

Afdeling Algemene Chemie 1986-11-19
RAPPORT 86.105 Pr.nr. 505.6000

Onderwerp: Verbetering van een analyse-
methode voor de bepaling van
 β -apo-8-caroteenzure ethyl-
ester in boter en botervet.

Verzendlijst: directeur, sectorhoofd (2x), directie VKA, directie VZ,
directie DLO, projectbeheer, ZCI Leusden, BKCS Friesland,
afd. Algemene Chemie (3x), mevrouw Werdmuller, bibliotheek,
RZS Melle, Office Nationale du Lait et ses derives
Gembloux.

RAPPORT 86.105

Pr.nr. 505.6000

Projekt: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor melk- en zuivelprodukten.

Onderwerp: Verbetering van een analysemethode voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in boter en botervet.

Doel:

Verbetering van de analysemethode voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in boter en botervet.

Samenvatting:

Voor het bepalen van β -apo-8-caroteenzure ethylester, gebruikt als tracer in boterconcentraat, is een aantal methoden in gebruik, waaronder de uit 1980 daterende RIKILT-methode G48. Deze methoden, waarvan het principe globaal hetzelfde is, maar de praktische uitvoering verschillend, voldoen niet geheel. De recovery ligt laag en de reproduceerbaarheid laat te wensen over.

Getracht is door aanpassing de bestaande RIKILT-methode geschikter te maken voor onderzoek op genoemde tracer.

Conclusie:

De recovery van de aangepaste methode is op ca. 99% gekomen. De reproduceerbaarheid is beter geworden en ligt gemiddeld op ca. 8%. Opge-merkt moet worden dat dit resultaat afkomstig is van een ringonderzoek tussen drie laboratoria, die de bepalingen van de tracer regelmatig uitvoeren.

Verantwoordelijk: drs N.G. van der Veen

Samenstellers : J.F. Labriijn, drs N.G. van der Veen

Medewerkers : J.G. Schouten, mevrouw G.A. Werdmuller

Projectleider : drs N.G. van der Veen

1. Inleiding

Boterconcentraat, vervaardigd uit boter die, overeenkomstig de bepalingen van verordening (EEG) no 262/79-laatstelijk gewijzigd met verordening (EEG) no. 2288/84 en 2927/84, getraceerd moet worden met een organoleptische tracer en een chemische tracer, wordt gebruikt bij het vervaardigen van banketbakkerswerk, consumptieijs en andere voedingsmiddelen. Een van de organoleptische tracers is β -apo-8-caroteenzure ethylester. Het gehalte aan deze tracer in boterconcentraat moet 20 mg/kg zijn.

Er is geen officiële voorgeschreven onderzoekmethode voor deze tracer voorhanden.

De Fransen en Duitsers gebruiken ieder hun eigen voorschrift (bijlage 1 resp. 2). De werkwijze in het Duitse voorschrift, dat overigens erg summier is, is grotendeels vergelijkbaar met de werkwijze in het Franse voorschrift.

In Nederland wordt gebruik gemaakt van een intern RIKILT voorschrift G48 (bijlage 3). Dit voorschrift voldeed niet geheel, met name ten aanzien van de recovery en de reproduceerbaarheid. Dit waren punten waarop de methode verbeterd moest worden.

Daarnaast is de Franse methode met de Nederlandse methode vergeleken. De Franse methode gebruikt basisch aluminiumoxide bij de isolatie van de tracer uit het boterconcentraat door middel van kolom chromatografie.

Bij de Nederlandse methode wordt zuur aluminiumoxide gebruikt (1). De caroteenachtigen en het vet worden bij de Franse methode van de tracer gescheiden met een mengsel van petroleumether en diethylether, bij de Nederlandse methode wordt iso-octaan als elutiemiddel gebruikt. Vervolgens wordt de tracer, die zich nog boven in de kolom bevindt, bij de Franse methode met een mengsel van petroleumether/diethylether/chloroform geëluëerd en na afdampen van het mengsel opgelost in cyclohexaan. Vervolgens wordt de extinctie bij 448 a 450 nm gemeten. Bij de Nederlandse methode wordt chloroform gebruikt om de β -apo-8-caroteenzure ethylester te elueren, gevolgd door een directe meting van de extinctie bij 450 nm.

2. Ringonderzoek met methode G48 en de Franse methode

Door een 3-tal laboratoria zijn twee ringonderzoeken uitgevoerd aan een 6-tal monsters. Aan 4 van deze monsters werden bekende hoeveelheden β -apo-8-caroteenzure ethylester toegevoegd. De overige 2 monsters dienden als blanco. De resultaten van dit ringonderzoek zijn weergegeven in tabel 1 en 2.

De Franse methode, die bewerkelijker is dan RIKILT-methode G48, geeft geen betere resultaten. De RIKILT-methode is ongeveer 3 keer sneller dan de Franse methode. De blanco's van de RIKILT methode zijn gemiddeld hoger dan die van de Franse methode, maar wel beter reproduceerbaar. De recovery van beide methoden laat te wensen over.

De RIKILT-methode geeft een gemiddelde recovery van 91.6%. De gemiddelde relatieve herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de RIKILT-methode ligt op 5.6% resp. 16%. Voor de Franse methode zijn deze resultaten slechter.

