

Afdeling Microscopie Datum: 1984-05-10

RAPPORT 84.42 Pr.nr. 505.0021

Onderwerp: Uittesten van een aantal schei-
dingsvloeistoffen ten behoeve
van de botbepaling in separa-
torvlees en vleesprodukten.

Bijlage: 1.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling Micro-
scopie (3x), afdeling Normalisatie/harmonisatie, projekt-
beheer, Elenbaas.

Afdeling Microscopie

Datum: 1984-05-10

RAPPORT 84.42

Pr.nr. 505.0021

Projekt: Ontwikkeling van histologische, histometrische, histobacterioscopische en histochemische onderzoekmethoden voor vlees en vleeswaren.

Onderwerp: Uittesten van een aantal scheidingsvloeistoffen ten behoeve van de botbepaling in separatorvlees en vleesprodukten.

Bijlage: Intern Analysevoorschrift M 3.

Voorgaand verslag: Rapport 83.93 Literatuuroverzicht separatorvlees (produktie, samenstelling en analysemethoden).

Doel:

Bij de ontwikkeling van een sedimenteermethode voor de bepaling van het botgehalte in separatorvlees wordt gebruik gemaakt van een vloeistof met een hoge relatieve dichtheid (d). Bij dit onderzoek wordt nagegaan welke vloeistof hiervoor het meest in aanmerking komt.




Samenvatting:

Monstermateriaal werd verkregen door het uitprepareren van een aantal diepvries braadkippen. De botjes werden verzameld, gemalen, ontvet met aceton en gezeefd. Voor het sedimenteren werd gebruik gemaakt van de methode zoals die wordt beschreven in Intern Analysevoorschrift M 3 (zie bijlage).

Uitgetest werden een zestal scheidingsvloeistoffen, te weten tetrachloorkoolstof, een mengsel van tetra met aceton (2,5/1), chloroform, dichloormethaan (methyleenchloride), een verzadigde magnesiumsulfaatoplossing en een handwarme keukenzoutoplossing (20%).

Conclusie:

Zowel de magnesiumsulfaatoplossing als de keukenzoutoplossing bleken niet geschikt voor het sedimenteren van fijne botbestanddelen. Van de vier overige scheidingsvloeistoffen is dichloormethaan het meest geschikt om fijne botbestanddelen d.m.v. sedimenteren te isoleren.

Verantwoordelijk: drs W.J.H.J. de Jong 
Medewerkers/samenstellers: J.S. Ossenkoppele, J.J.M. Vliege,
W.J.H.J. de Jong 
Projectleider: drs W.J.H.J. de Jong 

1. Inleiding

Voor het bepalen van het botgehalte in separatorvlees werden reeds diverse methoden ontwikkeld, onder meer sedimenteermethoden, waarbij gebruik wordt gemaakt van de hogere relatieve dichtheid (d) van de botdeeltjes ten opzichte van de vleesbestanddelen. De relatieve dichtheid bedraagt van gedroogde zuivere eiwitbestanddelen 1,1 - 1,2 en van gedroogde botbestanddelen 1,7 - 2,1. De gewenste relatieve dichtheid van de scheidingsvloeistoffen moet daarom boven de relatieve dichtheid van de eiwitten en onder de relatieve dichtheid van de botbestanddelen liggen (9, 12, 16).

Gezien onze ervaringen met het isoleren van mineralen en botbestanddelen in mengvoeders door middel van sedimenteren in tetrachloorkoolstof lijkt het zinvol om een eigen aangepaste methode voor het isoleren van botbestanddelen in separatorvlees en vleesprodukten te ontwikkelen (4, 10, 11, 16).

In de literatuur worden een groot aantal scheidingsvloeistoffen genoemd (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15). Het is echter niet geheel duidelijk welke vloeistof bij de bepaling van het botgehalte in vleesprodukten het meest geschikt is. Om deze reden werd een zestal scheidingsvloeistoffen uitgetest.

