

Project 505.0290

Normalisatie/harmonisatie bepaling additieven in levensmiddelen

Rapport 87.64

September 1987

CLEAN UP PROCEDURE (GPC) VOOR DE GC
BEPALING VAN DE ANTIOXIDANTEN BHA, BHT
EN TBHQ IN BOTERVET

J. Slangen

Afdeling : Additieven/Micronutriënten

Medewerkers: W. Traag, H. van der Kamp

Goedgekeurd door: ir P. Hollman

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

8764

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
sectorhoofden
W. Traag
H. v.d. Kamp
Sledsens
bibliotheek
circulatie
projectbeheer

EXTERN:

Agralin, Pudoc
directie DLO-Algemeen

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

ABSTRACT

CLEAN UP PROCEDURE (GPC) VOOR DE GC BEPALING VAN DE ANTIOXIDANTEN
BHA, BHT en TBHQ IN BOTERVET

CLEAN UP PROCEDURE (GPC) FOR THE GC DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANTS
BHA, BHT AND TBHQ IN BUTTERFAT (in Dutch)

Report 87.64 September 1987

J. Slangen

State Institute of Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

1 table, 7 figures, 3 references

A Gel Permeation Chromatographic (GPC) clean up procedure prior to the GC determination of the antioxidants BHA, BHT and TBHQ in butterfat was studied. The procedure proves to be sufficient in removing the fat components; no interferences were observed on the capillary GC column. However, recovery experiments with spiked butterfat show losses of antioxidants up to 35%, due to incomplete separation between antioxidants and fat components on the GPC column.

Keywords: antioxidants, BHA, BHT, TBHQ, butterfat, GC, GPC clean up

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	I
SAMENVATTING	III
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL EN METHODE	2
2.1 GPC-systeem	2
2.2 GC-systeem	2
2.3 Standaarden	2
2.4 Extractie en cleanup	3
2.5 Bereiding monsters met een bekend gehalte aan BHA, BHT en TBHQ	3
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	3
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	4
LITERATUUR	6
BIJLAGEN	

SAMENVATTING

Voor het opstellen van een normvoorschrift voor de bepaling van de antioxydanten BHA, BHT en TBHQ in botervet worden door werkgroep E43 van de "International Dairy Federation" methoden geëvalueerd. Uitgangspunt voor deze norm is de gaschromatografische bepaling beschreven in ISO 6463-1982. De wens bestaat echter om gebruik te maken van capillaire gaschromatografie, dit in afwijking van ISO 6463. Uit een eerder uitgevoerd oriënterend onderzoek bleek dat interferenties van het vet op de capillaire kolom de bepaling van de antioxydanten storen.

In het hier beschreven onderzoek wordt de toepasbaarheid van gelpermeatiechromatografie (GPC) voor de cleanup van de monsterextracten bekeken. Aangezien de hoeveelheid vet die per injectie op de GPC-kolom gebracht kan worden beperkt is, en bij de elutie van de antioxydanten een verdunning optreedt is de hoeveelheid antioxydant die uiteindelijk op de GC-kolom geïnjecteerd kan worden kleiner dan de detektiegrens. Uit dit onderzoek blijkt dat splitless injectie op de capillaire kolom betrouwbare resultaten levert, en aldus het probleem van de detektiegrens opgelost wordt.

De scheiding tussen antioxydanten en de vetmatrix op de GPC-kolom blijkt niet volledig te zijn. Dit geeft aanleiding tot verliezen van antioxydanten bij de analyse van monsters botervet.

Recovery-experimenten met monsters botervet en ghee waaraan 50, 100, 200 en 300 mg/kg van elk der antioxydanten BHA, BHT en TBHQ is toegevoegd, geven een verlies van maximaal 35% (zie tabel 1). Uit herhaalde injectie van monsterextracten van botervet op de GC-kolom, nadat de GPC-cleanup is toegepast, blijkt dat geen interferenties meer optreden. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de GPC-cleanup van de monsterextracten voldoende is.

Aanbevolen wordt het GPC-systeem te optimaliseren.

1 INLEIDING

In Group E43-Selected food additives, van de Internationale Dairy Federation (IDF) wordt gewerkt aan het opstellen van een standaardmethode voor de bepaling van antioxydanten (BHA, BHT, TBHQ) in botervet. Als uitgangspunt voor deze standaard werd destijds gekozen voor de internationale standaard ISO 6463-1982: Animal and vegetable fats and oils - Determination of BHA and BHT - Gas-liquid chromatographic method.

Toepassing van ISO 6463 bij botervet, waarbij in plaats van de voorgeschreven gepakte kolom een capillaire kolom werd gebruikt, gaf echter problemen tengevolge van interferentie van het vet op de capillaire kolom. Zo bleek dat de piekvorm van TBHQ na een aantal injecties verslechterde, bovendien was de recovery van BHA te hoog. Terugkeer naar gebruik van een gepakte kolom werd niet acceptabel geacht door Group E43. Daarom werd besloten diverse clean-up procedures ter verwijdering van het vet voorafgaande aan de gaschromatografische analyse, te bestuderen.

