - E_0) * F}{E_{\text{standaard}}}$$

- Gehalte aan SAPP ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) in blancheerbaden: in mg/liter
$$\% \text{ SAPP} = ([\text{P}_2\text{O}_7] * 222 / 174) / 10.000$$

Waarbij:

$E_{\text{standaard}} = E_b - E_0$ van de standaard fosfaatoplossing (eveneens na correctie voor de blanco)

F = verdunningsfactor Frites: F = 10 (plus eventuele extra verdunning).
 Vlokken / granules: F = 50 (plus eventuele extra verdunning).
 Blancheervloeistof: F = 10 of 20, afhankelijk van de concentratie.

11. Precisie
n.v.t.

12. Opmerkingen

- De beschreven werkwijze is grotendeels volgens de methode van Boehinger.
- Wees voorzichtig met fosfaatreagens 1 en 2 (zuur !!!).
- Denk eraan om na het toevoegen van anorganisch pyrofosfatase de oplossingen goed te mengen voordat je 10 minuten wacht !!
- Toevoegen van fosfaatreagens 1 en 2 m.b.v. Finn-pipet met aanzuigslang !!

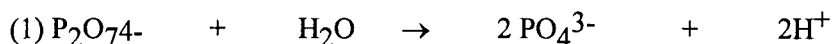
13. Bijbehorende documentatie
Methode Boehringer

Bijlage II

Standaardmethode voor fosfaat- en pyrofosfaatbepaling in dipbad: de molybdovanadaatmethode (concept)

Principe:

Anorganisch pyrofosfaat wordt door een hitte/zuur behandeling gesplitst in orthofosfaat (1)



Het ontstane orthofosfaat vormt een complex met ammoniummolybdaat, waarvan de kleurintensiteit wordt versterkt door toevoeging van ammoniumvanadaat. Het fosfovanadomolybdaatcomplex gevormd tussen fosfaat, ammonium vanadaat en ammonium molybdaat is helder geel van kleur. De absorptie wordt vervolgens gemeten bij 400 nm.

Benodigdheden:

Reagentia

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. KH_2PO_4 | Kaliumdihydrogeenfosfaat Merck 4873 |
| 2. H_2SO_4 p.a. geconc. | Zwavelzuur geconcentreerd Merck 713 |
| 3. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p.a. | Ammoniumheptamolybdaat Merck 1182 |
| 4. NH_4VO_3 p.a. | Ammoniumvanadaat |
| 5. HNO_3 p.a. geconc. | Salpeterzuur geconcentreerd Merck |

Apparatuur

1. Spectrofotometer (golflengte 400 nm), cuvetten klein (3 mL) $d=1\text{ cm}$
2. Waterbad 90-95°C
3. epjes 1.5 mL met safelock
4. goed voorgespoeld glaswerk of plastic potten voor molybdaat en vanadaatreagentia
5. Gilson pipets

Bereiden oplossingen (met demiwater)

1. Hydrolysereagens zwavelzuur

97% geconcentreerd zwavelzuur: 154 mL toevoegen aan 846 mL demi

- 2A. Ammoniummolybdaatoplossing 1 (Reagens 1A)

34.5 mL H_2SO_4 toevoegen aan 450 mL demi, goed mengen. Voeg vervolgens 25 g ammoniummolybdaat (3) toe. Aanvullen tot 500 mL. Houdbaarheid: 1 jaar bij kamertemperatuur.

- 2B. Ammoniummolybdaatoplossing 1 (Reagens 1B)

25 mL H_2SO_4 toevoegen aan 450 mL demi, goed mengen. Voeg vervolgens 25 g ammoniummolybdaat (3) toe. Aanvullen tot 500 mL. Houdbaarheid: 1 jaar bij kamertemperatuur.