3. Aanpassing methode G48

Bij gebruik van verschillende aluminiumoxides bleek dat met basisch aluminiumoxide de blanco lager, echter de recovery ook lager was dan bij gebruik van zuur aluminiumoxide (zie tabel 3). Het in methode G48 voorgeschreven gebruik van zuur aluminiumoxide verdient dus de voorkeur.

Daar het scheidingsproces op absorptiechromatografie berust dient het aluminiumoxide geactiveerd worden door het te drogen. Dit voorkomt extra piekverbreding en daarbij verlies aan tracer bij het uitvangen van de kolom.

Dit wetend is vervolgens bij methode G48 een schaalverkleining toegepast. De tot nu toe gebruikte kolom van ca 25 cm lengte en 2 cm doorsnede werd vervangen door een kolom van ca 50 cm lengte en 1 cm doorsnede. Verkleining van de kolomdiameter kan de schotelhoogte beïnvloeden. Bij een te kleine diameter gaan randeffekten een rol spelen en bij een te grote diameter kan de kolompakking onregelmatiger worden. Deze effecten leveren een ongewenste extra piekverbreding op. De keuze van de kleinere doorsnede van 1 cm zal, hoewel niet onderzocht, geen extra piekverbreding door genoemde effecten opleveren. De langere kolom heeft een gunstige invloed op de resolutie.

Met deze nieuwe kolom zijn vervolgens van 14 monsters niet-getraceerd botervet de blancowaarden bepaald.

De gemiddelde blancowaarde is iets lager geworden en ligt op 1.93 mg/kg (tabel 4). Daarentegen is de spreiding in de blancowaarden iets toegenomen.

Vervolgens is de recovery bepaald door aan 13 monsters botervet bekende hoeveelheden β -apo-8-caroteenzure ethylester toe te voegen en te analyseren op deze tracer. Gemiddeld bedroeg de recovery 97,6% (tabel 5) en is daarmee beter dan de eerder door het RIKILT gevonden recovery van ca 90% (tabel 1, lab III). Wordt de recovery per monsters uitgerekend, dan varieert deze van 88,1 tot 102,5% bij de aangepaste methode. Bij de oorspronkelijke methode G48 varieert deze van 86 tot 93%. In dit laatste geval zijn slechts 4 monsters geanalyseerd.

Uit bovenstaande blijkt dat verkleining van de diameter naar 1 cm in combinatie met een grotere kolomlengte een gunstige invloed heeft op de recovery van de methode.

De tijdsduur van analyse is voor beide methoden vergelijkbaar met elkaar.

4. Ringonderzoek met aangepaste RIKILT-methode en Franse methode

Aan het ringonderzoek met de aangepaste RIKILT-methode namen 5 laboratoria deel, aan dat met de Franse methode 4 laboratoria. De resultaten zijn weergegeven in tabel 6,7 en 8. In tabel 6 en 7 zijn de duplo analyseresultaten en de recoveries van elk laboratorium gegeven. De recoveries zijn gecorrigeerd voor de bijdrage van de blanco's.

Tabel 8 geeft een samenvatting van de tabellen 6 en 7 in de vorm van gemiddelde gehalten, recoveries en analysespreidingen.

Met de RIKILT-methode wordt een gemiddelde recovery gevonden van 98,6%, met de Franse methode bedraagt deze slechts 89,7%. De spreiding in recovery tussen de laboratoria is bij de Franse methode groter dan bij de RIKILT-methode (tabel 6 en 7).

De herhaalbaarheid is van de RIKILT-methode beter dan die van de Franse methode (0,85 resp 1,22 mg/kg), de reproduceerbaarheid is van de RIKILT-methode iets beter dan die van de Franse methode (3,83 resp. 4,63 mg/kg).

Herhaling ringonderzoek met aangepaste RIKILT-methode

Aan dit laatste ringonderzoek namen 3 laboratoria deel. De resultaten zijn weergegeven in tabel 9 en 10. Er wordt, na correctie voor de blanco bijdrage, een gemiddelde recovery van 98,8% gevonden.

Laboratorium 3 vindt gemiddeld een recovery van 96,8%, hetgeen wat aan de lage kant is.

De herhaalbaarheid ligt gemiddeld op ca 3% (0,56 mg/kg). De reproduceerbaarheid ligt gemiddeld op ca 8%. Hierbij moet opgemerkt worden dat slechts 3 laboratoria aan het ringonderzoek deelnamen. Worden de resultaten voor de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid vergeleken met die van het vorige ringonderzoek waaraan 5 laboratoria deelnamen (tabel 8), dan ligt de herhaalbaarheid nu iets beter en de reproduceerbaarheid beduidend beter. De recovery is in beide gevallen nagenoeg hetzelfde.

Worden de resultaten vergeleken met die van tabel 1, waarbij dezelfde laboratoria aan het onderzoek deelnamen, dan is de recovery en de reproduceerbaarheid beduidend beter geworden.

Door de toegepaste schaalverkleining bij de kolomchromatografie is het chemicaliënverbruik minstens gehalveerd.