In het hier beschreven onderzoek wordt de toepasbaarheid van gelpermeatiechromatografie (GPC) voor de verwijdering van het vet onderzocht. Het bestudeerde GPC-systeem wordt al geruime tijd routinematig toegepast bij de bepaling van PCB's in diverse produkten. Aangezien dit GPC-systeem een maximale capaciteit van 100 mg vet per injectie heeft en voor de elutie van de antioxydanten van de GPC-kolom ongeveer 10 ml oplosmiddel nodig is, ontstaat er een detektiegrens probleem. Indampen van het GPC-eluaat geeft niet de gewenste oplossing, aangezien uit de literatuur (1,2,3) blijkt dat met verliezen rekening gehouden moet worden. Daarom werd gekozen voor splitless injectie op de capillaire kolom. In dit onderzoek wordt tevens nagegaan of splitless injectie mogelijk is.

2 MATERIAAL EN METHODE

2.1 GPC-systeem

Het GPC-systeem bestaat uit:

- injectieautomaat (WISP, 710B-Waters), injectievolume 1000 μ l
- pomp (M-45 Waters) flow 1,0 ml/min
- eluens ethylacetaat-cyclohexaan 1:1 (v/v)
- kolom Bio-Beads S-X3 (Biorad) lengte 450 mm, ID 10 μ m, T=40°C
- UV-detector (LC3UV, Pye Unicam) golflengte = 280 nm 1,20 Aufs
- recorder (BD-40, Kipp en Zonen)
- fractieverzamelaar (Ultrarac II 2070, LKB)

2.2 GC-systeem

Het GC-systeem bestaat uit:

- apparaat: Varian 3700
- kolom: fused silica CP Sil 5GB 12,5 m x 0,22 mm ID
filmdikte 0,12 μ m
- injectie: splitless T=150°C, volume = 1 μ l
- temperatuurprogramma: 60 tot 115°C met 10°C/min.
- detector: FID T=250°C
- druk: 0,8 atm. He
- intergratiesysteem: SP-4000 (Spectra Physics)
- recorder: BD-41 (Kipp en Zonen)

2.3 Standaarden

Bij de GC wordt tetradecaan gebruikt als interne standaard (IS). Weeg af ca. 200 mg tetradecaan, los op in ethylacetaat, vul aan tot 50 ml en meng. Pipeteer hieruit 1 ml in een kolf van 1000 ml, vul aan en meng (concentratie IS ca. 4 μ g/ml).

Weeg van BHA, BHT en TBHQ 250,0 mg af in een maatkolf van 50 ml, los op in ethylacetaat, vul aan en meng (=stock oplossing). Pipeteer hieruit 0, 250, 500, 1000 en 1500 μ l in een maatkolf van 25 ml, vul aan en meng. Pipeteer hieruit 1 ml in een kolf van 10 ml, vul aan en meng. Pipeteer tenslotte hieruit 1 ml in een maatkolf van 10 ml, voeg toe 1,00 ml interne standaard, vul aan en meng (concentratie= 0, 0,5, 1, 2, 3 μ g/ml + 0,4 μ g/ml IS elk).

Maak deze oplossingen dagelijks vers.

IJklijn:

Injecteer elke standaardoplossing in het GC-systeem en bepaal de verhouding (ratio) van de piekoppervlakte van het betreffende antioxydant ten opzichte van het piekoppervlak van de interne standaard. Zet grafisch de berekende verhoudingen uit tegen de concentraties (zie figuur 1).

2.4 Extractie en clean up

Weeg 1,000 g gesmolten botervet of ghee af in een maatkolf van 10 ml, los op in ethylacetaat, vul aan en meng. Injecteer hiervan 1000 µl in het GPC-systeem en start het opvangen van de antioxydanten fractie op een vast tijdstip (17' 20"). Voeg hieraan 1,00 ml interne standaard toe vul aan tot 10 ml en meng. Injecteer hieruit 1 µl in het GC-systeem en bepaal de verhouding van de piekoppervlakte ten opzichte van de piekoppervlakte van de interne standaard. Lees uit de standaardlijn de bijbehorende waarde van de concentratie af en bereken hieruit het gehalte in het monster rekening houdend met de verdunning en de inweeg.

2.5 Bereiding monsters met een bekend gehalte aan BHA, BHT en TBHQ

Weeg vijf maal 25,00 gram gesmolten botervet of ghee af in een erlenmeyer van 100 ml met ingeslepen stop. Voeg respectievelijk toe 0,250, 500, 1000 en 1500 µl van de standaardstockoplossing (zie boven) sluit goed af en zwenk voorzichtig goed om. Het monster bevat nu respectievelijk 0,50, 100, 200 en 300 mg/kg van elk antioxydant.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

In figuur 1 zijn de ijklijnen weergegeven van de afzonderlijke antioxydanten met de bijbehorende correlatiecoëfficiënten, die groter dan 0,996 zijn. Splitless injectie van de antioxydanten op dit systeem blijkt dus te voldoen.