3. Ammoniumvanadaatoplossing (Reagens 2)

Voeg 10 mL HNO_3 (5) geconc. toe aan 400 mL demi. Voeg 1.25 g ammoniumvanadaat (4) toe en vul aan tot 500 mL. Houdbaarheid: 1 jaar bij kamertemperatuur.

4. Fosfaatstandaardoplossing

Los 0.34 g KH₂PO₄ op in demi in een maatkolf van 100 mL. Maak een verdunningsreeks 3.4-2.55-1.7-0.85-0.425 g/L KH₂PO₄ (= 0.025 M-etc.)

Analyse van dipbadmonsters

De waarden aan pyrofosfaat in de samples dienen te liggen tussen 0.5 en 17 g/L

Verdunningsschema

P g/L	PO ₄ / P ₂ O ₇ g/L	verdunnen met demi	F
< 5.55	< 17	-	1
5.55-55.5	17-170	1+9	10
>55.5	>170	1+99	100

Destructie van pyrofosfaat tot fosfaat (voor bepaling Em)

Verwarm 900 µL 2.78 M H₂SO₄ (hydrolysereagens) in een waterbad van 90-95°C (minimaal 5 min). Pipetteer 100 µL sample in het voorverwarmde epje met H₂SO₄. Verhit gedurende 5 minuten. Pipetteer vervolgens 100 µL in cuvet (voor bepaling Em) volgens onderstaand schema

Fosfaatbepaling (voor bepaling Eb)

Verdun 100 µL sample in 900 µL demi. Pipetteer vervolgens 100 µL in cuvet (voor bepaling Eb) volgens onderstaand schema.

Pipetteerschema voor de analyse in cuvetten:

	Em	Eb	E0
demi	1.4 mL	1.4 mL	2.4 mL
sample, standaard	100 µL	100 µL	100 µL oplosmiddel (demi/blancheerwater)
Reagens 1A / 1B	500 µL (1A)	500 µL (1B)	-
Reagens 2	500 µL	500 µL	-

Mengen (afsluiten met parafilm) en extinctie direct meten t.o.v. demi bij een golflengte van 400 nm.

Berekening: gehalte aan PO₄ en P₂O₇ en %pyrofosfaat

Volgens fosfaatstandaardijklijn: A₄₀₀ = CPO₄*rc+b (ijklijn in mM)

$CPO_4 = 95.046 * ((Eb-E0)-b) * F / rc = CPO_4 \text{ mg/L}$

$CP_2O_7 = 87.048 * (Em-Eb) * F / rc = CP_2O_7 \text{ mg/L}$

$\%SAPP (Na_2H_2P_2O_7) \text{ in dipbad} = (CP_2O_7 * 222 / 174) / 10000 = \dots \%SAPP$
(CP₂O₇ in mg/L)

Bijlage III

Standaardmethode voor de bepaling van pyrofosfaat in dipbad: de turbiditeitsmethode (concept).

(Nakai, s., Helbig, N.B., Fung, C.P. A rapid method for determining pyroosphate in blanching solutions, Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 1982, 12, pp137-139).

Inleiding

Deze methode is gebaseerd op een precipitatie-reactie van pyrofosfaat met MnCl_2 . De precipitatie-vorming wordt versneld door toevoegen van een component met een lage dielectrische constante, zodat een snelle en volledige precipitatie bereikt wordt. De gevormde troebeling wordt gestabiliseerd door toevoegen van een verdikkingsmiddel/stabilisator. De absorptie van deze troebeling wordt gemeten bij 625 nm, aangezien het blancheerwater/dipwater hier weinig/geen absorptie vertoont. Eventuele pH veranderingen door toevoegen van monster worden opgevangen door een appelzuur-buffer pH 5.2

Experimentele procedure

Reagentia:

- 1 Los 3 g malic acid op in 800 mL demi. Stel pH 5.2 met 5M NaOH. Voeg 50 mL isobutyl alcohol toe. Voeg vervolgens 100 mL 1% gelatine toe (los 1 g. gelatine 300 Bloom, Sigma) op in 100 mL kokend water, filtreren en vervolgens aan 50 mL aan buffer toevoegen). Vul aan tot 1L en goed mengen.
- 2 MnCl_2 oplossing: 8.0 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oplossen in 100 mL demi
- 3 Reagent mengsel: meng 100 mL buffer-oplossing 1 met 8 mL oplossing 2 (maximaal 3 dagen bewaren bij 20°C)

Procedure:

Aan 8.0 mL reagens 3 , 0.2 mL sample (0-2% zuur pyrofosfaat, standaardcurve) toevoegen (voorzichtig langs de wand in opl laten vallen). Mix gedurende 15 seconden met een vortexmixer. Overgieten in cuvet en absorptie na 5 minuten meten met spectrofotometer bij 625 nm.

Positieve blanco: los 0.2 mL sample op in 8 mL reagens 2 en meet na zelfde behandeling de absorptie bij 625 nm.

Bijlage IV

Methode van Rouser et al. (1966)

(Procedure afgeleid van de methode volgens een artikel van: Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A., Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. Lipids. 1966, 5, 494-496).

Deze methode is gebaseerd op een hydrolyse van pyrofosfaat in een sterk zuur milieu en kleuring van fosfaat met molybdaat in één stap. Het gevormde fosfomolybdaatcomplex wordt gereduceerd met ascorbinezuur, zodat een blauwe kleur gevormd wordt. De intensiteit van het gevormde complex wordt spectrofotometrisch bepaald bij een golflengte van 797 nm.

Werkwijze:

- 50 ul monster aanzuren met 250 ul perchloorzuur (60%)
- 1 mL aquadest toevoegen
- 0.4 mL 1.25% ammoniummolybdaat toevoegen
- 0.4 mL 5% ascorbinezuur toevoegen
- exact 5 minuten verhitten bij 95°C (buis goed afsluiten)
- monster afkoelen op ijs
- direct absorptie meten bij 797 nm

Bijlage V

Titratiemethode

Pyrofosfaat kan ook gemeten worden door een neerslag te vormen van zink met fosfaat en de vrijkomende protonen terug te titreren met loog naar een bepaalde referentie pH (pH 3.8).

De reactievergelijking is als volgt:



5 mL monster werd aangevuld tot 10 mL met demiwater. Vervolgens werd dit monster met 0.1 M HCl op pH 3.8 gebracht.

Een overmaat ZnSO_4 (1.5 mL 0.5 M) werd toegevoegd om pyrofosfaat neer te slaan. Na 1 minuut roeren werd de oplossing teruggetitreerd naar pH 3.8 met 0.05 M NaOH.

Bijlage VI

Andere directe meetmethoden voor bepaling van pyrofosfaat

In deze bijlage zijn enkele directe meetmethoden beschreven, die naar aanleiding van het literatuuronderzoek en selectiecriteria interessant leken. Nader onderzoek wees echter uit dat deze methoden, op basis van genoemde selectiecriteria, ongeschikt zijn voor verder ontwikkeling.

Een directe methode om pyrofosfaat te meten is die volgens Putnins en Yamada [9]. Zij laten zowel orthofosfaat als pyrofosfaat reageren met molybdaat. Beide componenten vormen een chromofoor met molybdaat. De twee chromoforen verschillen in absorptiespectra. De golflengte waarbij het pyrofosfaatchromofoor relatief het sterkste absorbeert is bij 580 nm. Door weglating van het reducerende reagens wordt alleen de absorptie van orthofosfaat gemeten. Een tienvoudige overmaat orthofosfaat interfereert niet met de pyrofosfaatbepaling. Het is echter mogelijk dat in de praktijk de fosfaatconcentratie in een grotere overmaat aanwezig is. Deze methode is speciaal ontwikkeld voor de moleculaire biologie; de methode is voor toepassing in de industrie te gevoelig, monsters zouden minimaal 1000 maal verdund moeten worden. Tevens werkt men in deze methode met giftige en oxidatiegevoelige reagentia. Op basis van de selectiecriteria is deze methode minder geschikt voor verdere ontwikkeling.