6. Conclusie

De recovery van de aangepaste RIKILT-methode is op ca 99% gekomen. De reproduceerbaarheid is beter geworden en ligt gemiddeld op ca 8%. Op gemerkt moet worden dat dit resultaat afkomstig is van een ringonderzoek tussen drie laboratoria, die de bepalingen van de tracer regelmatig uitvoeren.

Literatuur

1. W.G. de Ruij en J.J. van Oostrom. Het bepalen van het gehalte aan ethylester van β -apo-8-caroteenzuur in botervet. RIKILT-verslag 80 G4, 1980.

Tabel 1: Analyseresultaten voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in botervet, verkregen met RIKILT methode G48 bij een ringonderzoek met 3 laboratoria.

Monster nummer	Toegevoegd (mg/kg)	Lab I mg/kg	gem. mg/kg	Lab II mg/kg	gem. mg/kg	Lab III mg/kg	gem. mg/kg
I	0 (blanco)	2,60- 2,60	2,60	2,0- 2,2	2,1	2,15- 2,13	2,14
II	20	22,32-22,58	22,40	19,7-20,4	20,1	20,67-21,23	20,95
III	18	19,60-20,51	20,06	17,9-17,9	17,9	18,44-18,79	18,61
IV	22	23,62-24,01	23,82	21,7-22,1	21,9	21,55-21,75	21,65
V	0	2,46- 2,34	2,40	2,4- 2,4	2,4	2,43- 2,49	2,46
VI	20	20,90-21,68	21,29	19,8-19,9	19,8	19,89-19,21	19,55
gem. (II+III+IV+VI)	20,0		21,89		19,90		20,19
blanco (I+V)	0		2,50		2,25		2,30
verschil	$\frac{0}{20,0}$		$\frac{2,50}{19,39}$		$\frac{2,25}{17,65}$		$\frac{2,30}{17,89}$
recovery%			97,0		88,2		89,4

Tabel 2: Analyseresultaten voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in botervet, verkregen met de Franse methode bij een ringonderzoek met 3 laboratoria.

Monster nummer	Toegevoegd (mg/kg)	Lab I mg/kg	gem. mg/kg	Lab II mg/kg	gem. mg/kg	Lab III mg/kg	gem. mg/kg
I	0 (blanco)	0,60- 0,60	0,60	0,5- 0,9	0,7	1,82- 1,76	1,79
II	20	16,40-16,55	16,48	18,6-19,2	18,9	21,54-21,55	21,54
III	18	16,40-16,18	16,29	16,2-16,3	16,2	19,66-19,40	19,53
IV	22	17,38-17,08	17,23	20,2-21,7	21,0	20,86-22,14	21,50
V	0	0,52- 0,52	0,52	0,9- 1,1	1,0	1,69- 1,63	1,66
VI	20	18,35-18,65	18,50	19,1-19,1	19,1	20,05-19,53	19,79
gem. (II+III+IV+VI)	20,0		17,12		18,80		20,59
blanco (I+V)	0		0,56		0,85		1,72
verschil	$\frac{0}{20,0}$		$\frac{0,56}{16,56}$		$\frac{0,85}{17,95}$		$\frac{1,72}{18,87}$
recovery%			82,8		89,8		94,4

Tabel 3: Vergelijking van de recovery-waarden tussen basisch en zuur aluminiumoxide.

Toegevoegd	Basisch Al-oxide	recovery %	Zuur Al-oxide	recovery %
20	20,0	93,5	21,59	96,4
0	1,3		2,32	
17	17,4	94,7	19,21	99,9
23	23,8	97,8	25,00	98,6

Tabel 4: Bepaling van de blanco-waarden voor β -apo-8-caroteenzure ethylester in niet getraceerd botervet met methode G48 en de aangepaste methode.

monster nr.	methode G48 gehalte in mg/kg	aangepaste methode gehalte in mg/kg
1	2,15	1,67
2	2,13	1,96
3	2,43	1,72
4	2,49	2,13
5	2,00	2,55
6	2,20	1,75
7	2,40	2,31
8	2,40	1,77
9	2,60	1,33
10	2,60	2,58
11	2,46	1,69
12	2,34	2,46
13		1,90
14		1,19
gemiddelde blanco	2,35	1,93

Tabel 5: Bepaling van de recovery voor β -apo-8-caroteenzure ethylester in getraceerd botervet.

Monster nr.	Toegevoegd	Gevonden waarde
1	20	22,30
2	17	19,36
3	23	25,44
4	18	18,61
5	22	21,65
6	20	19,55
7	20	22,25
8	20	21,88
9	16	16,75
10	23	24,62
11	16	18,00
12	23	24,65
13	19	20,85
gemid.	19,77	21,22
Gemiddelde recovery = $\frac{21,22-1,93}{19,77} \times 100\% = 97,6\%$		

Tabel 6: Analyseresultaten voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in botervet, verkregen met de aangepaste RIKILT-methode bij een ringonderzoek met 5 laboratoria.

