

Project 505.0200

Ontwikkeling methoden voor het bepalen van diverse additieven in levensmiddelen.

Projectleider: ir P. Hollman

RAPPORT 89.20 maart 1989

Amino-oxyazijnzuur (AOA) in anjers:
Ontwikkeling van een HPLC methode.

M.L. Essers en ir P.C.H. Hollman

Afdeling: MNT

Medewerkers: J.J. van Oostrom en J.H. Slangen

Goedgekeurd door: dr H. Herstel

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75108 RIKIL

Telefax 08370-17717

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

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermel-
ding.

VERZENDLIJST

INTERN:

Directeur

Sectorhoofden

Afdeling MNT (5X)

Programmabeheer en Informatieverzorging

Bibliotheek

Circulatie

EXTERN:

Directie Landbouwkundig Onderzoek (2x)

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Sprenger Instituut (H. Harkema, E. Woltering)

Directie AT

CABO

Directeur van het Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland,

Aalsmeer

AGRALIN

ABSTRACT

AMINO-OXYAZIJNZUUR (AOA) IN ANJERS: ONTWIKKELING VAN EEN HPLC METHODE

AMINO-OXYACETIC ACID IN CARNATION CUT FLOWERS: DEVELOPMENT OF AN HPLC METHOD

Report 89.20 March 1989

P.C.H. Hollman and M.L. Essers

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT),
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

6 figures, 7 tables, 3 references

Amino-oxyacetic acid (AOA) has proven to enhance the keeping quality of carnation cut flowers. Introduction of this chemical in commercial floriculture requires a method to check whether or not flowers are pretreated.

A reversed phase HPLC method was developed for the determination of AOA in carnation cut flowers. The method is based on the reaction of AOA with pyridoxal to form an O-substituted oxime, which can be determined with fluorescence detection. Complete extraction of AOA from flowers proves to be difficult. A step by step procedure had to be developed. First a pyridoxal solution is added to the sample and allowed to react with AOA, followed by hydrolysis with sulphuric acid/urea at 80°C. The final step is an enzymatic hydrolysis with Rohament PC. The concentration of pyridoxal shows to be limitative. The method developed gives reproducible results with recovery values of added AOA better than 95%.

Keywords: amino-oxyacetic acid, AOA, HPLC, keeping quality, carnation cut flowers.

INHOUD	blz.
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODE	7
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	8
3.1 Inleidende experimenten	8
3.1.1 Chromatografische condities	8
3.1.2 Extractie van AOA uit het plantemateriaal	9
3.1.2.1 Extractie in zuur, neutraal en alkalisch milieu	9
3.1.2.2 Extractie met zuur en ureum	10
3.1.2.3 Enzymatische extractie	11
3.1.2.4 Combinatie van chemische en enzymatische extractie	12
3.1.2.5 Voorderivatisering	12
3.2 Optimaliseren van de methode	13
3.2.1 Invloed van PL	13
3.2.2 Stabiliteit AOA en AOA-PL	16
3.3 Monsters	18
3.3.1 AOA gehalte in onderdelen behandelde bloemen	19
3.3.2 Onbehandelde onderdelen bloemen met toevoeging AOA	20
4 CONCLUSIES	21
LITERATUUR	21
BIJLAGEN	
A Monstermateriaal met bijbehorend AOA gehalte	
B Invloed pH op de reactie van AOA met PL	
C Chromatogrammen van standaarden	
D Gehalte AOA en recovery toegevoegde standaard afhankelijk van PL hoeveelheid	
E Gehalte AOA afhankelijk van hoeveelheid PL in de verschillende fasen	
F Invloed temperatuur en hoeveelheid PL tijdens voorderivatisering	
G De invloed van PL in de verschillende fasen	
H Chromatogrammen van onderdelen van met AOA behandelde anjers	
I Chromatogrammen van onderdelen van onbehandelde anjers	
J Werkvoorschrift	

SAMENVATTING

Voor een langer vaasleven worden anjers momenteel na het afsnijden gedurende enige tijd geplaatst in een oplossing van zilverthiosulfaat. Zilverthiosulfaat is uit milieu oogpunt echter minder gewenst. Uit praktijkonderzoek is gebleken dat amino-oxyazijnzuur (AOA) ook het vaasleven verlengt. Voor de acceptatie van het AOA in de anjerteelt is het echter noodzakelijk aan te kunnen tonen of een anjer al dan niet behandeld is met AOA. Doel van het hier beschreven onderzoek was een methode te ontwikkelen voor het bepalen van AOA in met deze stof behandelde anjers.

AOA vertoont geen absorptie in het ultraviolette en zichtbare gebied. Wel vormt AOA met pyridoxal (PL) een oxim, optimaal bij pH 4.6, dat na scheiding met behulp van reversed phase HPLC fluorimetrisch gemeten kan worden.

Onderzocht is of AOA door middel van een eenvoudige extractie in zuur, alkalisch of neutraal milieu geëxtraheerd kon worden uit het plantemateriaal. Dit bleek niet mogelijk, waarna een stapsgewijze extractie onderzocht is.

Optimale extractie van het AOA werd verkregen door het gevriesdroogde plantemateriaal, zowel de complete bloem als de verschillende delen zoals stengel, bloemblaadjes, blad en knop, achtereenvolgens te behandelen met PL, zuur en ureum bij 80°C en het enzym Rohament PC. De stabiliteit van zowel AOA als AOA-PL onder deze omstandigheden is onderzocht.

Deze methode (zie bijlage J) is getoetst met behulp van behandelde anjers, en onbehandelde anjers waaraan standaarden werden toegevoegd. De analytische recovery van toegevoegde standaarden is goed (>95%). Voor met AOA behandelde anjers werd een recovery van 75% gevonden ten opzichte van het theoretisch opgenomen gehalte berekend uit de wateropname. Onvolledige extractie van AOA uit de anjer is slechts een van de mogelijke verklaringen. De methode is echter bruikbaar ter bepaling van AOA in met AOA behandelde anjers.

Voor controle doeleinden, waarbij kwantitatieve extractie minder belangrijk is, kan de extractie procedure naar verwachting vereenvoudigd worden.

()

()

1 INLEIDING

Snijbloemen worden, alvorens ze op de veiling verhandeld worden, behandeld met zilverthiosulfaat waardoor het vaasleven aanzienlijk verlengd kan worden. Uit milieu oogpunt heeft het gebruik van zilverthiosulfaat echter een aantal bezwaren, waardoor tuinders gedwongen zijn arbeidsintensieve maatregelen te nemen. Vervanging van zilverthiosulfaat door een milieuvriendelijk middel zou genoemde nadelen van zilverthiosulfaat kunnen ondervangen.

Onderzoek bij het Sprenger Instituut aan anjers heeft een veelbelovend alternatief voor zilverthiosulfaat opgeleverd: amino-oxyazijnzuur, zie Woltering et al. (1987). Acceptatie van amino-oxyazijnzuur (AOA) is pas mogelijk als op veilingen aangetoond kan worden dat de aangeboden bloemen inderdaad met AOA behandeld zijn. Een analysemethode voor AOA blijkt echter niet voorhanden te zijn.

Het Sprenger Instituut heeft derhalve het RIKILT verzocht een analysemethode voor AOA te ontwikkelen. Inleidend onderzoek gaf vrij snel aan dat controle van bloemen op aan- of afwezigheid van AOA mogelijk is, waardoor acceptatie van het gebruik van AOA uit het oogpunt van controle geen bezwaren meer gaf. Voor onderzoek naar de fysiologische aspecten van AOA waren kwantitatieve gegevens over de verdeling van AOA in de bloem noodzakelijk. Uit het inleidende onderzoek bleek dat kwantitatieve extractie van AOA uit de bloem moeilijk is. In dit rapport wordt de ontwikkeling van een kwantitatieve methode voor de bepaling van AOA in anjers beschreven. Voor controle doeleinden zou volstaan kunnen worden met een eenvoudigere methode aangezien kwantitatieve aspecten hierbij minder belangrijk zijn. Hieraan wordt in dit rapport verder geen aandacht besteed.

2 MATERIAAL EN METHODE

Het monstermateriaal, behandelde anjers, werd verkregen via het Sprenger Instituut. Voor deze behandeling werden oplossingen gemaakt van AOA in water. In deze oplossingen werden anjers gedurende een dag geplaatst. Door weging werd bepaald hoeveel water, en dus AOA, door de monsters werd opgenomen. Hierbij werd rekening gehouden met verdamping

van water uit de oplossing. Daarnaast werden nog anjers gedurende een dag in water zonder AOA geplaatst (onbehandeld) en hierna wel of niet gescheiden in bloemblaadjes, steel, blad en rest. Deze monsters zijn gebruikt voor recovery bepalingen. De gehele anjer of onderdelen hiervan (bloemblaadjes, steel, blad en rest) werden hierna in stukken geknipt en gemalen na bevroren met vloeibare stikstof. In een later stadium werd tevens gevriesdroogd en gemalen over 0,5 mm.

De monsters, met vermelding van monster code en het theoretisch gehalte aan AOA, die gebruikt zijn voor het onderzoek staan vermeld in tabel 1 in bijlage A. Van de monsters gebruikt voor het oriënterende onderzoek was de AOA opname niet bekend.

De standaard amino-oxyazijnzuur (AOA) was afkomstig van Sigma en pyridoxalhydrochloride (PL) van Merck.

Pomp: Waters model 590, flow 1.0 ml/min.