De scheiding tussen antioxydanten en de botervet-matrix wordt weergegeven in de GPC-chromatogrammen 1 t/m 3. Een volledige scheiding tussen antioxydanten en de componenten uit het botervet wordt niet bereikt. Als echter begonnen wordt met het verzamelen van de antioxydanten na 17 min. 20 sec., blijkt echter dat nagenoeg geen vetmatrix

interferenties meer optreden op de capillaire kolom. Dit wordt weergegeven in GC-chrom. 1 t/m 3, waarbij GC-chrom. 3 opgenomen is nadat diverse injecties van botervetextracten (met GPC-cleanup) op de kolom hadden plaatsgevonden. Het valt op dat in tegenstelling tot vroegere experimenten zonder cleanup, de piekvorm van TBHQ nu wel onveranderd blijft, nadat diverse extracten op de kolom geïnjecteerd zijn.

In tabel 1 staan de resultaten vermeld van de recovery-experimenten. De recovery in mg/kg en in procenten van de afzonderlijke antioxydanten is weergegeven voor de verschillende additieniveaus aan botervet en ghee en van een standaardmengsel. Er is geen correctie van het volume van de additie uitgevoerd. De overall gemiddelde recovery voor BHA, BHT en TBHQ op de verschillende niveaus in botervet en ghee bedraagt respectievelijk 80, 78 en 69%. Het verlies aan antioxydanten kan waarschijnlijk verklaard worden uit het feit dat bij de GPC de vetfractie niet basislijn gescheiden is van de antioxydanten fractie. Daarbij is gekozen voor een dusdanig uitvang tijdstip voor de antioxydanten fractie dat het aldus verkregen eluaat zo weinig mogelijk vet bevat dat de GC-kolom kan vervuilen (zie GPC-chromatogram 1 t/m 3). De recovery van de pure standaardmix tendeert naar lagere waarden ten opzichte van de monsters met additie (tabel 1). Een mogelijke verklaring is dat de retentie van de antioxydantenfractie op de GPC-kolom beïnvloed wordt door de aanwezigheid van het vet. Het opvangen van de antioxydantenfractie is gedurende alle experimenten steeds gestart op dezelfde tijd (17',20"), zodat variabele verliezen mogelijk zijn. Uit de GC-chromatogrammen blijkt dat bij de monsters een storend piekje verschijnt voor de interne standaard. De eventuele invloed hiervan op de recovery kan verkleind worden óf door de concentratie van de interne standaard te verhogen óf door een andere interne standaard te kiezen.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

GPC biedt perspectieven als clean-up procedure bij de bepaling van BHA, BHT en TBHQ in botervet en ghee met behulp van capillaire GC. De hierbij noodzakelijke splitless injectie op de capillaire kolom geeft betrouwbare resultaten. Bij de onderzochte GPC-kolom treden verliezen aan antioxydanten op veroorzaakt door een onvolledige scheiding tussen antioxydanten en de vetmatrix componenten.

Het verdient aanbeveling het GPC-systeem verder te onderzoeken, waarbij de volgende punten aandacht behoeven. De hier gerapporteerde verliezen aan antioxidanten tengevolge van de onvolledige scheiding op de GPC-kolom zouden ondervangen kunnen worden door introductie van een geschikte interne standaard, die hetzelfde retentiegedrag vertoont als de antioxidanten op de GPC-kolom. Een tweede mogelijkheid is te zoeken naar een GPC-systeem waarmee wel een volledige scheiding tussen antioxidanten en vetmatrix mogelijk is.