Een directe kleuringsmethode ter bepaling van de concentratie pyrofosfaat is de kleuringsreactie met trans-dichlorobis(ethylenediamine)CoIII. [11]). Hierbij wordt een violette kleur gevormd met een maximum absorptie bij 510 nm. Deze methode geeft afwijkingen in aanwezigheid van een klein aantal cationen. Na nader marktonderzoek blijkt de verkrijgbaarheid van deze kleurstof een probleem te vormen bij verdere ontwikkeling van deze methode.

Een methode gebaseerd op fluorescentie [12] maakt gebruik van een chemosensor 1,8-Bis(TRPN)methylanthracene om pyrofosfaat en orthofosfaat te meten. De affiniteit van deze sensor voor pyrofosfaat is 2000 keer groter als voor orthofosfaat. Onduidelijk is of deze methode ook polyfosfaten meet. Mogelijk is ook deze methode te gevoelig voor het meten van de concentraties pyrofosfaat die op industriële schaal toegepast worden. Deze methode is echter pas interessant wanneer het on-line gebruik van fluorimeters commercieel haalbaar is. Overleg met Molecular Probes wijst uit dat een "custom-made synthesis" economisch niet rendabel is. Mede aan de hand hiervan is besloten deze methode niet verder te ontwikkelen. Molecular Probes blijkt wel een specifieke dye voor fosfaat voor handen te hebben. Echter het meetbereik (0.2 µg/L), het gebruik van dure substraten en het gebruik van twee enzymatische omzettingstappen maken deze fluorescentiemethode ongeschikt voor toepassing op industriële schaal.

Bijlage VII

Berekening van de benodigde tijd voor 99% hydrolyse van pyrofosfaat

De afbraak van pyrofosfaat gegeven door:

$$C_t = C_0 * \exp[-k * t]$$

Tevens wordt aangenomen dat temperatuurafhankelijkheid van de reactieconstante k beschreven kan worden met de Arrhenius vergelijking:

$$k = k_0 * \exp\left[\frac{-E_a}{R * T}\right]$$

waarin C_t = concentratie van pyrofosfaat op tijdstip t
 C_0 = concentratie van pyrofosfaat op tijdstip 0
 k = reactiesnelheidsconstante (1/minuten)
 k_0 = evenredigheidsfactor (1/minuten)
 E_a/R = activeringsenergie / universele gasconstante (K)
 T = reactietemperatuur (K)

Voor 99% omzetting geldt dan:

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -k * t \quad \text{oftewel } t_r = \frac{\ln(0.01)}{-k}$$

waarin

$$k = \exp 20 * \exp\left[\frac{7297}{363}\right] \quad (\text{waarden uit Tabel 5})$$

$$k = 0.92$$

dus voor de reactietijd t_r geldt:

$$t_r = \frac{\ln(0.01)}{-0.92}$$

$$t_r = 5 \text{ minuten}$$

Bijlage VIII

Karakterisering van het “dipbad” medium

In onderstaande tabel zijn de resultaten weergegeven van de parameters die de verschillende aardappelmilieus karakteriseren. Uit de deeltjesgrootte verdeling blijkt dat door maceratie (50 % van) de deeltjesgrootte in het aardappelmilieu is toegenomen en dat deze na incubatie bij 70°C constant blijft. De onopgeloste deeltjes in de aardappelsuspensie zijn voornamelijk intacte aardappelcellen; de celgrootte verdeling is vergelijkbaar met die van de cultivar Nicola en Irene; gemiddeld 220 µm. [10]. De geblancheerde aardappelmonsters (Ai, B, Bi) en het praktijkmonster hebben een kleinere gemiddelde celgrootte: dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door (chemische) afbraak van de celdeeltjes.