Kolom: Merck Reversed phase 5 μm C18 (lengte 10 cm, interne diameter 4 mm) met 4 cm voorkolom reversed phase 30 μm C18.

Mobiele fase: Los op 1.2428 g tetraethylammoniumchloride, 1.6516 g natriumheptaansulfonzuur $\cdot\text{H}_2\text{O}$ en 6.805 kaliumdiwaterstoffosfaat in circa 750 ml water. Breng op pH 2.6 met behulp van fosforzuur (1+1), voeg toe 95 ml acetonitril en vul aan met water tot 1 liter.

Detectie: Fluorescentie detector Hitachi FS 1000:

Excitatiegolflengte 315 nm en emissiegolflengte 460 nm.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

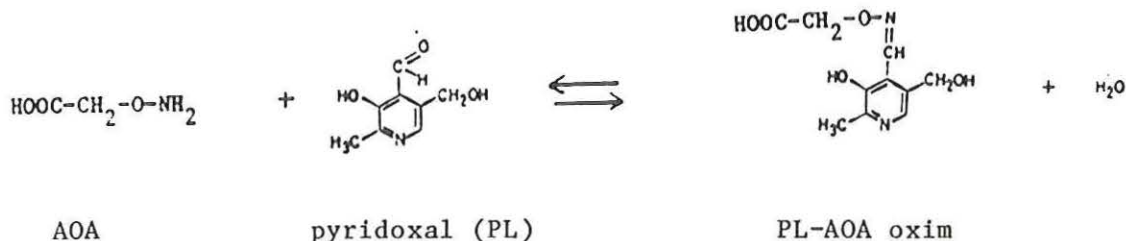
3.1 Inleidende experimenten

De mogelijkheden van de detectie van AOA en de extractie van AOA uit het plantemateriaal zijn onderzocht en worden achtereenvolgens beschreven.

3.1.1 Chromatografische condities

Uit de structuur van het AOA volgt dat detectie op basis van UV-absorptie niet erg aantrekkelijk is, aangezien AOA een weinig specifiek spectrum heeft. Derhalve is derivatiseren van AOA noodzakelijk. Vorming van een fluorescerende verbinding uit AOA met behulp van

O-phtaalaldehyde (OPA) analoog aan de standaardprocedure voor aminozuren bleek niet mogelijk. Een alternatieve derivatiseringsreactie, gebaseerd op het werkingsmechanisme van AOA in de plant (Woltering et al., 1987), werd daarom ontwikkeld. Deze derivatisering verloopt via onderstaande reactievergelijking.



Er wordt hierbij een Schiffse base gevormd, die in dit geval een O-gesubstitueerd oxim is. De derivatiseringsreactie werd vervolgens geoptimaliseerd, waarbij bij kamertemperatuur bij diverse pH's de vorming van het AOA-PL oxim in de tijd gevolgd werd. Uit bijlage B, fig. 1 en 2, blijkt dat er een optimum pH is, pH 4.6, waarbij na 80 min. geen extra oxim meer gevormd wordt.

De HPLC condities werden afgeleid van de bepaling van vitamine B₆, waarbij voor de scheiding van pyridoxal, pyridoxine en pyridoxamine gebruik gemaakt wordt van ion pairing (heptaansulfonzuur) reversed phase (C18) HPLC (RIKILT rapport 85.34).

3.1.2 Extractie van AOA uit het plantemateriaal

Om AOA uit het plantemateriaal te extraheren zijn verschillende mogelijkheden onderzocht. Deze worden hierna beschreven.

De proeven zijn uitgevoerd met oorspronkelijk niet gevriesdroogd materiaal (code 1 en 2, bijlage A).

3.1.2.1 Extractie in zuur, neutraal en alkalisch milieu

Anjerstelen zijn geëxtraheerd met water onder roeren (30 min). Tevens zijn ze geëxtraheerd met behulp van zuur (0.05 M) onder de volgende condities: 30 minuten roeren, 30 min ultrasoon, 30 min autoclaaf (120°C) en 30 min roeren bij 80°C. Ook zijn anjerstelen geëxtraheerd

met behulp van borax/HCL in het gebied van pH 7 tot 10. Na de extractie werd PL toegevoegd en onder bovengenoemde condities (3.1.1) gemeten. Met de genoemde methoden werd geen of nauwelijks AOA uit het materiaal geëxtraheerd. Tevens bleek dat AOA niet bestand is tegen autoclaveren en hoge temperatuur. AOA is dus moeilijk uit het materiaal te extraheren waardoor extremere middelen nodig zijn, de stabiliteit van AOA is dan de beperkende factor.

3.1.2.2 Extractie met zuur en ureum

Bij de bepaling van B vitamines wordt als extractiemiddel gebruik gemaakt van ureum en zwavelzuur volgens Roy R.B. and Salpeter J. (1976). Ureum bevordert de ontsluiting van de monstermatrix (eiwitten) en beschermt hierbij de vitamines. Nagegaan is of dit ook van toepassing is bij de extractie van AOA uit anjerstelen. Hiertoe zijn enige proeven uitgevoerd met ureum + zwavelzuur in de autoclaaf (in aanwezigheid van PL en met PL toevoeging achteraf) en ureum + zwavelzuur bij zowel kamertemperatuur als bij 80°C. Alleen ureum, zonder aanwezigheid van PL, beschermde AOA niet. Ureum + zwavelzuur extraheerde AOA echter beter dan alle voorgaande extractie middelen en bij 80°C werd het hoogste gehalte gevonden, namelijk 44 µg/g.

De benodigde hoeveelheid ureum werd bepaald door aan 5 g monster, in aanwezigheid van zuur en PL, 1,2 en 4 g ureum toe te voegen. De gevonden optimale hoeveelheid was 2 g ureum.

De benodigde extractietijd werd vervolgens vastgesteld door 5 g anjerstelen te extraheren bij 80°C met zwavelzuur 0.1 M en 2 g ureum in aanwezigheid van PL gedurende 1,2,3, en 4 uur. Het gevonden AOA gehalte werd hoger naarmate langer geëxtraheerd werd namelijk respectievelijk 40, 56, 62 en 70 µg/g. De stabiliteit van de standaard onder deze omstandigheden werd onderzocht. De standaard werd gedurende 3, 5, 6.5 en 8 uur, met PL toevoeging, bij 80°C gezet. Gekozen is voor een extractietijd van 6 uur, omdat bij 8 uur een tendens tot verlaging werd geconstateerd.

Tevens is onderzocht welke invloed de pH en ureum hebben op een standaard. Standaarden met PL zijn gedurende 2, 3 en 4 uur met en zonder ureum bij 80°C geplaatst met de pH's 1.6, 4.6 en 8.3. Na afkoelen en een nacht staan zijn alle oplossingen 10 maal verdund met buffer uit

eluens (pH 2.6). De standaard blijkt stabiel bij pH 1.6 met of zonder aanwezigheid van ureum terwijl bij de pH's 4.6 en 8.3 de standaard in de tijd duidelijk afnam. De invloed van de zwavelzuur concentratie is nagegaan door standaardoplossingen te behandelen met 0.1, 0.2, 1, 2, en 3 M zwavelzuur gedurende 6 uur bij 80°C in aanwezigheid van ureum en PL. Gekozen is voor 0.2 M al waren de verschillen ten opzichte van de andere molariteiten klein.

De optimale omstandigheden tot nu toe waren: 5 g monster behandelen met 0.2 M zwavelzuur (5 ml overeenkomende met pH 1.6) gedurende 6 uur bij 80°C in aanwezigheid van 2 g ureum en PL. In anjerstelen op deze wijze geëxtraheerd werd nu een gehalte van 129 µg/g gevonden. De extractie van bijbehorende bloemblaadjes gaf een gehalte van 21 µg/g. De mogelijk positieve invloed van vriesdrogen is nagegaan. Zowel de steel als de bloemblaadjes zijn gevriesdroogd. De monster hoeveelheden zijn aangepast, waarbij de verhouding ureum/droge stof constant gehouden werd. Het monster werd geëxtraheerd volgens bovenstaande omstandigheden. Vriesdrogen bleek geen invloed te hebben op het gehalte. Omwille van de homogeniteit van de monsters is bij volgende proeven steeds gevriesdroogd materiaal gebruikt.

Onder bovengenoemde omstandigheden werden anjerstelen in viervoud geanalyseerd met en zonder toevoeging van AOA. Zonder toevoeging werd 615, 620, 635 en 610 µg/g d.s. gevonden. Monsters met toevoeging van 227.5 µg AOA/g d.s. gaven 780, 775, 775 en 750 µg/g d.s. als resultaat. De recovery van de toegevoegde standaard was hiermee tussen de 50 en 75%. De methode is reproduceerbaar echter de recovery is onbevredigend.

3.1.2.3 Enzymatische extractie

Aangezien het AOA moeilijk extraheerbaar en/of instabiel is tijdens de extractie werd bekeken of een enzymatische ontsluiting van de plantematrix betere resultaten gaf. De volgende enzymen (cellulasen/pectinase(n)), waarvan verondersteld werd dat ze geschikt zijn om de plantematrix te ontsluiten, zijn getest: Rohament PC , PEX en Pectinex ultra SP. Deze enzymen werken optimaal bij 45°C en een pH van circa 4.5. Ze zijn allen (10 mg enzym per 0.2 gram monster d.s.) getest op een monster anjersteel en bloemblaadjes in buffer pH 4.6 (optimale pH voor

oximvorming uit AOA en PL) gedurende 20 uur in aanwezigheid van PL. Het meest geschikte enzym was Rohament PC en gaf als resultaat respectievelijk 225 en 45 µg/g d.s.