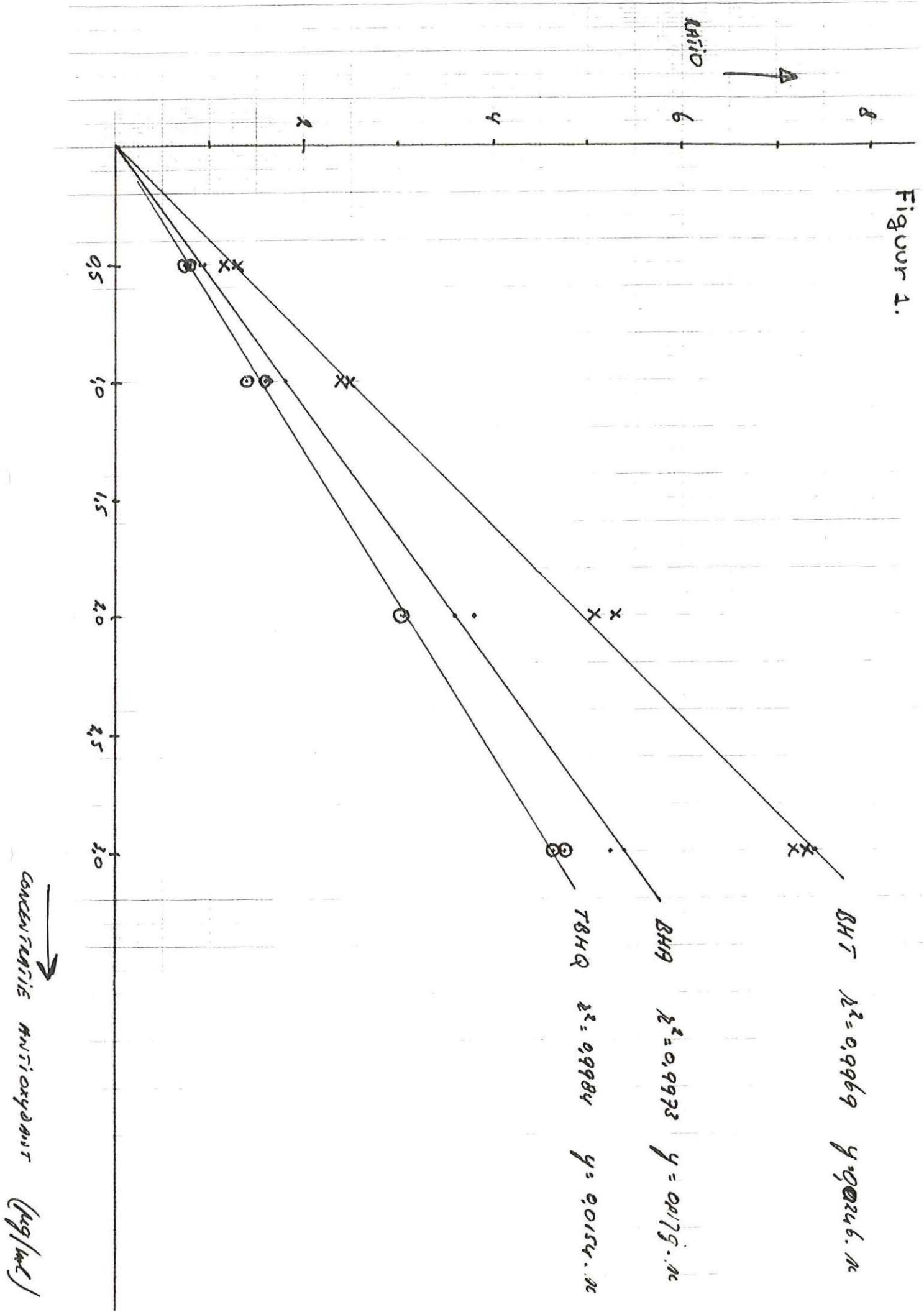
LITERATUUR

1. Stijve, T., Disereus, J.M. Deutsche Lebensmittel - Rundschau 79 (4) (1983), 108.
2. Page, B.D., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66 (3) (1983), 727.
3. Van Peteghem, C.H., Dekeyser, D.A., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64 (6) (1981), 1331.