2. Materiaal en methoden

2.1 Materiaal

Bij het uitvoeren van de verschillende sedimentatietesten werden de volgende apparaten en chemicaliën toegepast:

1. droogstoof
2. magneetroerder
3. sedimenteerkerken
4. beker glazen, maatcilinders 100 en 500 ml, horlogeglazen
5. kruisslagmolen (peppinkmolen)
6. laboratoriumschudzeefmachine met zeef 0,5 mm
7. messen, scalpels, borstels enz.
8. analytische balans
9. stereo-microscoop en microscoop
10. magnesiumsulfaat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).
11. keukenzout ($NaCl$)
12. tetrachloorkoolstof (CCl_4)
13. aceton (CH_3COCH_3)

14. chloroform (CHCl_3)
15. dichloormethaan (methyleenchloride) (CH_2Cl_2).

2.2 Monstermateriaal

Voor het verzamelen van botmateriaal werden diverse braadkuikens uit-geprepareerd en het botmateriaal verzameld. Er werd veel aandacht be-steed aan het verwijderen van het beenmerg en het spongieus been uit het compacte bot (harde botrest), aangezien deze weefsels bij het se-dimenteren nagenoeg niet zullen bezinken. Hierna werd het monster ont-vet met aceton, gedroogd bij 30°C en vervolgens werd zodanig met een kruisslagmolen gemalen, dat de deeltjes een zeef met een maaswijdte van 3 mm konden passeren.

Het analysemateriaal werd tenslotte verdeeld in een grove en een fijne fraktie door middel van zeven over een zeef met een maaswijdte van 0,5 mm. Uit de literatuur is bekend dat in het algemeen in separatorvlees botdeeltjes voorkomen, die kleiner zijn dan 0,5 mm (12).

2.3 Methode

Het analysemateriaal werd gesedimenteerd volgens de in de bijlage be-schreven methode (Intern Analysevoorschrift M 3).

Als scheidingsvloeistoffen werden toegepast:

<u>Scheidingsvloeistof</u>	<u>Relatieve dichtheid (d)</u>
A. Tetrachloorkoolstof	1,60
B. Tetra/acetone (2,5/1)	1,37
C. Chloroform	1,48
D. Dichloormethaan	1,33
E. Verzadigde magnesiumsulfaatoplossing	1,28*
F. Handwarme keukenzoutoplossing (20%)	1,12**

* Voor de bereiding van een verzadigde magnesiumsulfaatoplossing werd ca. 1100 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in een liter water opgelost. Deze oplossing werd gedurende drie dagen m.b.v. een magneetroerder bij kamertempe-ratuur geroerd (1, 2, 9, 13, 14). Het volume van de verzadigde op-lossing bedraagt dan 1640 ml en de relatieve dichtheid 1,28 (9).

** Na de bereiding van de 20%-ige keukenzoutoplossing moet deze oplos-sing tijdens het sedimenteren tot ca. 40°C verwarmd worden (hand-warm) (6).

3. Uitvoering

Van de ontvette gedroogde botbestanddelen worden zowel van de grove fraktie ($>0,5$ mm) als van de fijne fraktie ($<0,5$ mm) 100 mg afgewogen en in een sedimenteerkerk gebracht, waarin zich ongeveer 100 ml van de te onderzoeken scheidingsvloeistof bevindt. Na voorzichtig omroeren met een roerstaaf laat men de botbestanddelen gedurende 10 minuten bezinken. Vervolgens wordt de plug onder aan de sedimenteerkerk een kwartslag gedraaid. De bovenstaande vloeistof wordt afgegoten. De inhoud van de plug wordt overgebracht op een horlogeglas en aan de lucht gedroogd. Het is bekend dat gechloreerde koolwaterstoffen schadelijk voor de gezondheid kunnen zijn. Er moet dan ook voor een goede ventilatie worden gezorgd. Er dient gewerkt te worden op een tafel waarvan de damp van de vloeistoffen kan worden afgezogen of in een zuurkast.

Het sediment wordt gewogen en het bezinkingspercentage ten opzichte van het uitgangsmateriaal berekend (zie bijlage).