3.1.2.4 Combinatie van chemische en enzymatische extractie

Daar zowel met de chemische als de enzymatische extractie AOA vrij gemaakt wordt uit het monster is nagegaan of een combinatie hiervan mogelijk is. Een monster anjersteel en bloemblaadjes zijn eerst volgens de chemische extractie 6 uur bij 80°C geplaatst waarna verdund werd met buffer pH 4.6 (10X) en 20 uur bij 45°C geplaatst in aanwezigheid van 10 mg enzym Rohament PC per 0.2 gram gevriesdroogd monster. Deze proef werd uitgevoerd zowel met als zonder ureum. De combinatie van de chemische en enzymatische extractie leverde een hoger gehalte op dan de chemische extractie alleen. Met ureum werd het beste resultaat verkregen namelijk 740 µg/g d.s in de steel en 120 µg/g d.s. in de bloemblaadjes.

3.1.2.5 Voorderivatisering

Zowel de enzymatische als combinatie van de chemische met enzymatische methode blijkt nog niet voldoende op te leveren. Een andere weg werd daarom bewandeld, waarbij AOA zo snel mogelijk met PL in contact werd gebracht. Hiertoe werd de steel gedurende 2 uur behandeld met PL in buffer pH 4.6 waarna het monster verder afgewerkt werd volgens de gecombineerde chemische en enzymatische methode. Tevens werd hetzelfde monster behandeld zonder voorbehandeling met PL.

Met deze voorbehandeling met PL werd een gehalte gevonden van circa 850 µg/g d.s. terwijl zonder voorbehandeling circa 475 µg/g d.s. werd gevonden.

De voorderivatisering heeft dus een duidelijke invloed op het resultaat. Twee verklaringen voor dit gunstige effect liggen voor de hand: enerzijds is het AOA-PL oxim stabielere dan AOA, anderzijds zou verdringing van aan plantenvezels gebonden AOA door de vorming van het AOA-PL oxim een rol kunnen spelen.

3.2 Optimaliseren van de methode

Uit het voorgaande blijkt dat voor de bepaling van AOA in anjers de beste resultaten verkregen worden met een methode die uit de volgende 3 fasen bestaat:

fase 1 - Voorderivatisering:

0.2 g gevriesdroogd monster met 3 ml buffer (pH4.6) en 1 ml PL oplossing (3mg) gedurende een nacht laten staan bij kamertemperatuur

fase 2 - Chemische extractie:

toevoeging van 0.4 g ureum en 5 ml zwavelzuur 0.2 M en gedurende 6 uur bij 80°C

fase 3 - Enzymatische extractie:

circa 35 ml bufferoplossing (pH 4.6) en 1 ml enzymoplossing (10 mg) toevoegen; aanvullen tot 50 ml en gedurende 1 nacht bij 45°C; afkoelen, mengen, filtreren en injecteren op HPLC

Het onderzoek naar het optimaliseren van de methode wordt hierna beschreven.

Het AOA gehalte wordt berekend met behulp van een referentie. Dit is een standaard AOA die een nacht gereageerd heeft met PL in bufferoplossing pH 4.6. De controle van de bepaling wordt uitgevoerd met een interne standaard. Dit is een standaard AOA die de gehele bepaling heeft doorlopen.

3.2.1 Invloed PL concentratie

Het onderzoek naar de invloed van PL op zowel standaarden als monsters met en zonder toevoegingen van AOA zijn onderzocht.

De invloed van PL op standaarden is nagegaan door referenties te maken met AOA concentraties van 0, 25 en 50 µg per 50 ml en PL toevoeging van 1.5, 6, 9, en 15 mg. De verhouding in molen van PL ten opzichte van AOA varieerde hierdoor van 16 tot 320.

Bij zowel 25 als 50 µg AOA werd onafhankelijk van de PL toevoeging een even hoge piek waargenomen. PL stoorde de bepaling niet. Een 16 voudige overmaat PL ten opzichte van AOA is dus voldoende voor een volledige omzetting van AOA naar AOA-PL (zie chromatogrammen in bijlage C).

Tot nu toe werd er gebruik gemaakt van 3 mg PL per 0.2 g gevriesdroogd monster (molverhouding PL/AOA circa 40). Nagegaan is wat de invloed is van 10 en 20 mg PL. De monsters met code 3, 4, 5 en 6 (zie bijlage A) zijn zonder en met toevoeging van 26.25 µg AOA per 0.2 gram droge stof in duplo onderzocht. Monster met code 5 bevatte theoretisch 600 µg AOA per gram droge stof.

De resultaten staan vermeld tabel 2 in bijlage D.

De recovery's van de toevoegingen varieerden van 66 tot 102% terwijl de recovery's van de interne standaarden varieerden van 92 tot 102%. Bij de monsters met code 4 en 5 werd bij het gebruik van 20 mg PL in plaats van 10 mg gemiddeld een hoger gehalte aan AOA gevonden respectievelijk 551 tegen 523 en 472 tegen 428. De recovery van het theoretisch gehalte in monster 10 is bij het gebruik van 20 mg PL circa 79%. Uit de voorgaande resultaten blijkt dat bij het gebruik van 20 mg PL in plaats van 10 mg met uitzondering bij de bloemblaadjes een hoger gehalte aan AOA gevonden werd. Nagegaan is in welke fase(n) van de bepaling PL de grootste invloed heeft. Hiertoe zijn monsters volgens verschillende procedures behandeld met zowel 20 als met 40 mg PL. De monsters met code 4 en 5 zijn in drievoud onderzocht en wel volgens volgend schema:

- A - monster + PL + buffer en enzym , 1 nacht bij 45°C = fase 3
- B - monster + PL + buffer, 1 nacht kamertemperatuur = fase 1.
- C - monster + 0,4 g ureum en 5 ml zwavelzuur 6 uur 80°C, daarna + buffer + PL en enzym, 1 nacht bij 45 C = fase 2 zonder PL en fase 3 met PL toevoeging.

De gemiddelde recovery's van de interne standaarden van de verschillende procedure's waren voor A 93.3%, voor B 97.3% en voor C 14.4%.

De resultaten van de monsters staan vermeld in tabel 3 in bijlage E. Uit de resultaten blijkt dat een verdubbeling van de hoeveelheid PL van 20 tot 40 mg bij deze experimenten een aanmerkelijke winst oplevert namelijk een verhoging met 14 tot 28% voor beide monsters.

Het grootste effect treedt op tijdens de voorderivatisering. Het experiment volgens procedure C werd uitgevoerd zonder toevoeging van PL tijdens de zure hydrolyse. PL werd pas toegevoegd nadat de monsters

uit de stoof werden gehaald (6 uur, 80°C). De extreem lage gehalten van beide monsters en de lage recovery's van de interne standaard wijzen duidelijk op afbraak van het AOA. Het AOA-PL oxim daarentegen is stabiel onder deze omstandigheden (zie ook hoofdstuk 3.1.2.2).

Met een verhoging van PL werd nog steeds een hoger gehalte aan AOA gevonden in de monsters. Onderzocht is of een nog hogere toevoeging van PL een hoger eindresultaat gaf. Hiertoe is de voorderivatisering uitgevoerd met 25 en 100 mg PL. Tevens is onderzocht of de temperatuur tijdens de voorderivatisering invloed heeft op het gehalte. De voorderivatisering is daarom uitgevoerd bij kamertemperatuur, 45°C, 60°C en 80°C. Het monster materiaal bestond uit monster met code 7 (theoretisch gehalte circa 1200 µg per gram droge stof). Tevens zijn interne standaarden bereid met eveneens toevoeging van 25 en 100 mg PL. Daar een grote hoeveelheid PL werd gebruikt en tevens tot 80°C werd verwarmd is om de invloed hiervan op de chromatografie na te gaan een bepaling uitgevoerd met alleen de chemicalien (blanco). De resultaten, verkregen na verschillende fasen 1 en fase 2+3, staan vermeld in tabel 4 en tabel 5 in bijlage F.

Uit de resultaten blijkt dat bij de voorderivatisering temperatuursverhoging tot 60°C geen effect heeft. Het gevormde AOA-PL oxim bij deze temperatuur is stabiel in fase 2 en fase 3 gezien de recovery's van circa 100% van de interne standaarden. Bij 80°C breekt het AOA echter af (recovery's interne standaarden circa 87%). Tevens is bij deze temperatuur afbraak geconstateerd van het PL. Een PL toevoeging van 25 of 100 mg geeft een verhoging van het AOA-PL oxim in het monster van circa 10%. De recovery van monster met code 7 is bij het gebruik van 100 mg 79.9% ten opzichte van het theoretische gehalte van 1200 µg/g droge stof. Bij de interne standaarden heeft de hoeveelheid PL geen invloed. Verondersteld werd dat de verhoging van het AOA-PL oxim bij het gebruik van 100 mg PL veroorzaakt werd door een grotere verhouding PL/AOA tijdens het vrijkomen van AOA in fase 2.