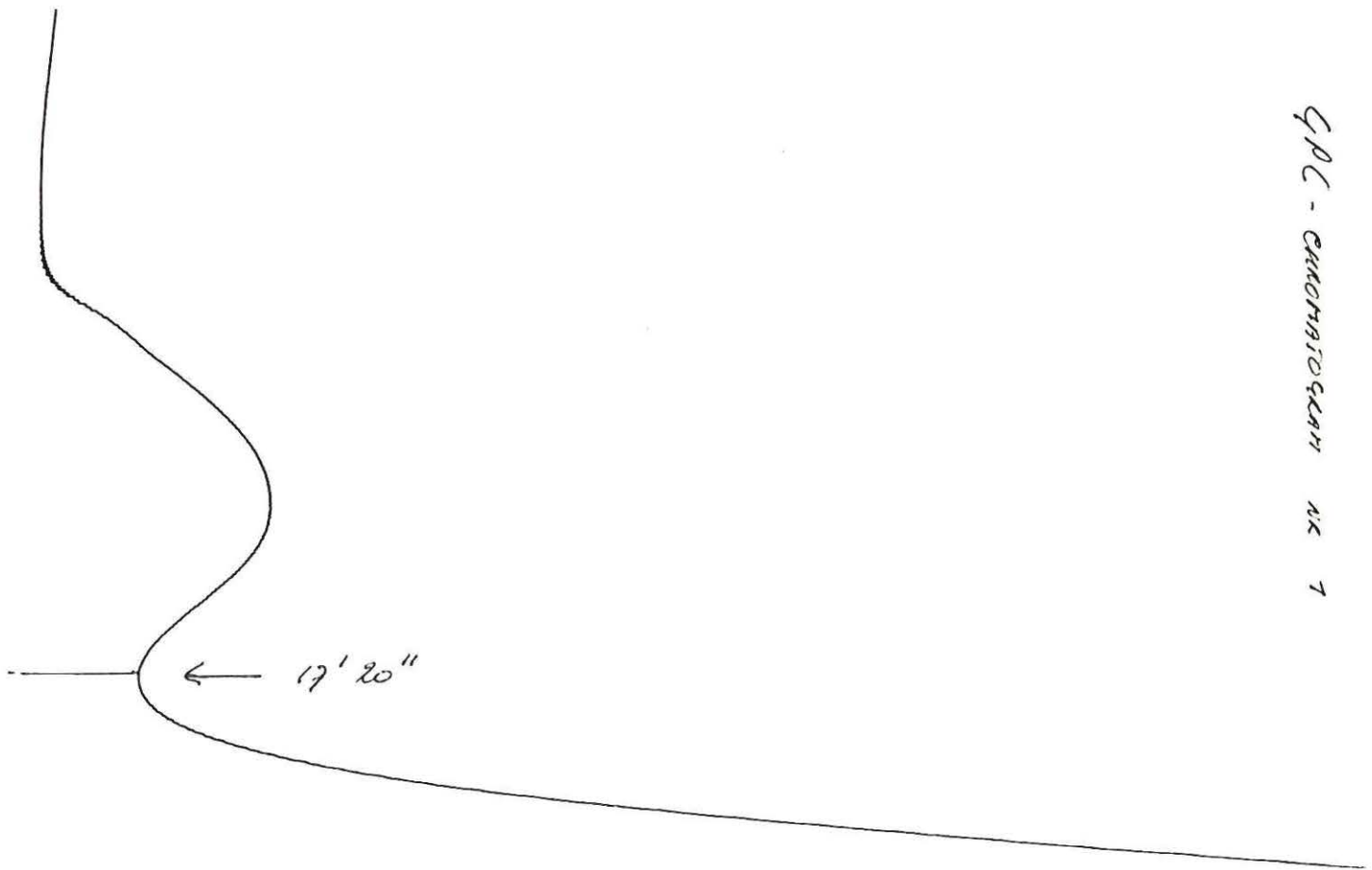
Tabel 1: Recoveryexperimenten

	Recovery BHA		Recovery BHT		Recovery TBHQ	
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
Standaard 200 mg/kg	146	73	142	71	122	61
Botervet + 300 mg/kg	251	84	253	84	229	76
+ 200 mg/kg	142	71	142	71	127	64
+ 100 mg/kg	77	77	75	75	65	65
+ 50 mg/kg	40	79	39	78	32	65
Ghee + 300 mg/kg	248	82	244	81	221	74
+ 200 mg/kg	166	83	159	79	145	72
+ 100 mg/kg	82	82	79	79	69	69
+ 50 mg/kg	42	84	39	78	35	69

Figure 1.