De hoeveelheid vrij zetmeel, vrijgekomen uit de aardappelcellen en gemeten aan de blauwkleuring met jodium is na maceratie het grootst en is op 100 % gesteld. De waarden van de andere monsters zijn hieraan gerelateerd. Na incubatie bij 70°C neemt de hoeveelheid vrij zetmeel (aangetoond met behulp van een blauwkleuring geeft), af (zie monster BDMi). Bij langdurig verhitten wordt zetmeel waarschijnlijk afgebroken.

Blancheren en dippen van de aardappelstaafjes geeft een geringe pH-daling van 7.3 (kraanwater) naar 7.0 (Monster BD). Na maceratie blijft de pH 4, veroorzaakt door de citraatbuffer in de maceratiestap.

Karakterisering van gesimuleerde dipbadmonsters en praktijkmonsters

Monster	Drogestof gehalte (%)	pH	Blauwwaarde (%)	Deeltjesgrootte X50 (µm)
water	-	7.0	0	-
Ai	1.18	6.78	nb	140
Bi1	1.26	6.82	nb	135
Bi2	1.12	6.8	nb	nb
Bi3	1.38	6.74	nb	nb
BM	3.5	4.0	nb	180
BMi	3.5	3.96	nb	240
BMf	nb	3.94	nb	nb
B	0.17	7.02	1.7	178
BM 1	3.03	3.98	100	237
BM 2	1.11	4.02	30.8	220
BM 3	0.49	3.98	13.4	236
BM 4	0.31	3.95	9.2	232
BMi	0.31	3.94	6.9	240
P1	0.94	5.74	20.1	160
Z	1.97	6.95	nb	-

nb: niet bepaald, (-): niet van toepassing

Bijlage IX

Veiligheidsnormen van enkele chemicaliën gebruikt in de meetmethoden voor pyrofosfaat

De chemicaliën gebruikt in de verschillende ontwikkelde meetmethoden voor pyrofosfaat zijn over het algemeen veilig in gebruik. Met enkele chemicaliën is enige voorzichtigheid bij toepassing vereist. Hierbij moet vermeld worden dat deze normen gelden voor de droge chemicaliën en sterk geconcentreerde oplossingen. De methoden zijn zodanig ingericht dat relatief lage concentraties gebruikt worden.

Chemicalie	Gevarenaanduiding	Veiligheidsadvies
ammoniumheptamolybdaat	R 36/37/38	S26 S36
ammoniumvanadaat	R 25 R 36/37/38	S37 S45
isobutanol	R 10 R20	S16
zwavelzuur (2.5 M)	R 35	S26 S36/37/39 S45

R- en S-zinnen	
R 36/37/38	Irriterend voor ogen, ademhalingswegen en huid
R25	Vergiftig bij opname door de mond
R10	Ontvlambaar
R20	Schadelijk bij inademing
R35	Kan brandwonden veroorzaken
S26	Bij aanraking met ogen spoelen met overvloedig water en arts raadplegen
S36	Draag beschermende kleding
S37	Draag handschoenen
S39	Gebruik bescherming voor ogen / gezicht
S45	Indien onwel, raadpleeg een arts
S16	Verwijderd houden van ontstekingsbronnen- Niet roken

Bijlage X

Enquête voor de aardappelverwerkende industrie: inventarisatie van de huidige toepassing van pyrofosfaat

De resultaten van deze enquête worden nog geanalyseerd en de gegevens zullen gebruikt worden bij de verzameling van dipbadmonsters uit de praktijk. Tevens geeft deze enquête meer inzicht in de eisen waaraan het pyrofosfaat meetsysteem moet voldoen.

De gegevens van deze enquête zullen vertrouwelijk behandeld worden: in de rapportages voor de VAVI zullen slechts algemene trends en data weergegeven worden.