De invloed van PL, 25 of 100 mg, in de fasen diende dus gecontroleerd te worden door elke fase(n) afzonderlijk te analyseren. Om de invloed van de chemicaliën (pH) te nivelleren zijn de drie fasen volgens onderstaand schema met monster code 7 in duplo gecontroleerd:

Controle fase 1: Uitvoering van fase 1. Vlak voor de injectie werden de chemicalien van fase 2 en fase 3 toegevoegd

Controle fase 2: Uitvoering van fase 1 en fase 2. Na afkoelen, chemicalien van fase 3 toevoegen en direct injecteren

Controle fase 1+2+3: Normale analyse

De gemiddelde recovery percentages van de interne standaarden waren voor de verschillende controles met 25 mg Pl toevoeging respectievelijk 100.8, 106.3 en 100.2 en voor 100 mg PL toevoeging respectievelijk 100.9, 106.6 en 100.8.

De resultaten van de monsters zijn weergegeven in een grafiek in bijlage G. Hieruit blijkt dat het gebruik van 100 in plaats van 25 mg PL het meeste invloed heeft in fase 1, hetgeen overeenkomt met het voorgaande experiment. Fase 3 (enzym) heeft geen invloed op het gehalte bij het gebruik van 100 mg PL. Bij 25 mg PL werd nog een kleine verhoging in gehalte geconstateerd (25 µg op de 900 µg).

Gezien de beperkt beschikbare tijd is het effect van het weglaten van het enzym niet nader onderzocht. De recovery van monster met code 7 is nu 79.3% van het theoretisch gehalte. De recovery van 106% (controle fase 1+2) van de interne standaard was nog niet duidelijk.

De hoeveelheid PL had nagenoeg geen invloed op de toename van het AOA-PL in fase 2. De winst van 100 mg ten opzichte van 25 mg PL werd echter wel verkregen in fase 1.

Gezien de toename van het AOA gehalte in het monster bij het gebruik van 100 mg PL ten opzichte van 25 mg PL is het monster tevens onderzocht met een toevoeging van 1 gram PL. Ten opzichte van 100 mg PL werd echter geen verhoging van het AOA gehalte geconstateerd.

3.2.2 Stabiliteit AOA en AOA-PL

De stabiliteit van zowel AOA als AOA-PL zijn getest en worden hierna beschreven.

Tijdens het onderzoek is gebleken dat de hoeveelheid PL voornamelijk in fase 1 en niet in fase 2 een grote invloed heeft op het uiteindelijke gehalte AOA. Onbekend was echter nog of het vrijkomende AOA in fase 2 wel volledig ongezet wordt in AOA-PL. De stabiliteit van AOA in fase 2 (6 uur 80°C in aanwezigheid van zuur en ureum) is onderzocht

door AOA standaarden eerst te behandelen volgens fase 1 (25 mg PL) waarna in fase 2 op de tijdstippen 0, 2 en 4 uur (respectievelijk t₀, t₂ en t₄) gelijke hoeveelheden AOA werden toegevoegd. Om de invloed van fase 3 hierop uit te sluiten is deze fase wel (enzym behandeling) en niet (aanvullen met water en een nacht staan) uitgevoerd. De proeven in fase 2 in duplo, met en zonder AOA toevoeging, zijn uitgevoerd volgens onderstaand schema:

procedure	fase 2	fase 3
A	AOA toevoeging op t ₀ , t ₂ en t ₄	uitgevoerd
B	AOA toevoeging op t ₀ , t ₂ en t ₄	niet uitgevoerd
C	geen AOA toevoeging	niet uitgevoerd

De AOA concentratie in fase 3 is voor alle monsters gelijk (overeenkomend met een gehalte in een monster van 250 µg/g d.s.). De recovery percentages, in duplo, ten opzichte van de referentie, en de pH's van de eindoplossingen waren als volgt:

procedure	recovery	pH van de eindoplossing
A	100.2/102.4	4.20
B	110.7/110.4	2.28
C	109.5/109.8	2.29

Uit de resultaten blijkt dat vrijkomend AOA in fase 2 stabiel is en met het aanwezige PL het oxim vormt bij pH 1.6 - 2.3.

De hoge recovery's (circa 110%) van de procedure's B en C worden veroorzaakt door een piekversmalling tengevolge van de pH van de te analyseren oplossing. De pH van de meetoplossing heeft dus invloed op het eindresultaat. Tot nu toe werd de referentie bereid in een bufferoplossing pH 4.6 terwijl de pH van de te meten monsteroplossing circa 4.2 was. Nagegaan diende te worden wat voor invloed de chemicaliën (pH) en tijd hadden op een referentie.

Hiertoe is een referentie op twee manieren bereid namelijk AOA met 25 mg PL in bufferoplossing pH 4.6 (A) en AOA met 25 mg PL met alle chemicaliën van de bepaling (B). De eind pH van oplossing B was 4.2. Na aanvullen van de maatkolven met de chemicaliën zijn de oplossingen direct in automaten vials gepipetteerd. Hierna is uit de vials tot 43 uur na bereiding geïnjecteerd op het HPLC systeem. Gekwantificeerd is

tot nu toe steeds via piekhoogte. In dit experiment werd daarnaast tevens het piekoppervlak gemeten. De derivatisering van beide referenties was compleet na circa 1.5 uur.

De gemiddelde resultaten met standaardafwijkingen (s) van de analyses na 1.5 tot 16 uur na de bereiding waren als volgt:

	aantal injectie's	gemiddelde piekhoogte	s	gemiddelde oppervlak	s
A	37	11.09	0.25	54131	623
B	38	11.70	0.22	54321	593

Tot 43 uur na bereiding werden geen afwijkingen geconstateerd ten opzichte van bovenstaande cijfers. De referentie is dus gedurende minimaal 43 uur constant.

Uit de resultaten blijkt dat de pH van de oplossingen geen invloed heeft indien AOA berekend wordt via het piekoppervlak. Bij berekening via piekhoogte wordt bij pH 4.2 (B) echter een 5.5% hoger gehalte gevonden dan bij pH 4.6 (A). De pH van de meetoplossing heeft dus invloed op het eindresultaat. De referentie dient dus in het vervolg altijd bereid te worden met alle chemicaliën van de bepaling. De tot nu toe gevonden recovery's van het theoretisch AOA gehalte voor monster met code 7 hiervoor gecorrigeerd zijn nu als volgt: 79.3% en 79.9% gedeeld door 1.055 is respectievelijk 75.2 en 75.7%

Tijdens het onderzoek is gebleken dat het AOA-PL oxim in de meetoplossing bij bewaring onder invloed van licht afgebroken wordt. Een referentie 1.5 uur bewaard in zonlicht nam circa 20% af terwijl bij bewaring gedurende 6 uur onder wit T1 licht een vermindering van circa 10% werd geconstateerd. Bij het gebruik van donker glaswerk en werken onder uitsluiting van zonlicht werd geen vermindering geconstateerd (zie 3.2.2). De invloed van licht heeft echter geen invloed op de resultaten en conclusies vermeld in dit rapport.

3.3 Monsters

Na optimaliseren zijn er ten opzichte van het voorlopige werkvoorschrift (hoofdstuk 3.2) enkele wijzigingen namelijk:

- het gebruik van 100 mg PL in plaats van 3 mg,

- een referentie met alle chemicaliën van de bepaling in plaats van alleen bufferoplossing pH 4.6,
- werken met donker glaswerk en onder uitsluiting van direct zonlicht.

Met deze wijzigingen is de methode (zie werkvoorschrift bijlage J) getoetst op met AOA behandelde bloemen die na behandeling in stelen, blad, bloemblaadjes en rest zijn verdeeld. Tevens zijn onbehandelde onderdelen geanalyseerd na toevoeging van AOA (recovery bepaling).

3.3.1 AOA gehalte in onderdelen behandelde bloemen

Onderzocht zijn de monsters, in duplo, met code 8, 9, 10 en 11. De resultaten en bijbehorende droge stof gewichten staan vermeld in tabel 6. De bijbehorende chromatogrammen zijn opgenomen in bijlage H.

Tabel 6. Droge stof gewichten in grammen, AOA gehalten in $\mu\text{g/g}$ d.s. in duplo en gemiddelde totaal gehalte AOA in μg per onderdeel van de monsters met code 8, 9, 10 en 11.

code	onderdeel	droge stof	AOA gehalte	μg totaal per onderdeel
9	stelen	5.76 g	2033/1971	11532
10	blad	1.53 g	843/885	1322
8	bloemblaadjes	6.33 g	57/55	354
11	rest	1.92 g	226/232	440
	totaal	15.54 g		13648

De recovery's van de interne standaarden waren 99.3 en 99.2%.

Het gehalte in de totale bloem berekend via AOA opname en de onderdelen is theoretisch 1200 $\mu\text{g/g}$ droge stof of te wel 18664 μg per 15.54 g droge stof. De recovery van de AOA opname is derhalve 13648 gedeeld door 18664 maal 100% is 73%. Bij eerder onderzoek werd voor monster met code 7 een recovery gevonden van 75.7 en 75.2%. De recovery via de onderdelen komt hiermee goed overeen. De oorzaak van 75% recovery is niet duidelijk. Twee mogelijke oorzaken zijn dat AOA met de methode niet volledig wordt geëxtraheerd of dat de anjer zelf AOA verbruikt.

Hierbij wordt aangenomen dat bij de uitgevoerde balansstudie het AOA door de bloem niet-selektief opgenomen wordt en tijdens de behandeling de concentratie in het bloemenwater niet verandert.