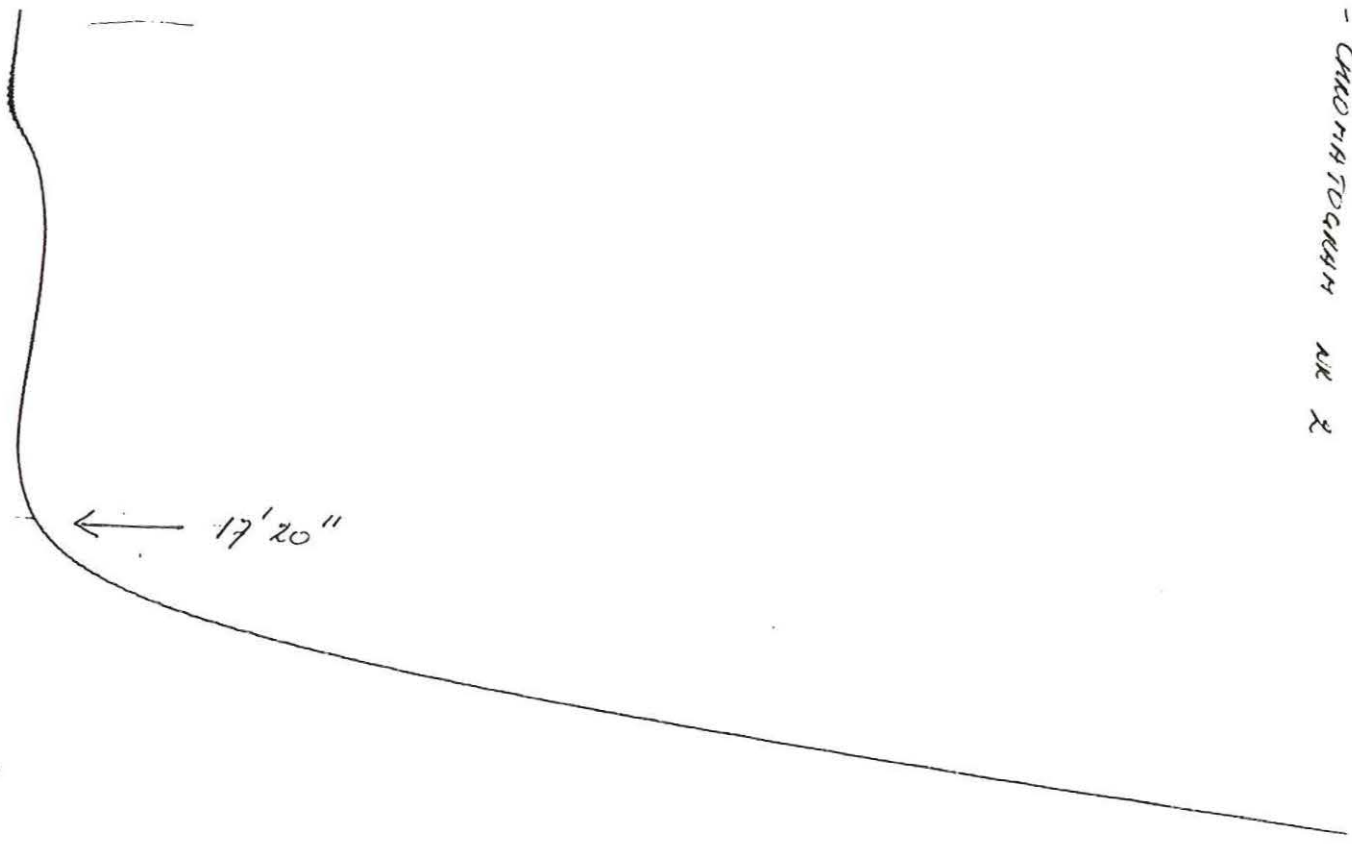
GPC - chromatogram nr 7



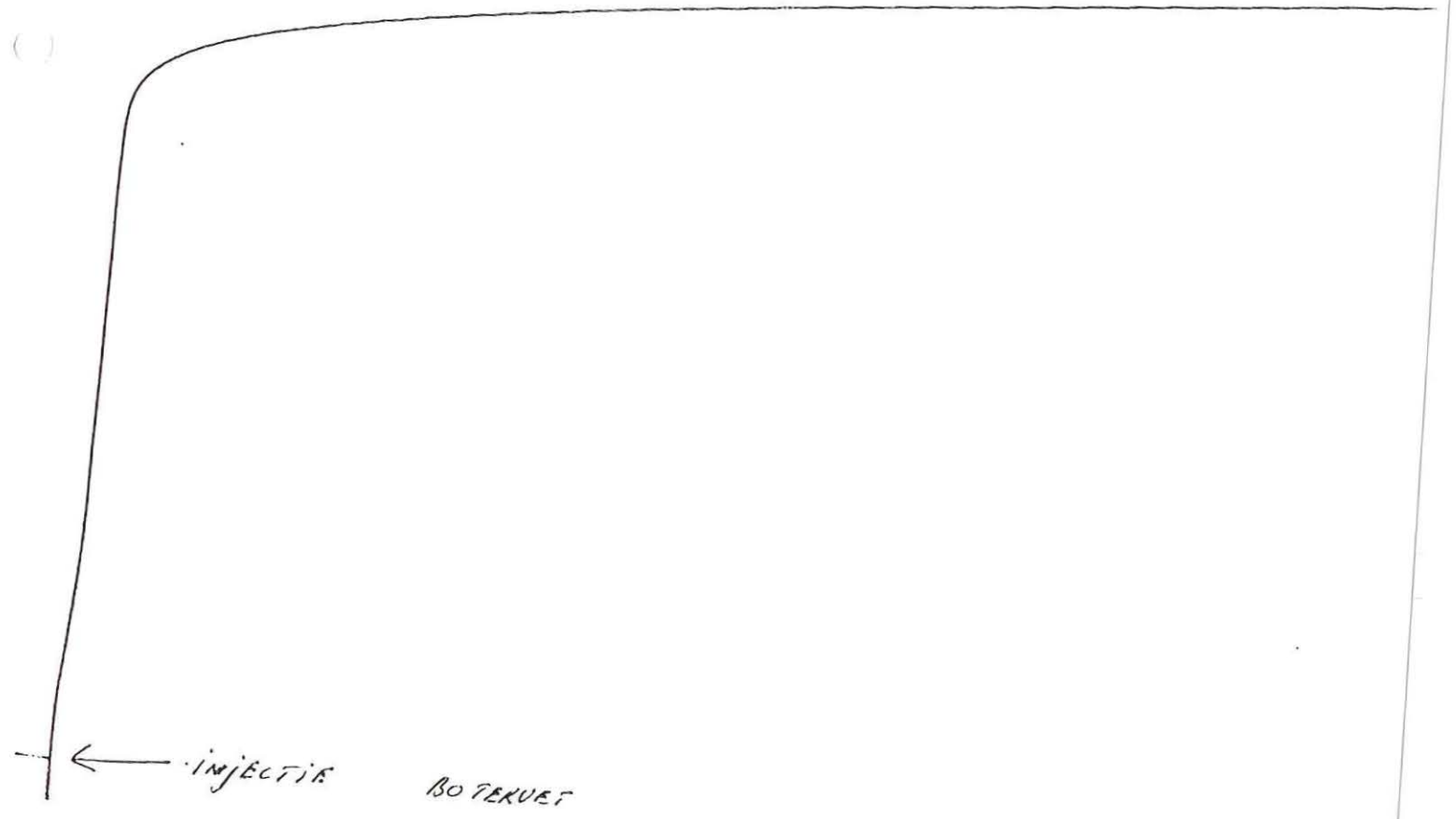
← 17' 20"