INVENTARISATIE VAN DE HUIDIGE TOEPASSING VAN PYROFOSFAAT

Algemene informatie over dit VAVI-project

Projecttitel: Vermindering van het pyrofosfaatverbruik in de aardappelverwerkende industrie door betere procesbeheersing

Korte projectomschrijving:

Ten behoeve van de aardappelverwerkende industrie wordt een snelle instrumentele methode ontwikkeld, om het pyrofosfaatgehalte in een dipunit on-line tijdens de aardappelverwerking te kunnen meten. Het doel van het project is hierbij:

- 1) betere controle van de pyrofosfaatconcentratie in de dipunit
- 2) reductie van de fosfaatafvalstromen bij de aardappelverwerking.

Doel van deze enquête:

Deze enquête is bedoeld om meer inzicht te verkrijgen in de huidige toepassing en de dosering van pyrofosfaat om de grauwwerking bij aardappelprodukten te reduceren. Ten tweede is het voor de uiteindelijke toepassing van een on-line systeem om pyrofosfaat te meten van belang om een beter inzicht te krijgen in de procesomstandigheden in relatie tot de aard en de plaatsing van de on-line meetapparatuur. Met deze achtergrond kan ook bekeken worden hoe de nieuw ontwikkelde meetmethode voor pyrofosfaat afgestemd kan worden op de huidige toepassing in het aardappelverwerkingsproces. Ook zijn wij geïnteresseerd in de meetmethode(n) die momenteel worden toegepast om pyrofosfaat te meten. Op grond van deze gegevens kan een evaluatie gemaakt worden van de huidige toepassing van pyrofosfaat. Vervolgens zal gekeken worden naar mogelijkheden om de huidige toepassing op korte termijn te verbeteren. Hiervoor hebben wij kennis van enkele snelle, eenvoudige meetmethoden die ingepast zouden kunnen worden om het pyrofosfaatgehalte te volgen. Het resultaat na verdere ontwikkeling en optimalisatie van de meetmethode voor pyrofosfaat zal een snelle goedkope on-line meting zijn, die goed zal aansluiten op de gebruikte procesomstandigheden. Dit zal vervolgens resulteren in een meer gecontroleerde dosering van pyrofosfaat.

Wij begrijpen dat wij met deze enquête een beroep doen op uw tijd, maar uw medewerking zal de uiteindelijke toepassing van een snelle meetmethode voor pyrofosfaat ten goede komen.

Op de volgende pagina's zullen enkele vragen gesteld worden over procesparameters van de aardappelverwerking, de dosering van pyrofosfaat en de huidige meetmethode toegepast om pyrofosfaat te meten. Het is de bedoeling dat u bij *meerkeuzevragen aankruist wat van toepassing is*.

Tevens willen wij benadrukken dat alle gegevens *vertrouwelijk behandeld* zullen worden.

Procesparameters van de aardappelverwerking

68. Wat is de actuele doorvoer van de aardappelverwerkende lijn ter plaatse van de dipunit?
(uitdrukken in)

Gemiddeld	kg aardappelprodukt / uur
Minimaal	kg aardappelprodukt / uur
Maximaal	kg aardappelprodukt / uur

69. Wordt de dosering pyrofosfaat aangepast aan de actuele doorvoer van de lijn?

☐ ja
☐ nee
☐ soms, nl...

70. Wat is de temperatuur van de laatste blancheur?

☐ ongeveer 60°C
☐ ongeveer 70°C
☐ ongeveer 80°C

Dosering van pyrofosfaat

71. Wat is de huidige, meest frequente toepassing van pyrofosfaatosering?

☐ toevoeging pyrofosfaat aan blancheerbak
☐ toediening pyrofosfaat aan een dipbad dat na de blancheur geplaatst is
☐ toediening pyrofosfaat door besprenkeling van het aardappelprodukt met een spray
☐ anders, nl....