3.3.2 Onbehandelde onderdelen bloemen met toevoeging AOA

De onbehandelde onderdelen met de codes 12, 13, 14 en 15 zijn onderzocht met toevoeging van AOA (recovery bepalingen). Er is een hoeveelheid AOA toegevoegd die overeenkwam met de hoeveelheid gevonden in onderdelen van behandelde bloemen. De toevoegingen (μg per 0.2 g droge stof) aan de onderdelen en de resultaten staan vermeld in tabel 7. De bijbehorende chromatogrammen zijn opgenomen in bijlage I.

Tabel 7. AOA gehalten, met en zonder toevoegingen van AOA per 0.2 g monster, in $\mu\text{g}/0.2$ g d.s. en recovery percentages van de toevoegingen van de monsters met code 12, 13, 14 en 15.

code	onderdeel	toevoeging AOA	AOA gehalte		recovery
			zonder toevoeging	met toevoeging	
14	stelen	300	1.5/1.5	297.8/297.8	98.8/98.8
13	blad	100	8.2/7.6	100.9/105.0	93.0/97.1
12	bloemblaadjes	20	1.3/1.2	21.2/21.2	100,0/100,0
15	rest	20	0.8/0.8	20.6/20.9	99.0/100.5

Uit de resultaten blijkt dat de analytische recovery van aan het monster toegevoegde standaarden goed is.

De gehalten zonder toevoeging zijn niet afkomstig van AOA-P1 maar van het monstermateriaal als zodanig. Deze gehalten hebben echter nagenoeg geen invloed op het eindresultaat als een totaal behandelde bloem wordt onderzocht. Rekening houdende met de droge stof gewichten kan er namelijk ongeveer 9 μg "AOA" per gram droge stof gevonden indien totale bloem niet behandeld is.

4 CONCLUSIES

AOA kan door middel van PL omgezet worden in een O-gesubstitueerd oxim. De reactie blijkt pH-afhankelijk en heeft zijn optimum bij pH 4.6. Het AOA-PL derivaat kan met behulp van ion pairing reversed phase HPLC en fluorescentie detectie bepaald worden.

Volledige extractie van AOA uit de plantematrix wordt bemoeilijkt door de sterke binding van AOA aan deze matrix en de geringe stabiliteit van AOA bij hogere temperatuur. Aangezien de stabiliteit van het AOA-PL oxim aanzienlijk beter is, biedt dit mogelijkheden bij de extractie. Een stapsgewijze extractie bestaande uit een voorderivatisering met PL, een extractie met zwavelzuur en ureum bij 80°C, gevolgd door een enzymatische hydrolyse met Rohament PC, geeft goede resultaten. De concentratie van het toegevoegde PL blijkt een beperkende factor te zijn bij de extractie, waardoor een aanzienlijke overmaat noodzakelijk is.

De voor anjers ontwikkelde methode (zie bijlage J) geeft reproduceerbare resultaten, waarbij in de diverse plantedelen goede analytische recovery's (> 95%) behaald worden.

Balansproeven met AOA behandelde anjers laten zien dat van het uit de wateropname berekende AOA-gehalte 75% wordt teruggevonden. Onvolledige extractie van AOA uit de bloem is slechts een van de mogelijke verklaringen. Verder onderzoek is hiervoor noodzakelijk.

Voor eventuele toekomstige controle bij veilingen op het juiste gebruik van AOA lijkt het mogelijk de extractie procedure te vereenvoudigen. Dit dient nader onderzocht te worden.

LITERATUUR

RIKILT rapport 85.34. Ontwikkeling methode voor het bepalen van vitamine B₆ in levensmiddelen. R. Binnendijk.

Roy R.B. and Salpeter J. Evaluation of urea-acid system as a medium of extraction for B-group vitamins. Journal of food science, 1976, vol. 41, blz. 996-1000.

Woltering E.J., Harkema H., Maclaine Pont M.A. and Hollman P.C.H. *Acta horticulturae*, 1987, 216, blz. 273-280.

Monstermateriaal met bijbehorend AOA gehalte.

Tabel 1. Overzicht van de monsters met bijbehorende codes en hun theoretisch AOA gehalte in $\mu\text{g/g}$ gevriesdroogd monster, berekend via de opname uit de AOA oplossing, uitgaande van niet-selektieve opname.

code	monster	gehalte AOA
1	steel	(1)
2	bloemblaadjes	(1)
3	bloemblaadjes	(1)
4	steel, blad	(1)
5	volledige anjer zonder bloemblad	circa 600
6	bloemblaadjes, steel en blad onbehandelde anjer	-
7	volledige anjer	1200
8	bloemblaadjes	(2)
9	steel	(2)
10	blad	(2)
11	rest	(2)
12	bloemblaadjes onbehandelde anjer	-
13	blad onbehandelde anjer	-
14	steel onbehandelde anjer	-
15	rest onbehandelde anjer	-

(1) gehalte aan opgenomen AOA niet bekend.

(2) Deze onderdelen zijn afkomstig van dezelfde anjers. Het theoretisch gehalte van deze onderdelen tesamen is 1200 μg AOA per gram gevriesdroogde volledige anjer.

Invloed pH op reactie van AOA met PL.