← INJECTIE BOTERVET + 200 PPM STANDAARDMIX

4PL - CMOHHTOBAH AK X

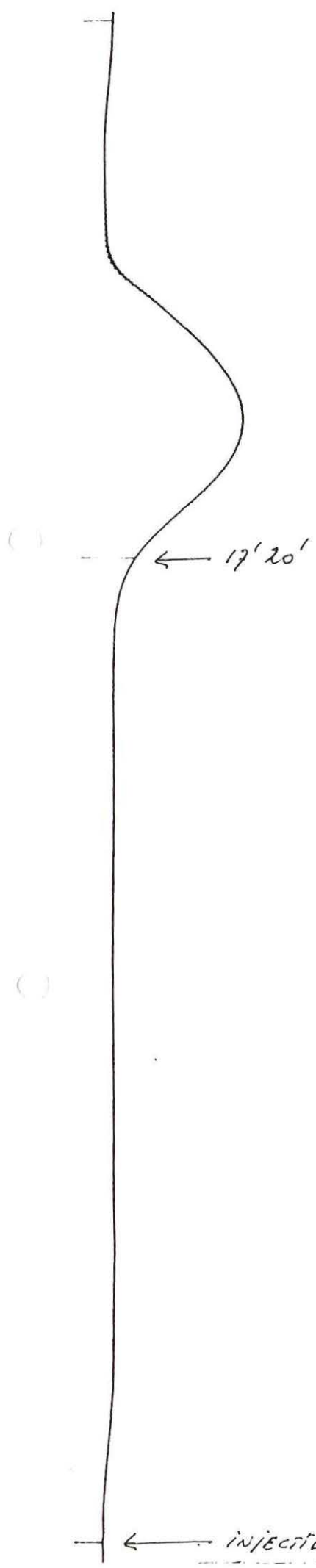


17' 20"



