

Afdeling Eiwitchemie 1984-09-20  
RAPPORT 84.72\* Pr.nrs. 404.9101/505.9020  
Onderwerp: Het aantonen van bebroede  
eieren in eiprodukten aan de hand van  
het 3-hydroxyboterzuurgehalte.

COVP : ir Th.G. Uijttenboogaart  
ir A.T.G. Steverink  
RIKILT: drs H.L. Elenbaas  
W. Haasnoot  
drs B.G. Muuse

Projektnummer : 683 (COVP)  
404.9101/505.9020 (RIKILT)

Projektleiders: ir A.T.G. Steverink (COVP)  
drs H.L. Elenbaas

Overige medew.: C. van Crujningen (COVP)  
D. Dijk (COVP)  
W. Haasnoot (RIKILT)  
B. Rutjes (RIKILT)  
P. Stouten (RIKILT)

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. Eiwitchemie  
(4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Projekt-  
beheer, Projektleider (Elenbaas/Haasnoot), VD (2x), RVV  
(2x), Den Hartog, AID, Serlabo (drs Olsman).

\* Dit verslag verschijnt ook als COVP-Mededeling No. 413.



### Samenvatting

De ontwikkeling van een enzymatische en een gaschromatografische methode voor het aantonen van 3-hydroxyboterzuur is in het kort beschreven. Een meer uitgebreide beschrijving plus toetsing en vergelijking van beide methoden is elders gegeven (15). Beide methoden zijn gelijkwaardig gebleken.

Met behulp van de enzymatische methode is het 3-HBZ gehalte bepaald in consumptie-eieren (batterij en scharrel) onbebroed en bebroed, broedeieren (heldere en op verschillende tijdstippen spontaan en geforceerd afgestorven), eiprodukten (vóór en na pasteuriseren en met en zonder toevoegingen), koelhuiseieren en micro-biologisch bedorven eieren. Hierbij is gebleken, dat het 3-HBZ gehalte in eieren, welke langer dan 6 dagen zijn bebroed, ook na zeer zorgvuldig schouwen, zeer hoog is vergeleken met consumptie-eieren (ca. 30 tegen ca. 0.7 mg/kg). Het gewogen gemiddelde zowel voor 6-dagen bebroede heldere eieren als voor heldere plus twijfelachtige is 1.0 mg/kg.

Ter verklaring van diverse resultaten is een proef uitgevoerd om het effect van het tijdstip van afsterven van de kiem op het gehalte aan 3-HBZ te meten.

### Summary

The development of an enzymic and a gas chromatographic method for the determination of 3-hydroxybutyric acid (3-HBA), to indicate whether or not incubator reject eggs have been incubated for longer than 6 days, is described in brief. A more detailed description and the comparison of both methods as well as the results summarized in this report will be published elsewhere (15, 17). Incubated and not incubated consumption eggs (battery cages and deep litter), cold stored eggs, hatchery eggs (clears, forced and spontaneously died), egg products before and after pasteurization with and without additions and bacteriologically spoiled eggs have been analysed with the enzymic method to get an overall idea of the presence/development of 3-HBA. Only for incubator rejects held in incubators for longer than 6 days the average amount of 3-HBA, even after being candled very carefully, is much higher (approx. 30 mg/kg) than that in consumer eggs (approx. 0.7 mg/kg).

The weighted mean for 6-days incubator clears as well as for 6-days incubator clears plus doubtfuls is 1.0 mg/kg.

In order to explain some results the effect of the moment of embryo growth termination on the 3-HBA content has been investigated.

Aangezien de gewenste methode ook geschikt moet zijn voor eieren die bepaalde verwerkingsfasen hebben ondergaan (b.v. pasteurisatie) waarbij eveneens denaturatie van proteïnen plaatsvindt, zijn gedatureerde proteïnen geen geschikte indicator voor het aantonen van bebroede eieren in eiprodukten. Bovendien hebben Csuka etal. (3) aangetoond, dat het gedurende zeven dagen bebroeden van onbevruchte verse eieren tot ontleding van proteïnenfracties leidt. Dit betekent dat methoden als electroforese (3, 4) en het meten van de toename aan reducerende proteïnen (5) niet bruikbaar zijn.

De vorming van 3-HBZ door een embryo in ontwikkeling werd voor het eerst gerapporteerd door Salwin etal. (6) en de mogelijkheid om het 3-HBZ te gebruiken als indicator voor de aanwezigheid van bebroede eieren werd door hen aangegeven. In latere studies werd de bruikbaarheid van deze indicator bewezen (7-14).

Het gehalte aan 3-HBZ kan o.a. worden bepaald langs gaschromatografische (6-13) en enzymatische (14) weg. De door Parry etal. beschreven enzymatische methode (14) leek geschikt als screeningstest, zij het, dat een onderste detectiegrens van ca. 2 mg/kg hoog is, zeker als men bedenkt, dat in de Engelse literatuur (10) 2 mg 3-HBZ/kg heelei wordt voorgesteld als richtwaarde voor normering. Daarom werd in eerste instantie gewerkt aan verbetering van de enzymatische methode, teneinde een lagere detectiegrens te bereiken.