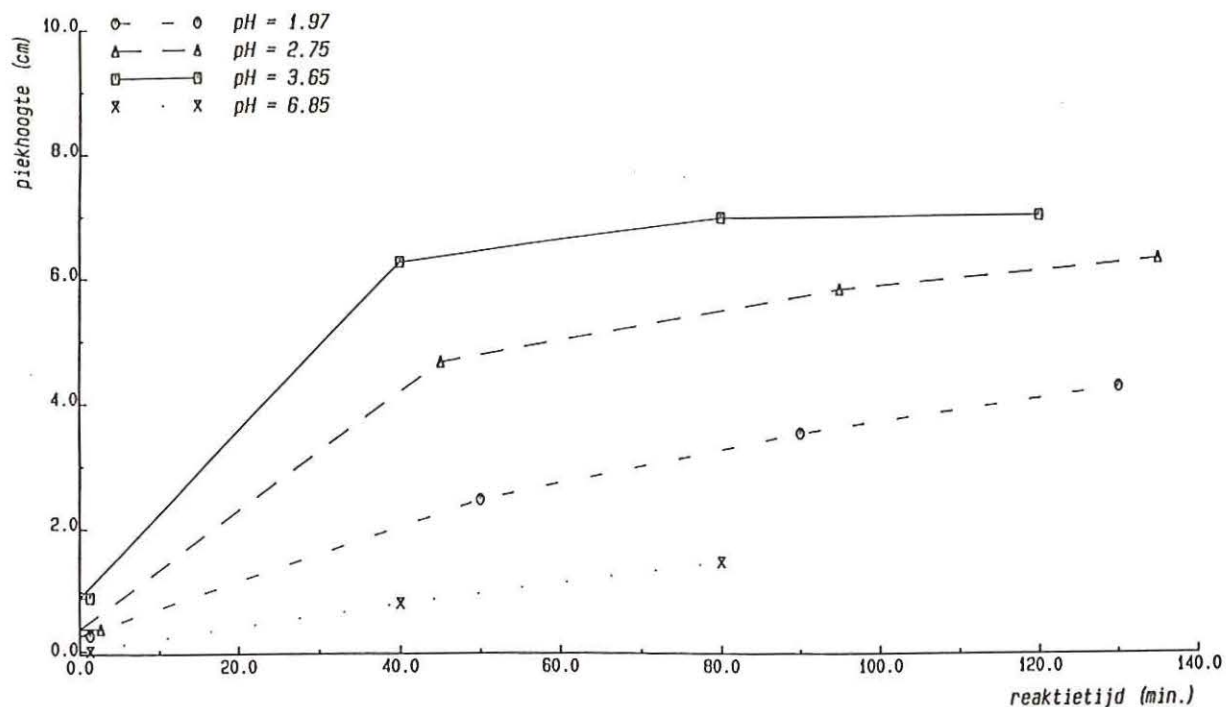


Fig. 1 De invloed van de pH op de reactie van AOA met PL

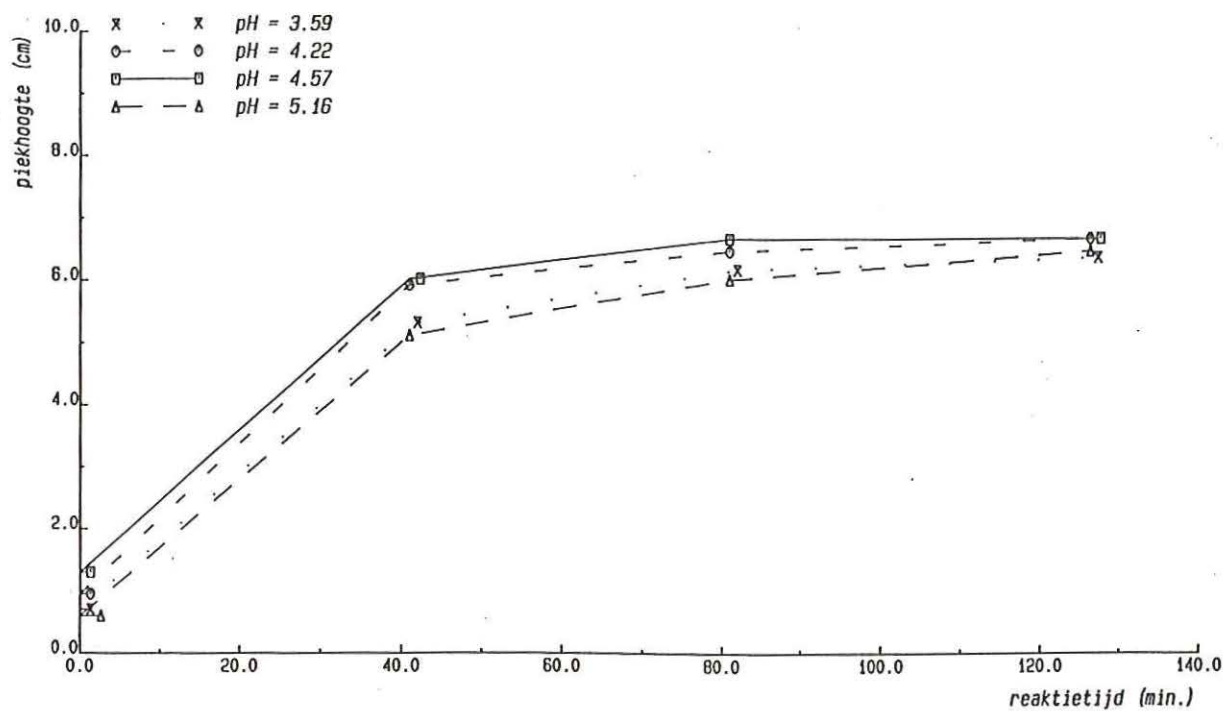
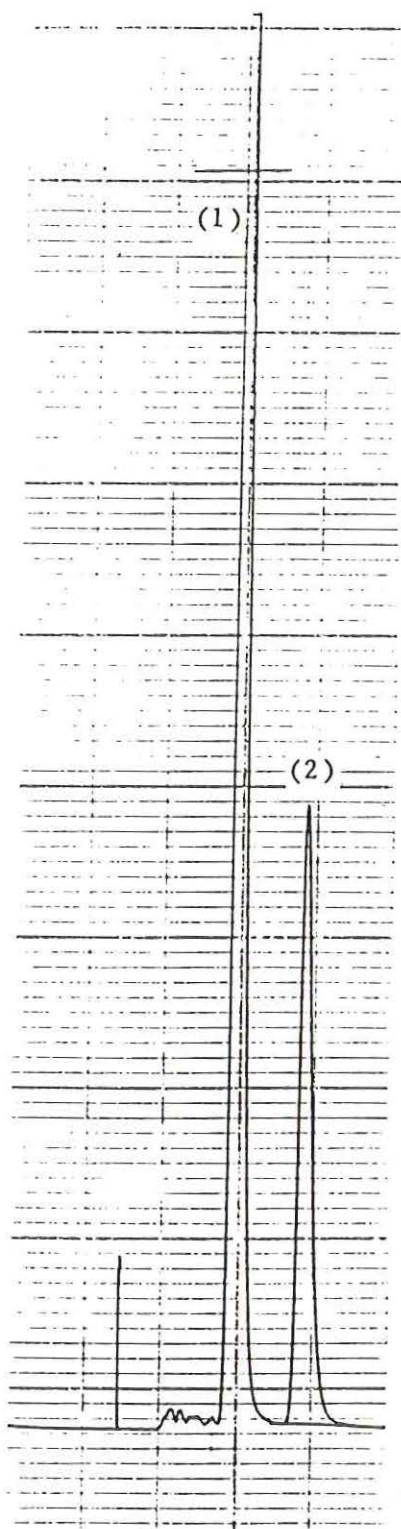
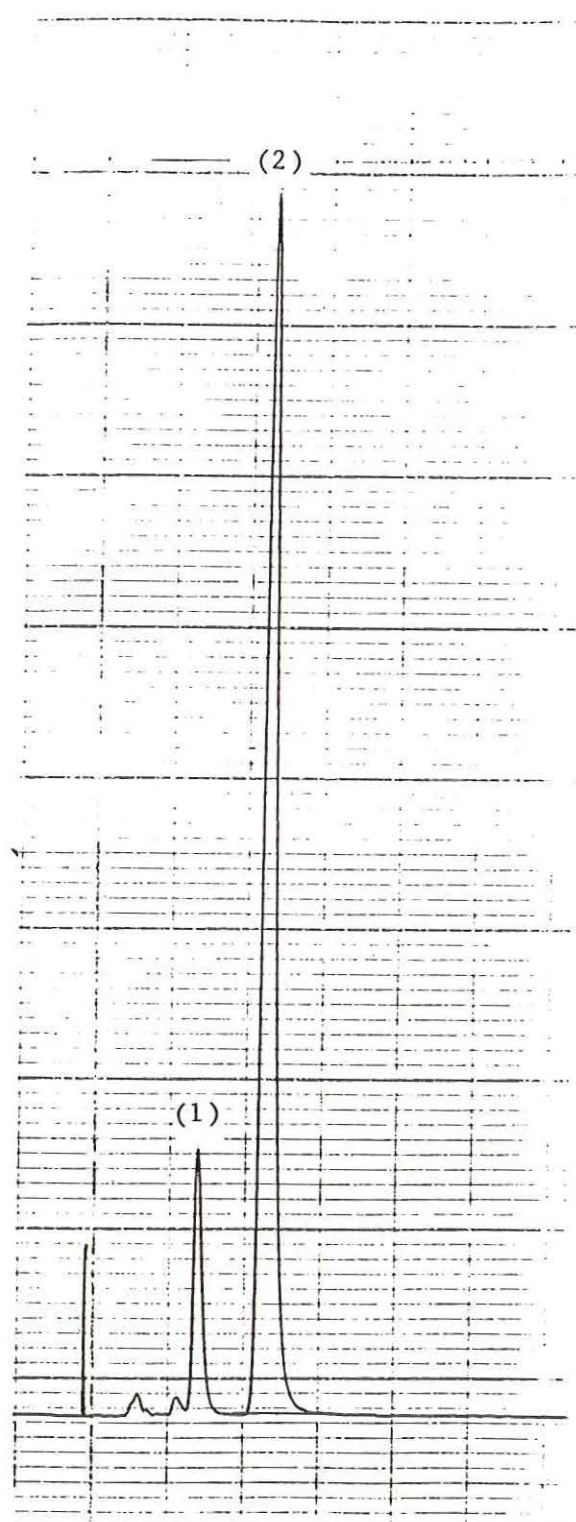


Fig. 2 De invloed van de pH op de reactie van AOA met PL

Chromatogrammen van standaarden.



Standaard 25 µg AOA.
Molverhouding PL/AOA
is 320.



Standaard 50 µg AOA.
Molverhouding PL/AOA
is 16.

(1) = PL

(2) = AOA-PL

Gehalte AOA en recovery toegevoegde standaard afhankelijk van PL hoeveelheid.

Tabel 2. De invloed, in duplo, van het gebruik van 10 (A) of 20 mg (B) PL op de gehalten aan AOA in $\mu\text{g/g}$ d.s. van de monsters met code 3,4,5 en 6, en recovery percentages van toegevoegde standaarden (26,25 $\mu\text{g}/0.2$ g monster d.s.).

code	monster	gehalte AOA	gemiddelde AOA	recovery standaarden	gemiddelde recovery
3	bloemblaadjes				
	A	25.9 / 24.8	25.4	92.8 / 92.8	92.8
	B	24.8 / 25.9	25.4	96.1 / 96.9	96.5
4	steel en blad				
	A	539 / 507	523	65.7 / 100.2	83.0
	B	539 / 563	551	101.8 / 87.1	94.5
5	volledige anjer				
	A	436 / 419	428	70.5 / 90.7	80.6
	B	476 / 467	472	97.4 / 97.4	97.4
6	bloem,steel,blad (onbehandeld)				
	A	- / -	-	89.0 / 89.0	89.0
	B	- / -	-	93.2 / 90.7	92.0

Bijlage E

Gehalte AOA afhankelijk van hoeveelheid PL in de verschillende fasen

Tabel 3. Gemiddelde gehalte (n=3) aan AOA in $\mu\text{g/g}$ d.s. van de monsters met code 4 en 5 verkregen met het gebruik van 20 en 40 mg PL volgens de procedures A, B en C (zie 3.2.1) en relatieve toename in procenten door het gebruik van 40 in plaats van 20 mg PL.

procedure	monster code	mg PL	gemiddeld	relatieve toename
A	4	20	209.1	
	4	40	241.8	15.6%
	5	20	129.7	
	5	40	147.7	13.9%
B	4	20	107.1	
	4	40	137.3	28.2%
	5	20	64.4	
	5	40	77.8	20.8%
C	4	20	57.1	
	4	40	70.1	22.8%
	5	20	49.0	
	5	40	57.0	16.3%