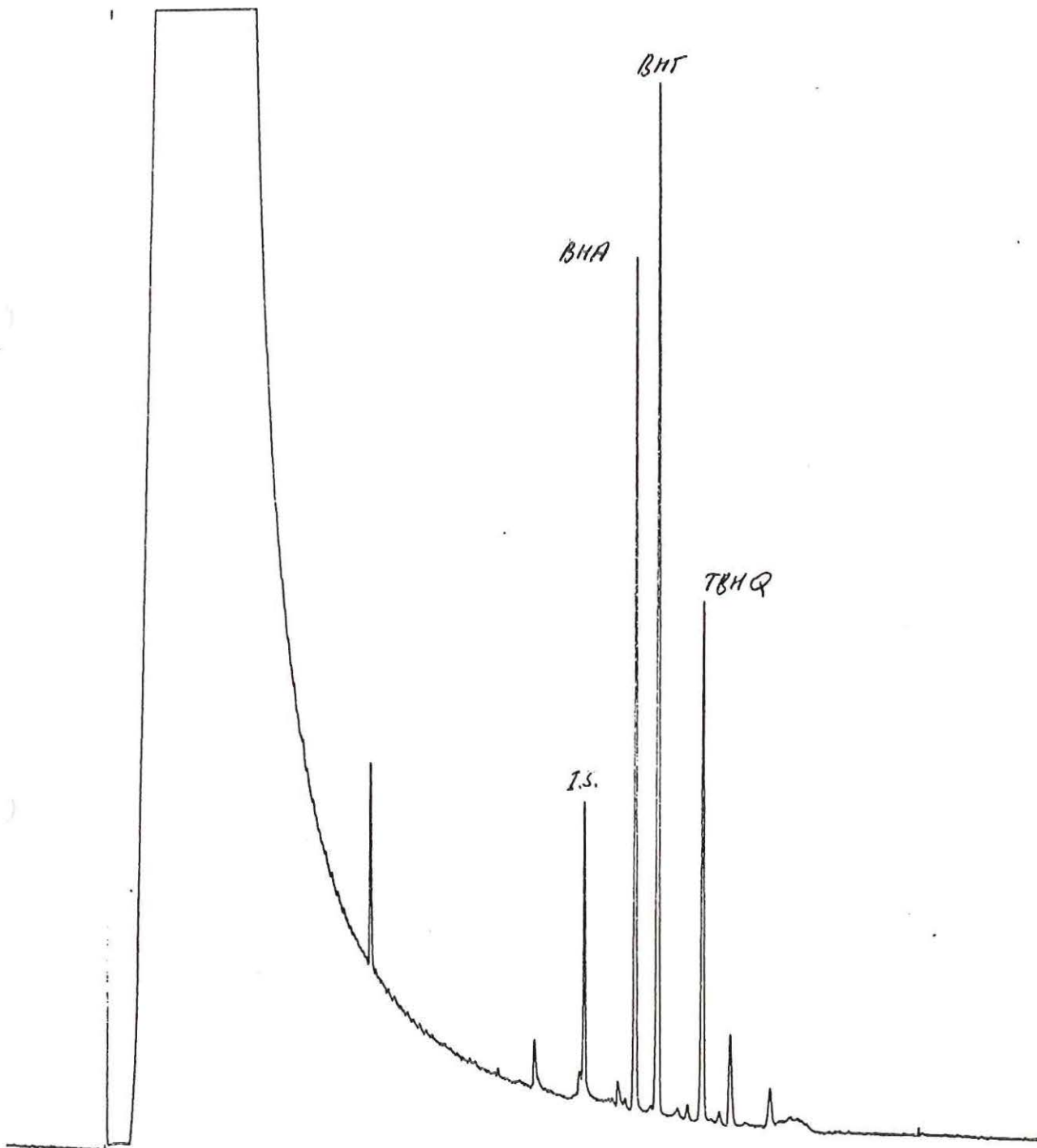
INJECTIE BO PERUET

СРС - СТАНДАРДНАН № 3

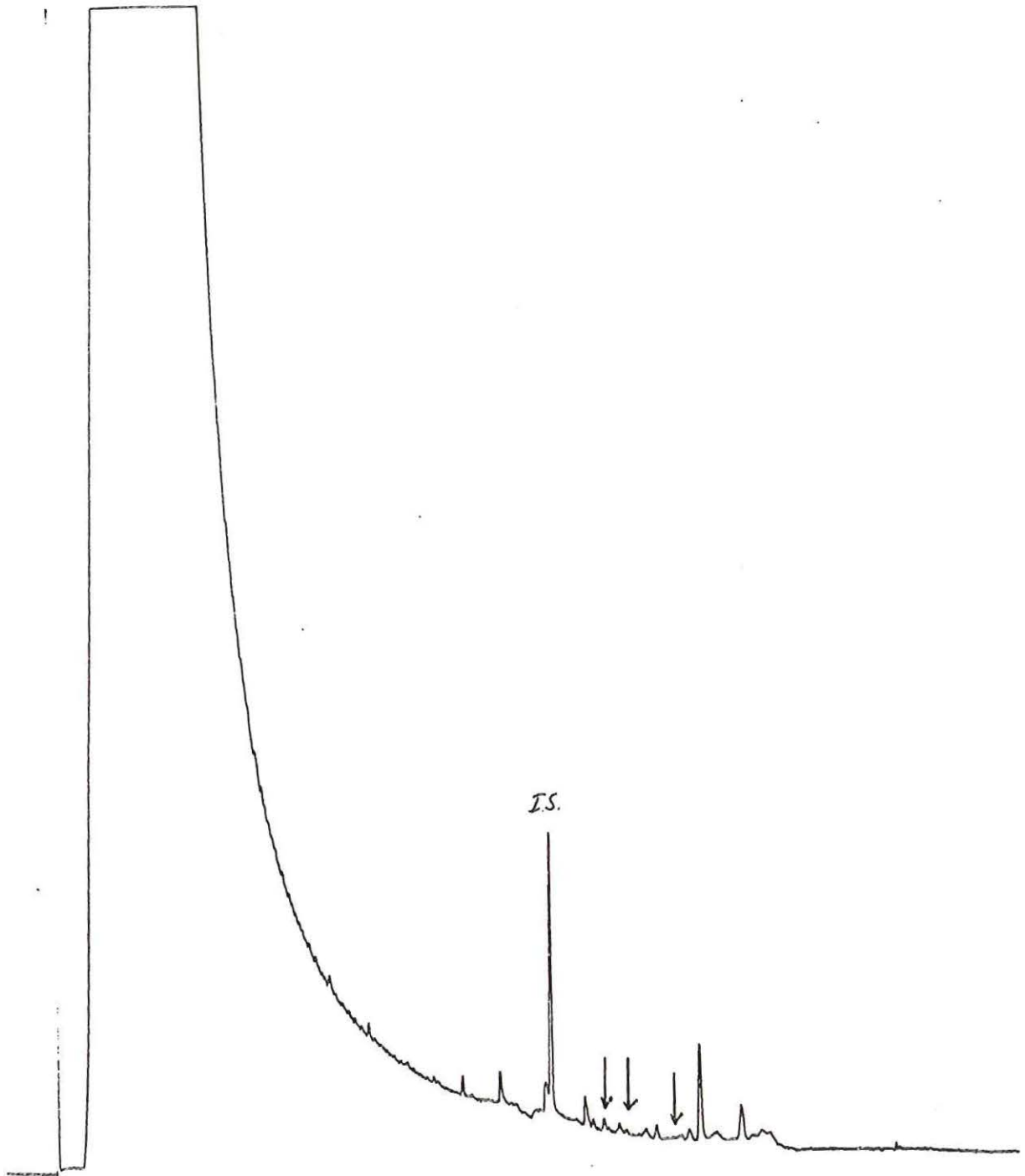


INJECTIE 200 PPM STAN DAAKDMIX

GC-chrom. 1
Butterfat + 200 mg/kg Stand.
after GPC clean up



GC-chrom. 2
Butterfat without antiox.
after GPC clean up



GC-Chrom. 3
200 µg/kg Stand.

after clean up (GPC)