Op deze wijze werden de 6 bovengenoemde scheidingsvloeistoffen getest. Hiertoe werd 10 maal van zowel de grove als de fijne fraktie het bezinkingspercentage vastgesteld. Tevens werd m.b.v. een stereomicroscoop (vergroting 20x) en een microscoop (vergroting 160x) het sediment op botbestanddelen onderzocht.

4. Resultaten en discussie

De bepaling van de bezinkingspercentages in de magnesiumsulfaatoplossing en de keukenzoutoplossing bleek op de beschreven wijze niet mogelijk. De botbestanddelen bleven op deze vloeistoffen drijven. De mogelijke oorzaak hiervan is dat de vloeistof (water) niet doordringt in de kanaaltjes (haverse kanalen, lacunen, etc.) van de botbestanddelen, zodat de lucht daar ingesloten blijft en de relatieve dichtheid van de deeltjes lager blijft dan van beide oplossingen. Een ander nadeel van beide oplossingen is de bewerkelijkheid bij de bereiding met name het langdurig oplossen en het hardwarm verwarmen.

Bij de 4 overige scheidingsvloeistoffen traden deze problemen niet op. Er werden verschillen in bezinkingspercentages met name in de fijnere frakties gevonden (zie tabel).

Vastgesteld werd dat vooral met dichloormethaan een zeer hoog gehalte aan botbestanddelen in het sediment werd teruggevonden.

Bij het sedimenteren van de grove fraktie ($>0,5$ mm) van de botbestanddelen voldeden de vier organische scheidingsvloeistoffen (gemiddeld bezinkingspercentage 99%).

Bij het sedimenteren van de fijne fraktie ($<0,5$ mm) van de botbestanddelen bedroeg het bezinkingspercentage in tetrachloorkoolstof gemiddeld 90,68%, in het tetra-acetonmengsel 94,56%, in chloroform 94,23% en in dichloormethaan 96,16%.

Bij deze bepaling werd alleen gebruik gemaakt van de harde botrest van braadkippen. Aangenomen mag worden dat met de harde botrest van varkens- en runderbeenderen dezelfde resultaten zullen worden verkregen.

5. Conclusie

Bij het sedimenteren van zowel de grovere ($>0,5$ mm) als de fijnere ($<0,5$ mm) botbestanddelen bleek dat dichloormethaan ($d = 1,33$) de beste resultaten te zien gaf.

Van de grove fraktie werd 99,8% en van de fijne fraktie 96,2% na sedimenteren in dichloormethaan teruggevonden in het sediment.

Zowel de verzadigde magnesiumsulfaatoplossing als de handwarme 20% keukenzoutoplossing bleken niet geschikt voor het sedimenteren van fijne botbestanddelen.

6. Literatuur

1. Anhalt, G. Der direkte und indirekte Nachweis von Knochensubstanz in Fleisch- und Wursterzeugnissen unter Berücksichtigung der maschinellen Entbeinung des Rohstoffes Fleisch. Vet. med. Diss., Hannover, 1974.
2. Brüning-Oeltjen, A. Vergleichende Untersuchungen handentbeinten Restfleisches von Schwein und Rind auf Knochengehalte unter Anwendung direkter und indirekter Verfahren. Vet. med. Diss., Hannover, 1977.
3. Diller, H. Der Nachweis von kleinsten Knochenanteilen in Wurst. Z. Unters. Lebensmittel 82, 17-19, 1941.
4. Freund, H. Handbuch der Mikroskopie in der Technik. Band VIII, Mikroskopie der Nahrungs- und Futtermittel, der Drogen und Genussmittel.