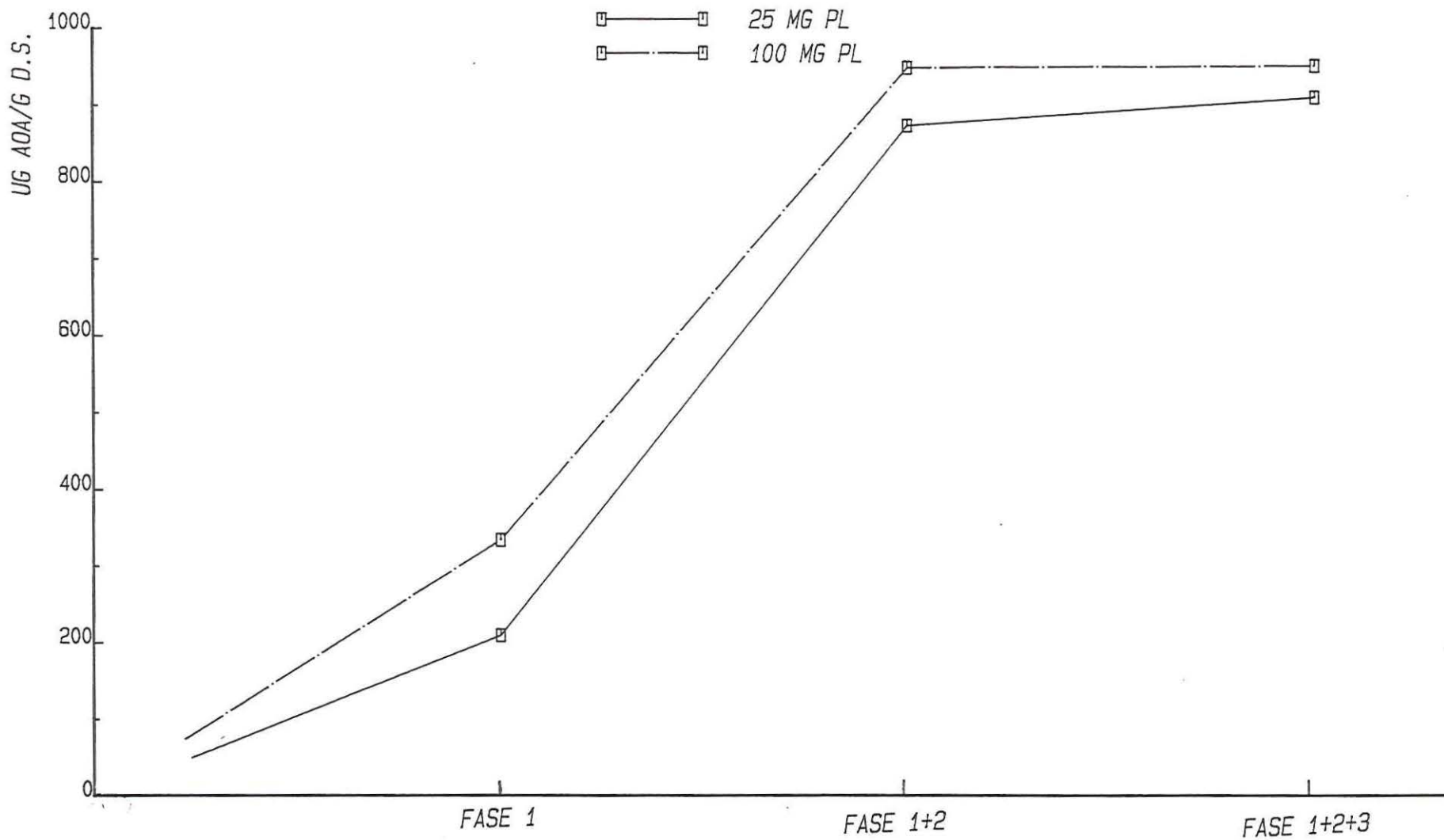
Invloed temperatuur en hoeveelheid PL tijdens voorderivatisering.

Tabel 4. Invloed temperatuur tijdens voorderivatisering en hoeveelheid PL op het AOA gehalte in $\mu\text{g/g}$ d.s., in duplo, van monster met code 7.

mg PL toegevoegd	kamertemp	45°C	60°C	80°C
25	899/878	877/887	873/868	735/741
100	961/956	966/960	958/963	799/783

Tabel 5. Invloed temperatuur tijdens voorderivatisering en hoeveelheid PL op het recovery percentage, in duplo, van standaarden.

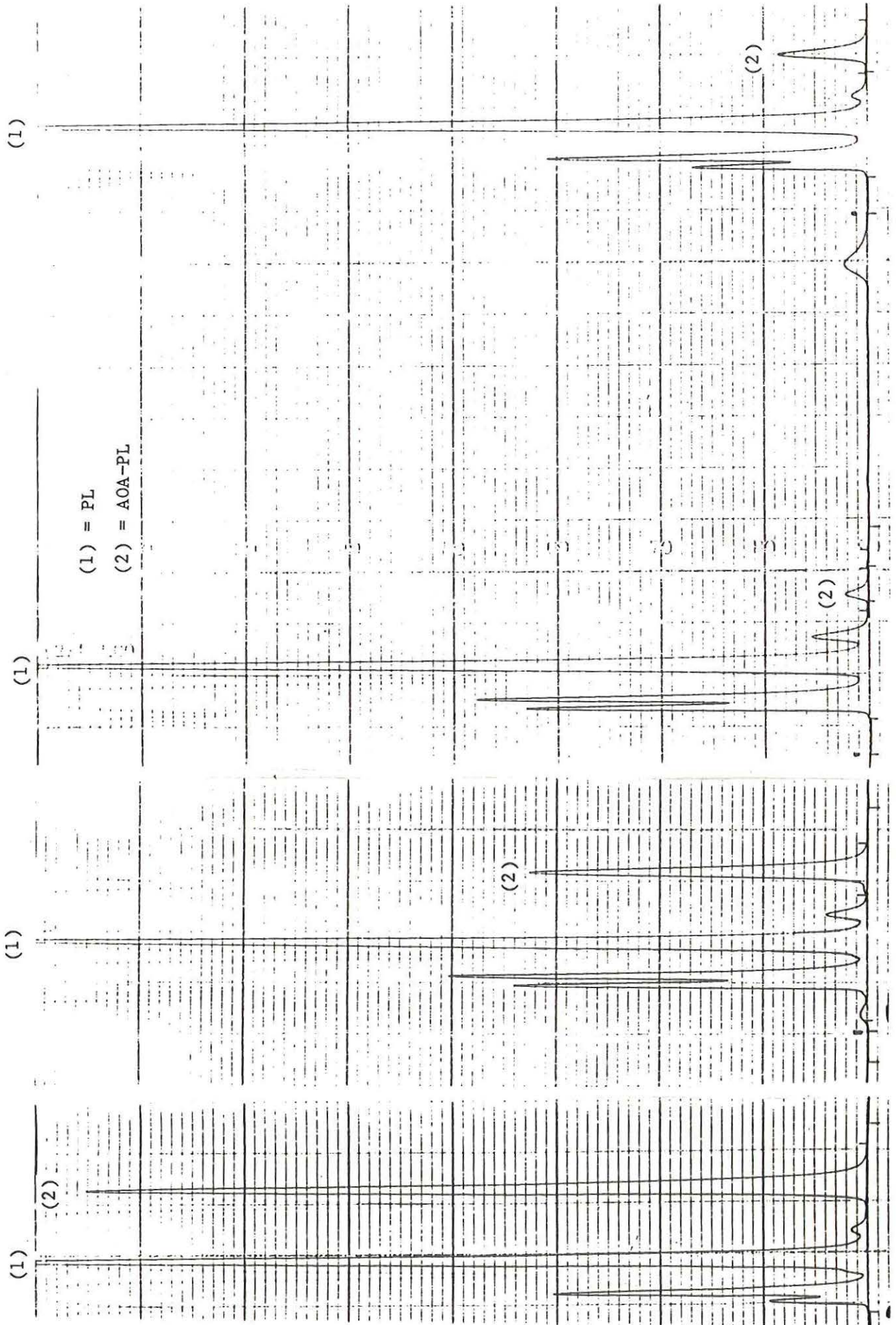
mg PL toegevoegd	kamertemp	45°C	60°C	80°C
25	98.9/99.3	101.0/100.2	- /100.6	87.8/88.2
100	99.3/99.8	99.8/99.0	100.6/100.2	85.7/86.1



GRAFIEK: RESULTAAT IN UG AOA/G D.S. VAN 25 OF 100 MG PL TOEVOEGING IN DE AFZONDERLIJKE FASE (N) .

De invloed van PL in de verschillende fasen.

Chromatogrammen van onderdelen van met AOA behandelde anjers.