Monster nummer	Toevoeging	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5
1	20 mg/kg	22,15-22,46	21,1-21,7	23,0-23,7	19,80-20,51	20,6-20,9
2	0 mg/kg	1,24- 1,14	2,2- 2,4	2,1- 2,3	2,4 - 3,7	2,9- 2,8
3	17 mg/kg	19,49-19,24	18,7-19,0	19,5-19,9	18,18-18,45	20,0-19,6
4	23 mg/kg	25,51-25,37	24,7-25,2	25,5-25,8	26,40-(22,81)	24,1-24,6
Recovery %		105,9	97,2	103,5	90,8	93,9

Tabel 7: Analyseresultaten voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in botervet, verkregen met de Franse methode bij een ringonderzoek met 4 laboratoria.

Monster nummer	Toevoeging	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4
1	20 mg/kg	20,93-20,68	17,1-17,3	16,5-17,0	20,70-19,72
2	0 mg/kg	3,44- 2,79	0,1- 0,3	0,2- 0,3	0,79- 0,90
3	17 mg/kg	19,85-19,02	14,5-15,0	14,2-14,5	18,10-19,02
4	23 mg/kg	24,31-23,62	20,7-20,8	18,0-18,1	23,65-22,74
Recovery %		91,4	86,8	80,7	99,1

Tabel 8: Gemiddelden (gecorrigeerd voor blanco), recovery en analyse-spreiding voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in botervet, verkregen met de aangepaste RIKILT-methode (R) en de Franse-methode (F).

Monster nummer	Toevoeging mg/kg	Gemiddelde		Recovery		Herhaalbaarheid abs.		Reproduceerbaarheid abs.	
		R	F	R	F	R	F	R	F
1	20	19,27	17,64	96,4	88,2	1,11	1,15	5,26	3,63
3	17	16,89	15,67	99,3	92,2	0,66	1,37	3,13	4,81
4 1)	23	23,01	20,39	100,0	88,6	0,78	1,15	3,12	5,42
4 2)	23	22,68		98,6		3,29		4,10	
Gem.1	20	19,72	17,90	98,6	89,7	0,85	1,22	3,83	4,63

- 1) Zonder 2e waarde van lab 4 (tabel 6); deze is conform ISO 5725 weggelaten
 2) Inclusief 2e waarde van lab 4.

Tabel 9: Analyseresultaten voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in botervet, verkregen met de aangepaste RIKILT-methode bij een ringonderzoek met 3 laboratoria.

Monster nummer	Toegevoegd (mg/kg)	Lab I mg/kg	gem. mg/kg	Lab II mg/kg	gem. mg/kg	Lab III mg/kg	gem. mg/kg
I	20	22,15-22,46	22,30	22,3-22,6	22,45	22,00-22,50	22,25
II	20	21,80-21,99	21,90	22,3-22,8	22,55	22,00-21,75	21,88
III	16	18,22-18,28	18,25	18,3-18,5	18,40	16,75-16,75	16,75
IV	23	24,77-25,11	24,94	26,3-26,3	26,30	24,50-24,75	24,62
V	18	19,81-20,05	19,93	21,2-21,3	21,25	18,75-19,25	19,00
VI	0 (blanco)	2,06- 1,96	2,01	2,6- 3,1	2,85	2,25- 2,00	2,12
gem. I/t/m V blanco	19,4		21,46		22,19		20,90
VI verschil recovery%	0 19,4		2,01 19,45 100,3%		2,85 19,34 99,7%		2,12 18,78 96,8%

Tabel 10: Gemiddelden (gecorrigeerd voor blanco), recovery en analyse-spreiding voor de bepaling van β -apo-8-caroteenzure ethylester in botervet, verkregen met de aangepaste RIKILT methode.

Monster nr.	Toevoeging mg/kg	Gemiddelde mg/kg	Recovery %	Herhaal- baarheid mg/kg	Reproduceer- baarheid mg/kg
I	20	20,01	100,0	0,76	1,16
II	20	19,78	98,9	0,68	0,68
III	16	15,47	97,6	0,24	2,29
IV	23	22,96	99,8	0,49	1,38
V	18	17,73	98,5	0,66	2,24
Gem.	19,4	19,19	98,8	0,56	1,55

DOSAGE DE L'ESTER ETHYLIQUE DE L'ACIDE
 β -APO-8' CAROTENOIQUE DANS L'HUILE DE BEURRE
 (teneur théorique = 20 ppm)

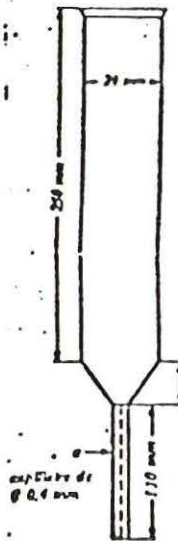
I - PRINCIPE

L'huile de beurre mise en solution dans l'éther de pétrole est déposée sur une colonne d'alumine basique. La fraction ester éthylique se fixe sous la forme d'une bande orangée (recherche qualitative).

Après lavage des graisses puis élution du carotène et autres caroténoïdes non identifiés, cette fraction ester éthylique peut être élue quantitativement et mise en solution dans le cyclohexane pour mesurer la densité optique correspondante (dosage quantitatif).

II - APPAREILLAGE

- a) verrerie courante,
- b) colonne à chromatographie avec tube capillaire (voir figure ci-contre),
- c) évaporateur rotatif à vide avec bain-marie réglé à 60° C,
- d) manomètre métallique permettant de régler des pressions de 0 à 600 g ou bien poire en caoutchouc,
- e) spectrophotomètre.