5. Van GEnd, H.W., Über die Bestimmung und den Gehalt von Knochen-splitttern in Fleischwaren. Z. Lebensmitt.-Untersuch., Band 146, 97-99, 1971.
6. Haken, J.W. Een snelle bepaling van het botgehalte van "boneless cooked chicken meat". De Ware(n)-Chemicus 6, 30, 1976.
7. Hill, R.M. en Hites, B.D. Determination of small bone particles in meat. J.A.O.A.C. 51, 1175-1177, 1968.
8. Kamm, L. en Coffin, D.E. Determination of the bone content of com-minuted chicken. Can. Inst. Food Technol. J. Vol. 1, no. 3, 83-85, 1968.
9. Kressman, H. Vergleichende Untersuchungen an Knochenschrot und Futterfleischkonserven. Arch. Lebensmittelhyg. 8/9, 199-202, 1968.
10. Ossenkoppele, J.S. en Vliege, J.J.M. RIKILT-Verslag 82.45 Bepaling botgehalte in boterhamworst.
11. Ossenkoppele, J.S. en Vliege, J.J.M. RIKILT-Verslag 83.68 Micro-scopisch onderzoek van hamburgers.
12. Ossenkoppele, J.S. en Vliege, J.J.M. RIKILT-Verslag 83-93 Litera-tuuroverzicht separatorvlees (productie, samenstelling en analyse-methoden).
13. Schaal, M. en Anhalt, G. Nachweis von Knochenpartikeln in Wurst-erzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 25, 164-166, 1974.
14. Schulze, K. Bestimmung des Knochengehaltes in Separatorenfleisch aus Schweineknochen. Arch. Lebensmittelhyg. 28, 166-169, 1977.
15. Sinell, H.J. Zum quantitativen Nachweis geringer Knochenmengen in Dosenleberwurst. Arch. Lebensmittelhyg. 7, 61-63, 1956.
16. Vöhringer, H. Die mikroskopische Untersuchung von Fischmehlen auf Echtheit und Reinheit. Diss. Hohenheim, 1958.

Tabel. Bezinkingspercentage in de verschillende scheidingsvloeistoffen

Aantal	Scheidingsvloeistoffen							
	Tetra		Tetra/aceton		Chloroform		Dichloormethaan	
	>0,5 mm	<0,5 mm	>0,5 mm	<0,5 mm	>0,5 mm	<0,5 mm	>0,5 mm	<0,5 mm
1	99,87	90,57	99,81	93,33	99,21	94,84	99,91	95,72
2	99,08	93,37	99,76	94,49	99,40	94,19	99,95	96,37
3	99,38	91,30	99,68	96,51	99,80	96,60	99,68	95,87
4	97,65	93,34	99,64	96,90	99,04	96,12	99,92	97,57
5	99,75	93,81	98,99	94,60	99,45	94,46	99,94	95,91
6	98,97	78,94	99,95	93,86	99,23	90,60	100,00	92,35
7	99,93	94,61	97,24	94,90	99,04	92,82	99,90	98,60
8	99,55	90,31	98,91	95,55	98,95	93,82	99,34	97,17
9	99,48	88,71	99,04	95,40	97,56	94,74	99,88	94,98
10	98,51	91,85	99,49	90,07	99,43	94,06	99,89	97,04
x	99,22	90,68	99,25	94,56	99,11	94,23	99,84	96,16
s	0,70	4,51	0,80	1,92	0,60	1,67	0,20	1,70
x 95%	97,6-100,8	80,5-100,9	97,4-101,1	90,2- 98,9	97,8-100,4	90,4- 98,0	99,4-100,3	92,3-100,0
x 95%	98,7- 99,7	87,4- 93,9	98,7- 99,8	93,2- 95,9	98,7- 99,5	93,0- 95,4	99,7-100,0	94,9- 97,4

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT M 3

2e oplage (1984-01-09)

Diervoerders. Scheiding van organische en anorganische bestanddelen van het monster door flotatie en sedimentatie in een vloeistof met een hoge soortelijke massa.

1. Doel

De hier beschreven werkwijze heeft tot doel het gereed maken van een analysemonster voor microscopisch onderzoek.

Door het sedimenteren van bestanddelen met een hoge soortelijke massa ten opzichte van bestanddelen met een lage soortelijke massa wordt het microscopisch onderzoek in de meeste gevallen aanzienlijk vereenvoudigd.

2. Toepassingsgebied

De methode is toepasbaar voor droge korrelvormige en poedervormige produkten. Produkten in de vorm van koeken, korrels, brokjes, schilfers en pellets dienen eerst gemalen te worden (Intern analysevoorschrift M 1).