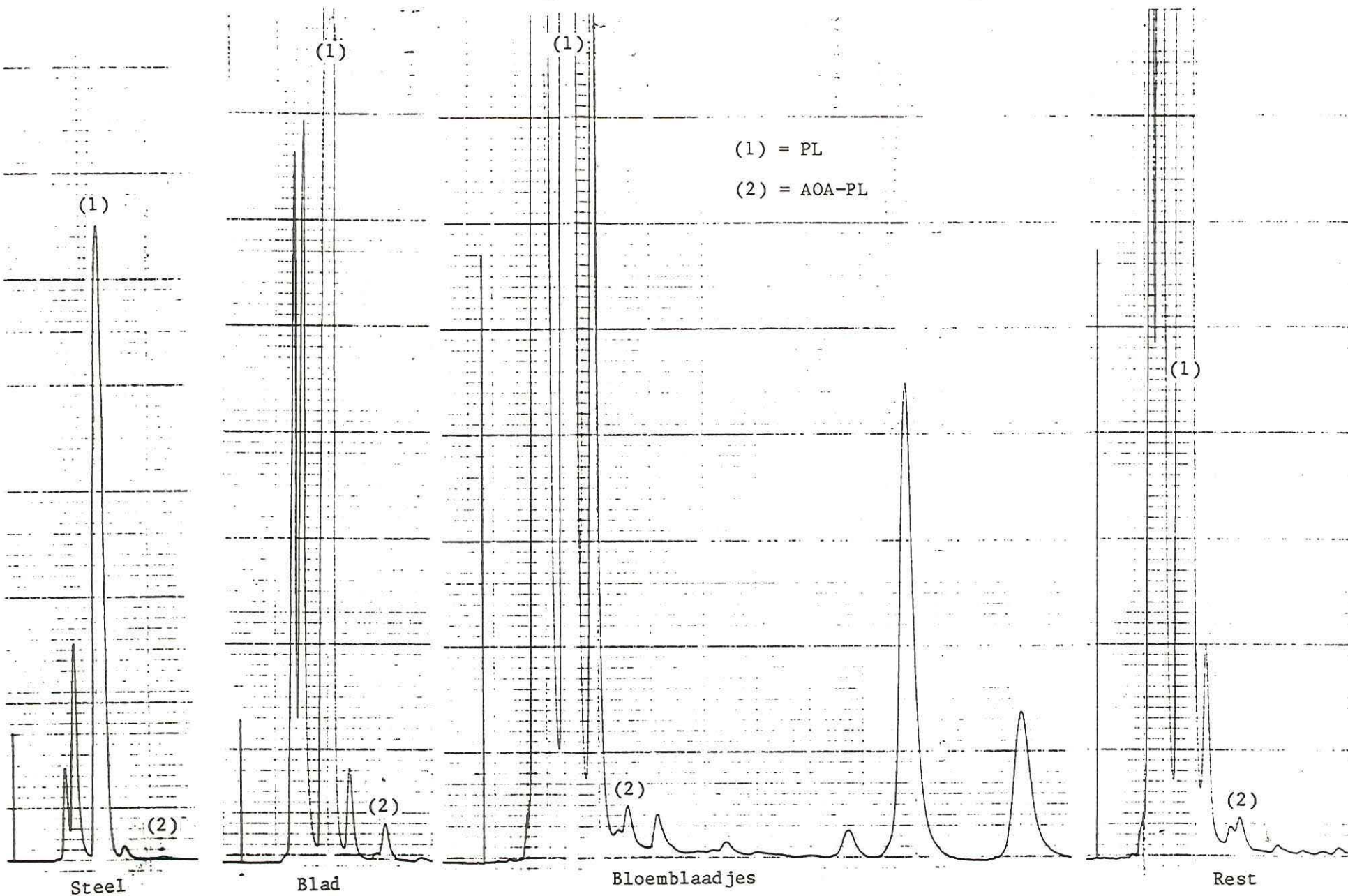


Rest

Bloemblaadjes

Blad

Steel



Opmerking: De detektorgevoeligheden waarmee de chromatogrammen zijn opgenomen zijn niet gelijk.

De verhoudingen van deze gevoeligheden zijn voor steel/blad/bloem/rest 1/2.5/15/15.

(behoort bij RIKILT rapport 89.20)

Werkvoorschrift

ANJERS: HPLC BEPALING VAN AMINO-OXYAZIJNZUUR (AOA)

1 Toepassingsgebied

De methode is toepasbaar voor gevriesdroogde anjers.

2 Definitie

Het gehalte aan AOA wordt met behulp van HPLC bepaald en uitgedrukt in $\mu\text{g/g}$ gevriesdroogd monster.

3 Beginsel

Na toevoeging van pyridoxalhydrochlorid (PL) en buffer wordt het monster gedurende 1 nacht bij kamertemperatuur geplaatst. Hierna wordt het monster na toevoeging van zwavelzuur en ureum gedurende 6 uur bij 80°C geplaatst. Na afkoelen wordt buffer en enzym toegevoegd en wordt het monster 1 nacht bij 45°C gezet. Na afkoelen en filtreren is de oplossing geschikt voor de HPLC analyse. De kwantificatie wordt uitgevoerd met behulp van een externe standaard.

4 Reagentia

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

4.1 Dinatriumfosfaat $2 \text{H}_2\text{O}$.

4.2 Citroenzuur.

4.2.1 Citroenzuuroplossing:

Los op in water 15.0 g citroenzuur en vul aan tot 100 ml.

4.3 Bufferoplossing pH 4.6.

Los op 22.3 g dinatriumfosfaat $2 \text{H}_2\text{O}$ (4.1) in 600 ml water en breng met citroenzuuroplossing (4.2) op pH 4.6. Vul aan met water tot 1 liter en meng.

4.4 Pyridoxalhydrochlorid (Merck 7523)

4.4.1 Pyridoxalhydrochlorid (PL) oplossing:

Maak een oplossing die 100 mg PL bevat per 2.00 ml water.

4.5 Amino-oxyazijnzuur (Sigma A-4508).

4.5.1 Amino-oxy-azijnzuur (AOA) oplossing:

Los op een hoeveelheid AOA zodanig dat 1.00 ml van deze oplossing overeenkomt met de verwachte concentratie aan AOA in het monster (0.2 g).

4.6 Ureum.

4.7 Zwavelzuur 0.2 M.

4.8 Rohament PC (enzym).

4.8.1 Enzymoplossing:

Maak een oplossing die 10 mg enzym bevat per 1.00 ml bufferoplossing.

4.9 Tetraethylammoniumchloride (Merck 822148).

4.10 Natriumzout van n-heptaansulfonzuur. H_2O (Serva 24604).

4.11 Kaliumdiwaterstoffosfaat (Merck 4873).

4.12 Fosforzuur (1+1)

4.13 Acetonitril

4.14 Eluens:

Los op 1.2428 g tetraethylammoniumchloride (4.9), 1.6515 g natriumzout van n-heptaansulfonzuur. H₂O (4.10) en 6.805 g kaliumdiwaterstoffosfaat (4.11) in circa 750 ml water. Breng op pH 2.6 met behulp van fosforzuur (4.12), voeg toe 95 ml acetonitril (4.13) en vul aan tot 1 liter met water en meng.

5 Toestellen en hulpmiddelen

Naast gebruikelijke laboratoriumapparatuur en hulpmiddelen:

5.1 HPLC geschikt voor hoge drukken en een flow van 1 ml/min.

5.2 Fluorescentie detector.

5.3 Maatkolven van 50 ml van gebruind glas met slijpstuk.

5.4 Donkere kamer met geel TL licht.

5.5 0.45 um filter, b.v. Acrodisc (Gelman).

6 Werkwijze

6.1 Monstervoorbewerking

Knip de anjer in stukken, maal, vriesdroog en maal over 0.5 mm.

6.2 Monsters

Weeg af 0.2 g monster, op drie decimalen nauwkeurig, in de maatkolf van 50 ml (5.3). Voeg toe 2.00 ml PL oplossing (4.4.1) en 3.00 ml bufferoplossing (4.3). Meng voorzichtig en laat gedurende 1 nacht staan in het donker bij kamertemperatuur. Voeg toe 0.40 g ureum (4.6) en 5.00 ml zwavelzuur 0.2 M (4.7). Sluit de maatkolf met een stop en plaats gedurende 6 uur in een stoof van 80°C. Zwenk gedurende deze tijd af en toe. Laat afkoelen en voeg achtereenvolgens circa 35 ml bufferoplossing (4.3) en 1.00 ml enzymoplossing (4.8) toe. Vul aan met bufferoplossing (4.3) en meng. Plaats de maatkolf gedurende 1 nacht in

een stoof van 45°C. Laat afkoelen, meng en filter over een filter van 0.45 µm (5.4). Het monster is nu geschikt voor de HPLC analyse.

6.3 Standaarden

6.3.1 Interne standaard

Ter controle van de bepaling wordt een interne standaard meegenomen. Pipetteer 1.00 ml van de AOA oplossing (4.5.1) in een maatkolf van 50 ml (5.3). Handel verder volgens het werkvoorschrift vanaf: voeg toe 2.00 ml PL enz.

6.3.2 Referentie

Met behulp van de referentie (externe standaard) wordt het gehalte aan AOA in de monsters berekend. De referentie wordt op de volgende manier bereid: Pipetteer 1.00 ml van de AOA oplossing (4.5) in een maatkolf van 50 ml (5.3) en voeg toe in de volgorde van het voorschrift alle chemicalien van de bepaling. Laat gedurende 1 nacht staan bij kamertemperatuur in het donker.

7 HPLC analyse

Omstandigheden:

- Kolom: 5 µm RP 18 , 12.5 cm lang met een interne diameter van 4 mm
(b.v. fertigsaule Lichrospher 100 RP-18 van Merck)
- Flow: 1.0 ml/min.
- Injektie: 10 µl.
- Detectie: Excitatiegolflengte 315 nm en emissiegolflengte 460 nm.

8 Berekening

Meet de piekhoogten van AOA-PL van zowel de referentie als het monster. Het gehalte aan AOA in µg/g droge stof wordt als volgt berekend:

$$\text{gehalte in } \mu\text{g/g d.s.} = \frac{A \quad X \quad C}{B \quad X \quad D}$$

waarin

A = piekhoogte AOA-PL van monster

B = piekhoogte AOA-PL van referentie

C = μg AOA per 1.00 ml AOA oplossing (4.5)

D = inweeg in g

De recovery van de interne standaard wordt op de volgende manier berekend:

$$\text{recovery percentage interne standaard} = \frac{A}{B} \times 100$$

waarin

A = piekhoogte AOA-PL van interne standaard

B = piekhoogte AOA-PL van referentie

9 Herhaalbaarheid

Deze dient nog nader te worden vastgesteld.

10 Opgave van de resultaten.

De resultaten worden weergegeven in $\mu\text{g/g}$ d.s. monster. De afronding van de resultaten zijn afhankelijk van de nog te bepalen herhaalbaarheid.

Opmerkingen:

- De recovery's van de interne standaarden dienen circa 98% tot 102% te bedragen.