III - REACTIFS

- 1 - alumine basique activité I - Woelm,
- 2 - éther éthylique pur exempt de peroxydes,
- 3 - éther de pétrole pE 60 à 80° C pur distillé,
(Merck réf. 1774)
- 4 - acétone pure,
- 5 - mélanges éluants,
 - a) 50 ml éther éthylique (2) - 50 ml éther de pétrole (3)
 - b) 40 ml éther éthylique (2) + 40 ml éther de pétrole (3) + 20 ml acéto
- 6 - cyclohexane pur,
- 7 - sulfate de sodium anhydre pur.

IV - MODE OPERATOIRE

Préparation de la colonne

Presser un petit tampon de coton de verre dans la partie effilée de la colonne à chromatographie (b), introduire de l'éther de pétrole (3) dans la colonne et régler la vitesse d'écoulement à 2 gouttes par seconde en tassant le tampon avec une baguette de verre.

Dans une ampoule à décanter, mettre l'alumine (1) en suspension dans l'éther de pétrole (3) et la laisser s'écouler dans la colonne. Frapper avec une pièce métallique pour permettre le tassement de l'alumine et l'égalisation de la surface supérieure.

La colonne doit mesurer environ 7 à 8 cm de haut. Ajouter au-dessus environ 1/2 cm de sulfate de sodium (7) pour éviter la remise en suspension de l'alumine.

A partir de ce moment, le haut de la colonne ne doit jamais rester à sec.

Chromatographie

Mettre en solution 1,5 g de beurre (correspondant à 30% d'ester éthylique) dans environ 5 ml d'éther de pétrole (3). Il est nécessaire de tiédir.

Déposer la totalité sur le haut de la colonne et passer de l'éther de pétrole (3) en rinçant le ballon. Pendant ce dépôt, la vitesse d'écoulement doit être très lente (1 goutte toutes les 1 à 2 secondes).

Passer ensuite le mélange éluant (5a) jusqu'à décoloration de l'éluat. Aider éventuellement l'écoulement avec une petite pression d'azote (max. 0,04 bar). Plusieurs fractions dont le β -carotène sont ainsi éluées.

Pendant ces opérations, la fraction ester éthylique reste fixée dans la partie supérieure de la colonne sous la forme d'une bande orangée caractéristique. Si cette fraction tendait à décrocher, on pourrait envisager de diminuer la force du mélange (5a) en en modifiant les proportions (par exemple : 30 ml éther éthylique/70 ml éther de pétrole).

Elution de la fraction ester éthylique et dosage

Pour éluer cette fraction, passer le mélange (5 b) Cette élution peut être effectuée rapidement en s'aidant d'azote (pression 0,2 à 0,3 bar). Il peut être nécessaire de modifier la proportion d'acétone dans le mélange.

Evaporer à sec l'éluat à l'aide de l'évaporateur rotatif et reprendre le résidu dans 25 ml de cyclohexane (6).

Mesurer l'extinction maximum de cette solution à 448 - 450 nm par rapport au cyclohexane.

Calcul

$$\frac{E \text{ max.} \times 1000}{2560} \times \frac{V}{100} \times \frac{1000}{P}$$

avec :

E max. = extinction maximum de la solution de dosage

2560 $\approx E \frac{1\%}{1\text{cm}}$ de l'ester éthylique dans le cyclohexane

V = volume de la solution de lecture (25 ml dans le cas décrit ci-dessus)

p = prise d'essai en gramme.

Les résultats sont exprimés en mg d'ester éthylique par kg d'huile de beurre (ppm).

n° 322 Bb 8-001

1/73

Bestimmung von beta-Carotin und Apoester in Butter

2 g Butter
ca. 10 ml Petroläther

gut mischen, (erwärmen) durch einen Faltenfilter filtrieren, eventuell nachspülen.

Petroläther in einem Rundkolben am Rotationsverdampfer unter Teilvakuum eindampfen.

Der Rückstand wird mit wenig Petroläther gelöst und über eine ca. 12 cm lange Chromatographiesäule*) aus Aluminiumoxid, basisch, Aktivitätsstufe I, geschickt.

Laufmittel für beta-Carotin: Aether 40
Petroläther 60

Sollte die obere rote Zone (Apoester) zu schnell laufen, eventuell mit weniger Aether eluieren (z.B. Aether 30, Petroläther 70). Lösung eindampfen und mit einer genauen Menge n-Hexan wieder lösen.

E_1^1 bei ca. 450 nm in n-Hexan: 2500

Wenn die gelbe Zone (beta-Carotin) eluiert ist nimmt man als Laufmittel für Apoester: Aether 40
Petroläther 40
Aceton 20

Lösung eindampfen und mit einer genauen Menge n-Hexan wieder lösen.

E_1^1 bei ca. 448 nm in n-Hexan: 2550.

*) Säule vorher mindestens 2 Stunden stehen lassen.

1e oplage (1980-04-21).

BEPALING VAN HET GEHALTE AAN β -APO-8-CAROTEENZUUR IN BOTERVET.

1. Beginsel

Met kolomchromatografie wordt β -apo-8-caroteenzuur ethylester geïsoleerd van vet en β -Caroteen.