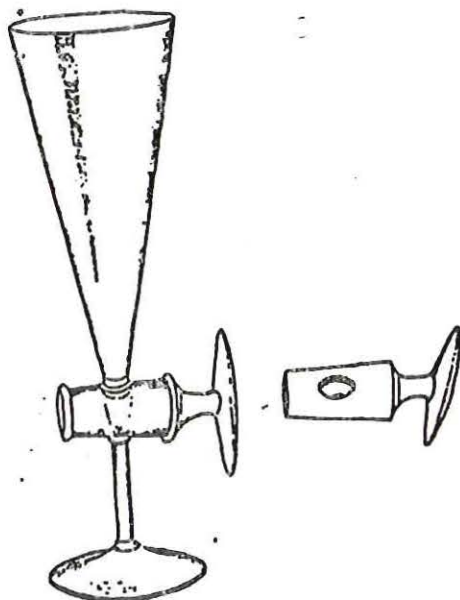
3. Reagentia

3.1 Tetrachloorkoolstof (tetra, $d = 1,595$)

3.2 Chloroform ($d = 1,480$)

4. Apparatuur en hulpmiddelen

4.1 Glazen sedimenteerkerken van 1/4 l: conische glazen met voet, voorzien van een glazen afsluitplug in het onderste smalle gedeelte. In de plug bevindt zich een holte, waarin zich het sediment verzamelt, waarna dit door draaien van de plug kan worden gescheiden van de verdere inhoud van de kelk. Zie figuur.



Figuur. Sedimenteerkelk voor het uitvoeren van een kwantitatieve sedimentatie.

4.2 Zeefdoosjes: voorzien van zeefgaas met vierkante mazen van 0,32 mm maaswijdte.

4.3 Horlogeglazen: diameter ongeveer 9 cm.

5. Analysemateriaal

Van dierlijke produkten, behalve bloedmeel, levermeel en vetkanen 2,0 g; van gras-, klaver- en lucernemeel 5,0 g; van andere produkten (inclusief bloedmeel, levermeel en vetkanen) 10,0 g.

6. Werkwijze

Breng de afgewogen hoeveelheid analysemateriaal in de sedimenteerkelk, waarin zich ongeveer 100 ml tetra bevindt. Van monsters die gemalen zijn, wordt het analysemateriaal in een mortier aangewreven met een weinig tetra en daarna met ongeveer 100 ml tetra overgespoeld in de kelk.

Roer het monster zorgvuldig met een roerstaaf door de vloeistof en laat daarna bezinken. Als regel zal het sediment na ongeveer 5 minuten in de holte van de plug zijn verzameld.

Draai vervolgens de plug een kwart slag om, schenk de tetra met de bovendrijvende bestanddelen af en schuif daarna de plug met het sediment voorzichtig uit de voet van de kelk.

Breng de inhoud van de plug voorzichtig kwantitatief over op een gewogen horlogeglas. Laat de tetra volledig verdampen, weeg het horlogeglas met bezinksel en bereken de hoeveelheid sediment in procenten van het monster. Scheid daarna het sediment door middel van een zeefdoosje in een grove en een fijne fractie.

7. Opmerking

Het gevonden gehalte aan soortelijk zware stoffen is meestal geringer dan het ware gehalte, doordat in geperste voeders, maar ook in andere produkten, de zware delen, vooral wanneer ze fijn verdeeld zijn, blijven kleven aan de lichtere delen en daardoor niet bezinken. Het omgekeerde kan ook voorkomen.

In plaats van tetra kan als sedimenteervloeistof ook chloroform gebruikt worden. De dichtheid hiervan is iets lager, zodat bestanddelen met een soortelijk gewicht van meer dan 1,480 hier in sedimenteren.

Zowel tetra- als chloroformdamp zijn schadelijk voor de gezondheid, zodat het is aan te bevelen om voor een goede ventilatie te zorgen, bij voorkeur dient gewerkt te worden op een tafel, die kan worden afgezogen.

8. Literatuur

8.1 H. Freund, "Handbuch der Mikroskopie in der Technik", Band VIII, "Mikroskopie der Nahrungs- und Futtermittel, der Drogen und Genussmittel", Frankfurt, 1976.