72. Hoe vaak wordt pyrofosfaat gedoseerd?
- 0 discontinu, met een frequentie van keer per uur kg/ keer
- 0 continu, met een concentratie van g/L L/ uur
73. Wat is de verblijftijd van het aardappelprodukt in de pyrofosfaatoplossing?
- seconden
74. Wat is de temperatuur van de dipunit waaraan pyrofosfaat wordt toegevoegd?
- °C
75. Wat is het volume van het water in de dipunit voor pyrofosfaat?
- Liter
76. Wanneer vindt de ontwateringsstap van het aardappelprodukt plaats?
- 0 altijd voor het dippen van het aardappelprodukt in pyrofosfaat
- 0 altijd na het dippen van het aardappelprodukt in pyrofosfaat
- 0 soms voor, soms na het dippen van het aardappelprodukt in pyrofosfaat
- 0 zowel voor als na het dippen van het aardappelprodukt in pyrofosfaat
- 0 niet van toepassing
77. Wordt het volume van de pyrofosfaatoplossing in de dipunit op peil gehouden door toevoegen van vloeistof?
- 0 nee
- 0 ja, discontinu
- 0 ja, continu
- 0 ja, door overloop van de dipunit
78. Denkt u dat het transportsysteem naar de dipunit toe, naast aanhangend vocht, zorgt voor extra toevoer van (blancheer)water aan de dipunit?
- 0 niet van toepassing
- 0 nee
- 0 ja, ongeveer.... L/uur

79. Denkt u dat het transportsysteem van de dipunit af, naast aanhangend vocht, zorgt voor extra afvoer van (dipunit)water naar het volgende onderdeel van de lijn?
- ☐ niet van toepassing
 - ☐ nee
 - ☐ ja, ongeveer.... L/uur
80. Wordt de dipunit voor pyrofosfaat gereinigd, en zo ja, hoe vaak?
- ☐ nee
 - ☐ ja, met een frequentie van...

Huidige meetmethode om pyrofosfaat te meten

81. Wordt er momenteel een meetmethode toegepast om pyrofosfaat te meten?
- ☐ nee → ga verder naar vraag 85.
 - ☐ ja → ga verder naar vraag 82.
82. Welke methode wordt momenteel het meest frequent toegepast om pyrofosfaat te meten?
- ☐ precipitatie met zinksulfaat, waarbij de vrijgekomen protonen teruggetitreerd worden met loog.
 - ☐ molybdaatblauwmethode, waarbij pyrofosfaat omgezet wordt naar fosfaat met behulp van het enzym pyrofosfatase (o.a. Boehringertest)
 - ☐ molybdaatblauwmethode, waarbij pyrofosfaat omgezet wordt naar fosfaat met behulp van een zure hydrolyse
 - ☐ anders, nl...
83. Voldoet deze methode aan uw wensen? (*evt meerdere antwoorden aankruisen*)
- ☐ ja
 - ☐ nee, want de kosten van deze methode zijn te hoog
 - ☐ nee, want de methode duurt te lang
 - ☐ nee, want de methode is onbetrouwbaar
 - ☐ nee, want...

84. Hoe vaak wordt het gehalte aan pyrofosfaat gemeten?

- 0 ongeveer 3 keer per uur
- 0 ongeveer 2 keer per uur
- 0 ongeveer 1 keer per uur
- 0 anders, nl...

85. Wordt de pyrofosfaatdosering aangepast aan de volgende zaken?

- 0 aardappelras ja/ nee
- 0 actuele doorvoer ja/ nee
- 0 snijmaat ja/ nee
- 0 produkttype ja/ nee
- 0 anders, nl...

86. Wat is de minimale concentratie pyrofosfaat die nog toelaatbaar is, zonder kwaliteitsverlies van het aardappelprodukt?

%

87. Wat is maximale pyrofosfaatconcentratie die nog toelaatbaar is met betrekking tot de kwaliteit van het aardappelprodukt? (uitdrukken in %)

- 0 %
- 0 niet van toepassing

88. Heeft u naar aanleiding van deze enquête nog op- of aanmerkingen?