Na oplossen in chloroform wordt het gehalte spectrofotometrisch bepaald.

2. Reagentia

2.1. Iso-Octaan p.a.

2.2. Aluminium oxide Woelm zuur 0% H₂O

2.3. Chloroform p.a.

3. Glaswerk en apparatuur.

3.1. Bekerglazen 150 ml.

3.2. Roerstaafjes.

3.3. Chromatografie kolommen lang ca. 25 cm \varnothing ca 2 cm.

3.4. Waterbad.

3.5. Trechters \varnothing 8 cm.

3.6. Maatkolven 200 ml.

3.7. Spectrofotometer.

3.8. Cuvetten 1 cm.

3.9. Whatman filters 540.

3.10. Watten.

3.11. Pipetten 1,2,3, en 4 ml.

4. Werkwijze.

Voer de bepaling uit bij gedempt licht; vermijd zonlicht.

Bewaar oplossingen van β -apo-8-caroteenzure ethylester in het donker.

4.1. Weeg af in een bekeerglas 15 gram botervet, los dit op m.b.v. een waterbad in 25 ml. Iso-Octaan.

4.2. Schenk deze oplossing op een vooraf geprepareerde kolom met Aluminium Oxide in Iso-Octaan.

De kolom mag niet droog komen te staan.

4.3. Elueer met Iso-Octaan tot de kolom vrij is van vet en β -Caroteen .

De β -apo-8-caroteenzure ethylester is nu als een oranje-gele band bovenin de kolom zichtbaar.

4.4. Plaats de trechter op een maatkolf van 200 ml en elueer onder voortdurend roeren met Chloroform.

4.5. Vul de maatkolf aan met Chloroform, als de oplossing niet helder is filtreer dan over een Whatman 540 filter.

4.6. Bepaal direct de extinctie bij 456 nm. in een 1 cm. cuvet, gebruik Chloroform als blanco en bereken het gehalte β -apo-8-caroteenzure ethylester met de ijklijn.

5. IJklijn.

5.1. Weeg 10 mg. β -apo-8-caroteenzure ethylester af en los op met Chloroform

5.2. Breng over in een maatkolf van 100 ml. en vul aan met Chloroform.

5.3. Pipetteer achtereenvolgens 1,2,3, en 4 ml. van deze oplossing in maatkolven van 100 ml. en vul aan met Chloroform.

5.4. Bepaal direct de extinctie van deze oplossing bij 450 nm. in een 1 cm. cuvet met Chloroform als blanco.

5.5. Zet de extinctie uit tegen de concentratie.

6. IJklijn.

6.1. Weeg 100 mg. β -apo-8-caroteenzure ethylester af en los op met Chloroform.

6.2. Breng over in een maatkolf van 100ml. en vul aan met Chloroform.

6.3. Pipetteer 10 ml. in een maatkolf van 100 ml. en vul aan met Chloroform.

6.4. Pipetteer 10 ml. van oplossing 6.3. in een maatkolf van 100 ml. en vul aan met Chloroform.

6.5. Pipetteer 10 ml. van oplossing 6.4. in een maatkolf van 100 ml. en vul aan met Chloroform.

6.6. Pipetteer achtereenvolgens 10,20,30 ml. van oplossing 6.5 elk in een maatkolf van 100 ml. en vul aan met Chloroform, en 20 ml. van oplossing 6.5 in een maatkolf van 50 ml. en vul aan met Chloroform.

6.7. Bepaal direct de extinctie van deze oplossing bij 450 nm. in een 1 cm. cuvet met Chloroform als blanco.

6.8. Zet de extinctie uit tegen de concentratie.

7. Berekening.

$$\frac{E \times 2 \times 0,2}{0,45 \times a} \times 1000 =$$

E = Extinctie.

a = Ingewogen gewicht.

RIJKS-KWALITEITSINSTITUUT VOOR
LAND- EN TUINBOUWPRODUKTEN
WAGENINGEN

AFDELING ALGEMENE CHEMIE

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 474

1e oplage (1986-11-19)

BOTER EN BOTERVET - BEPALING VAN HET GEHALTE AAN β -APO-8-CAROTEENZURE
ETHYLESTER - SPECTROMETRISCH

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling Algemene Chemie
(5x)

474.0

Afdeling Algemene Chemie

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 474

1e oplage (1986-11-19)

Boter en botervet - Bepaling van het gehalte aan β -apo-8-caroteenzure ethylester - spectrometrisch.

1. Onderwerp en toepassingsgebied.

Dit voorschrift beschrijft een methode voor de bepaling van het gehalte aan β -apo-8-caroteenzure ethylester in boter en botervet.

2. Definitie.

Gehalte aan β -apo-8-caroteenzure ethylester: de massafractie aan bestanddelen, bepaald volgens de beschreven werkwijze en uitgedrukt in mg per kg.

3. Beginssel.

Botervet, opgelost in iso-octaan, wordt op een vooraf geprepareerde kolom met zuur aluminiumoxide gebracht.

De ethylester tekent zich af als een oranje-gekleurde band boven in de kolom. Na het uitwassen van het vet, β -caroteen en andere niet geïdentificeerde caroteenachtigen wordt de ethylester kwantitatief geëluëerd met chloroform. Het gehalte wordt daarna spectrometrisch bepaald.

4. Reagentia en hulpstoffen.

4.1 Iso-octaan p.a.

4.2 Zuur aluminiumoxyde (Woelm), aktiviteit 1 of super (drogen voor gebruik, 1 uur bij 125°C).

4.3 Chloroform p.a.

4.4 Natriumsulfaat p.a.

4.5 β -apo-8-caroteenzure ethylester: zuivere kristallen. Hoffmann-La Roche B.V. of 20% dispersie. Hoffmann-La Roche B.V.

4.5 β -apo-8-caroteenzure ethylester: zuivere kristallen of 20% dispersie. Hoffmann-La Roche B.V.

5. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

5.1 Bekerglazen 150 ml.

5.2 Chromatografiekolommen met kraan, lengte ca. 48 cm, \emptyset ca. 1 cm. (zie figuur 1).

5.3 Waterbad 40°C.

5.4 Maatkolven van 50 en 100 ml.

5.5 Spectrometer geschikt voor het meten bij 456 nm, met bijbehorende cuvetten met een optische weglengte van 1 cm.

5.6 Whatman filters 540.

5.7 Watten.

5.8 Pipetten van 10, 15 en 20 ml.

5.9 Vouwfilters, bijv. S en S 5971/2, \emptyset 320 mm.

6. Monsterneming

Zie voor de monsterneming van boter NEN 3701 en voor die van botervet NEN 3704. Bewaar de monsters in de koelkast.

7. Voorbehandeling

Pas in geval van boter de voorbehandeling toe volgens NEN 3702 en in geval van botervet die volgens NEN 3705.

Bij onderzoek van boter dient de boter eerst opgesmolten te worden en via een vouwfilter (5.9) over watervrij natriumsulfaat afgefiltreerd te worden.

8. Werkwijze

8.1 Vervaardigen van de kolom.

Druk een klein propje watten in het smalle gedeelte van de chromatografiekolom.

Breng 12 g aluminiumoxyde in suspensie met iso-octaan en laat het in de kolom lopen.

Tik tegen de kolom om het aluminiumoxyde bijeen te dringen en het bovenste oppervlak gelijk te maken. Druk een propje watten boven op het aluminiumoxyde en doe hier een laagje natriumsulfaat op van ca. 0,5 cm. Vanaf dit moment mag de top van de kolom niet droog komen te staan.

Opmerking

Giet het aluminiumoxide nooit droog in de kolom, daar er dan kanaalvorming kan optreden.

8.2 Uitvoering van de bepaling

Voer de bepaling uit bij gedempt licht, vermijd zonlicht. Bewaar oplossingen van β -apo-8-caroteenzure ethylester in het donker.

8.2.1 Weeg in een bekerglas 4 gram boter of botervet af, los dit op in 10 ml iso-octaan met gebruikmaking van het waterbad.

8.2.2 Spoel deze oplossing kwantitatief over op de kolom. Gebruik hierbij zo weinig mogelijk iso-octaan.

8.2.3 Elueer met ca. 40 ml iso-octaan tot de kolom vrij is van vet en β -caroteen. De β -apo-8-caroteenzure ethylester is nu als een oranje gele band boven in de kolom zichtbaar.

8.2.4 Blaas met lucht de kolom droog.

8.2.5 Plaats een maatkolf van 50 ml onder de kolom en elueer de ethylester met chloroform.

8.2.6 Vul de maatkolf aan met chloroform en homogeniseer. Als de oplossing niet helder is filtreer dan over een Whatman 540 filter.

8.2.7 Meet direct de extinctie van de oplossing ten opzichte van chloroform bij 456 nm in een 1 cm cuvet.

8.3 IJklijn

8.3.1 Weeg 100 mg β -apo-8-caroteenzure ethylester af en los deze op in chloroform.

8.3.2 Breng de oplossing over in een maatkolf van 100 ml, vul aan met chloroform en homogeniseer.

8.3.3 Pipetteer 10 ml in een maatkolf van 100 ml, vul aan met chloroform en homogeniseer.

8.3.4 Pipetteer 10 ml van oplossing 8.3.3 in een maatkolf van 100 ml vul aan met chloroform en homogeniseer.

8.3.5 Pipetteer achtereenvolgens 10 en 20 ml van oplossing 8.3.4 elk in een maatkolf van 100 ml, vul aan met chloroform en homogeniseer. Pipetteer daarna achtereenvolgens 15 en 20 ml van oplossing 8.3.4 in een maatkolf van 50 ml, vul aan met chloroform en homogeniseer. Aldus wordt een reeks ijkoplossingen verkregen die per ml resp. 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g en 4 μ g β -apo-8-caroteenzure ethylester bevat.

8.3.6 Bepaal direct de extincties van deze oplossingen ten opzichte van chloroform bij 456 nm in cuvetten van 1 cm.

8.3.7 Zet in een grafiek de extincties uit tegen de concentraties, uitgedrukt in μ g/ml.

9. Berekening

9.1 Lees in de ijkgrafiek de concentratie van de β -apo-8-caroteenzure ethylester in het onderzochte monster, in μ g/ml, af die behoort bij de waargenomen extinctie.

9.2 Bereken het gehalte aan β -apo-8-caroteenzure ethylester van het monster uitgedrukt in mg/kg met behulp van de formule:

$$\frac{50 \text{ pf}}{a}$$

waarin:

p = de concentratie van de β -apo-8-caroteenzure ethylester die in 9.1 is gevonden.

a = de afgewogen hoeveelheid botervet in g.

f = omrekeningsfaktor: voor boter f=0,83
voor botervet f=1

10. Nauwkeurigheid

10.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van een duplo, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd door dezelfde persoon onder dezelfde omstandigheden, mag niet groter zijn dan 3% relatief.

10.2 Reproduceerbaarheid.

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen, in enkelvoud uitgevoerd met hetzelfde monstermateriaal door verschillende laboratoria onder afwijkende omstandigheden, mag niet groter zijn dan 8% relatief.

Opmerking: De resultaten voor herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid zijn verkregen via een ringonderzoek tussen slechts drie laboratoria, die de bepalingen van de tracer regelmatig uitvoeren.

11. Literatuur.

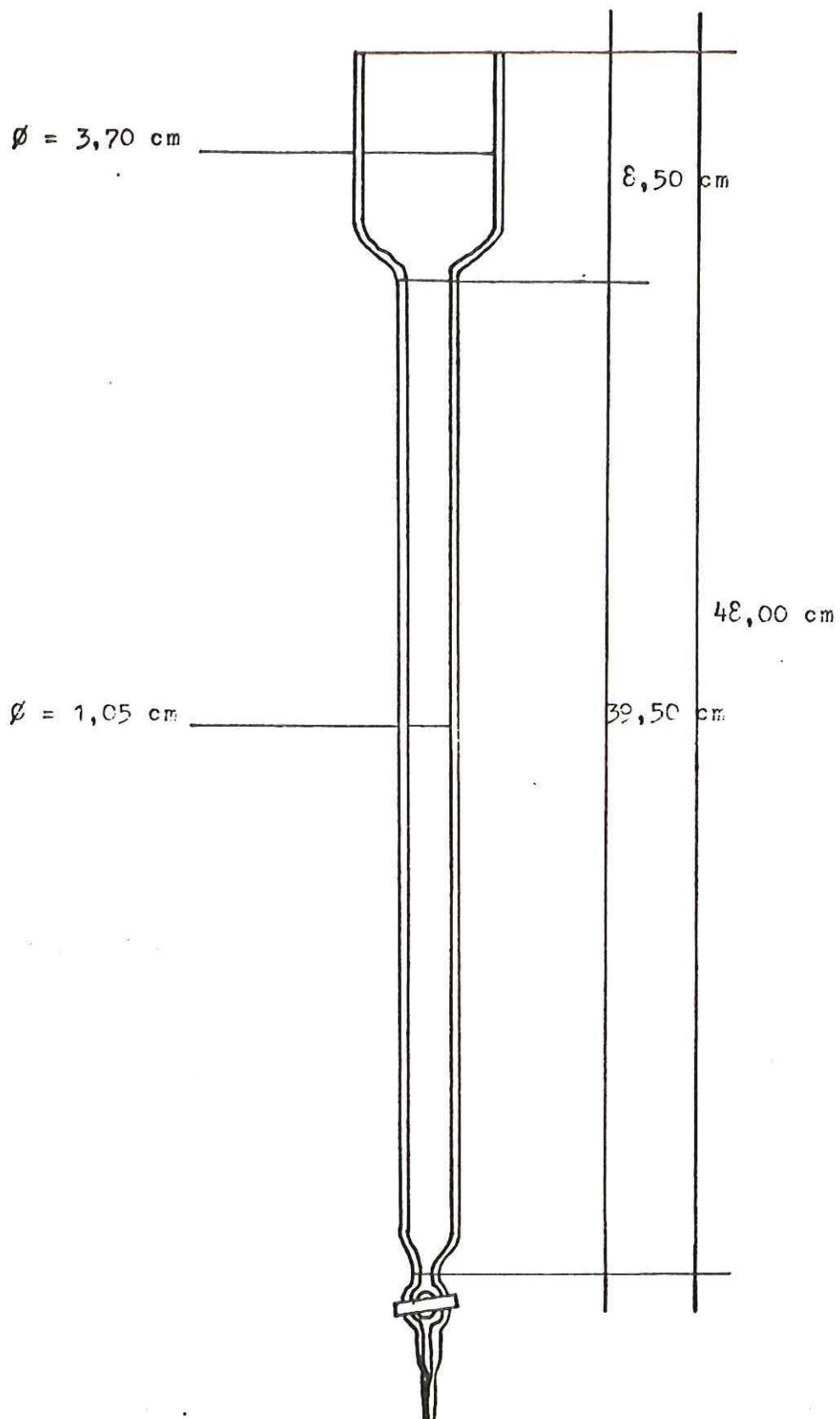
1. W.G. de Ruig en J.J. van Oostrom.

Het bepalen van het gehalte ethylester van β -apo-8-caroteenzuur in botervet. RIKILT verslag 80 G4, 1980.

Verantwoordelijk: drs N.G. van der Veen.

Samenstellers : J.F. Labrijn, drs N.G. van der Veen.

Figuur 1



Chromatografiekolom.