Gelijktijdig werd gewerkt aan een tweede, verificatie-, methode. Daarbij werd uitgegaan van bestaande gaschromatografische procedures (10, 13). Vanwege het tijdrovende karakter van deze methoden (ca. 6½ uur) werd gezocht naar modificaties van de verschillende bewerkingsfasen, waarbij tijdsbesparing niet ten koste van de nauwkeurigheid mocht gaan. Beide methoden werden getest op eieren en eiprodukten van uiteenlopende aard, deels afkomstig uit de praktijk en deels van het Spelderholt (zie hoofdstuk 3).

Alle in dit rapport weergegeven resultaten zijn verkregen met de enzymatische methode. Resultaten van tussentijds onderzoek en over de vergelijking van beide methoden zijn te vinden in een aantal RIKILT-rapporten.

## 2. Ontwikkeling van een enzymatische en gaschromatografische methode voor het bepalen van 3-hydroxyboterzuur.

De twee hieronder beschreven methoden, de enzymatische en de gaschromatografische methode, zijn geschikt voor het bepalen van lage gehalten aan 3-HBZ in monsters vloeibaar heelei en eiprodukten.

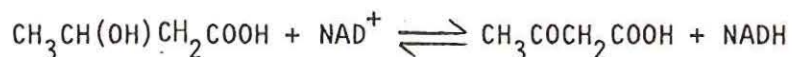
De beide methoden zijn getoetst en met elkaar vergeleken bij lage concentraties 3-HBZ, tot 5 mg/kg.

Uit een statistische evaluatie is gebleken, dat beide methoden gelijkwaardig zijn (15). Het terugvindingspercentage en de standaardafwijking zijn in het getoetste gebied ca. 95%, respectievelijk 0.33 mg/kg.

Met beide methoden kunnen 15 tot 20 monsters per dag worden onderzocht.

### 2.1. De enzymatische methode (16)

Het 3-HBZ wordt door middel van perchloorzuur uit het monster geëxtraheerd. In de oplossing wordt het perchloorzuur verwijderd door het neer te slaan met kaliumhydroxide. Het 3-HBZ in de perchloorzuur-vrije oplossing wordt met behulp van het enzym D-3-hydroxyboterzuurdehydrogenase (3-HBZDH) en het co-enzym  $\text{NAD}^+$  geoxideerd tot acetoazijnzuur, volgens de vergelijking:



Om de reactie volledig te laten verlopen wordt hydrazinehydraat toegevoegd. De totale hoeveelheid NADH wordt fotometrisch gemeten bij een golflengte van 340 nm. Het gehalte 3-HBZ wordt berekend aan de hand van de hoeveelheid NADH met behulp van de molaire absorptiecoëfficiënt van NADH.

De methode is gebaseerd op een door Parry etal. (14) beschreven enzymatische methode. De detectiegrens van die methode is ca. 2 mg 3-HBZ/kg, te hoog om de lage gehalten van minder dan 1 mg/kg in niet bebroede en/of onbevruichte eieren te meten, zoals gaschromatografisch is bepaald (10).

Om de detectiegrens te verlagen zijn de volgende modificaties aan de methode van Parry aangebracht:

- De monsteroplossingen zijn meer geconcentreerd gemaakt;
- De totale hoeveelheid NADH na afloop van de enzymatische reactie wordt gemeten en niet de hoeveelheid NADH die tijdens het begin van de reactie per tijdseenheid wordt gevormd;
- Een zo zuiver mogelijk enzym 3-HBZDH met een zo hoog mogelijke activiteit moet worden gebruikt;
- Het fotometrisch meten van de totale hoeveelheid NADH in het monster moet gebeuren tegen een monsteroplossing met alle reagentia, maar zonder enzym.

De eerste twee modificaties verhogen de nauwkeurigheid en gevoeligheid, maar hebben als nadeel een langere analysetijd en het optreden van storingen door verontreinigingen van het enzym met de enzymen lactaat- en malaatdehydrogenase. Om deze storingen te onderdrukken is de derde modificatie aangebracht: gebruik van het enzym van de fa. Sigma (cat.nr. H 4005) in plaats van het enzym van de fa. Boehringer. Modificatie vier is ingesteld, omdat blijkt dat, in tegenstelling tot wat Parry en medewerkers beweren, de monsteroplossing bij de te meten golflengte van 340 nm een bepaalde achtergrond absorptie vertoont. Door deze modificaties kon de detectiegrens worden teruggebracht van 2 naar 0.5 mg 3-HBZ/kg.

## 2.2 De gaschromatografische methode

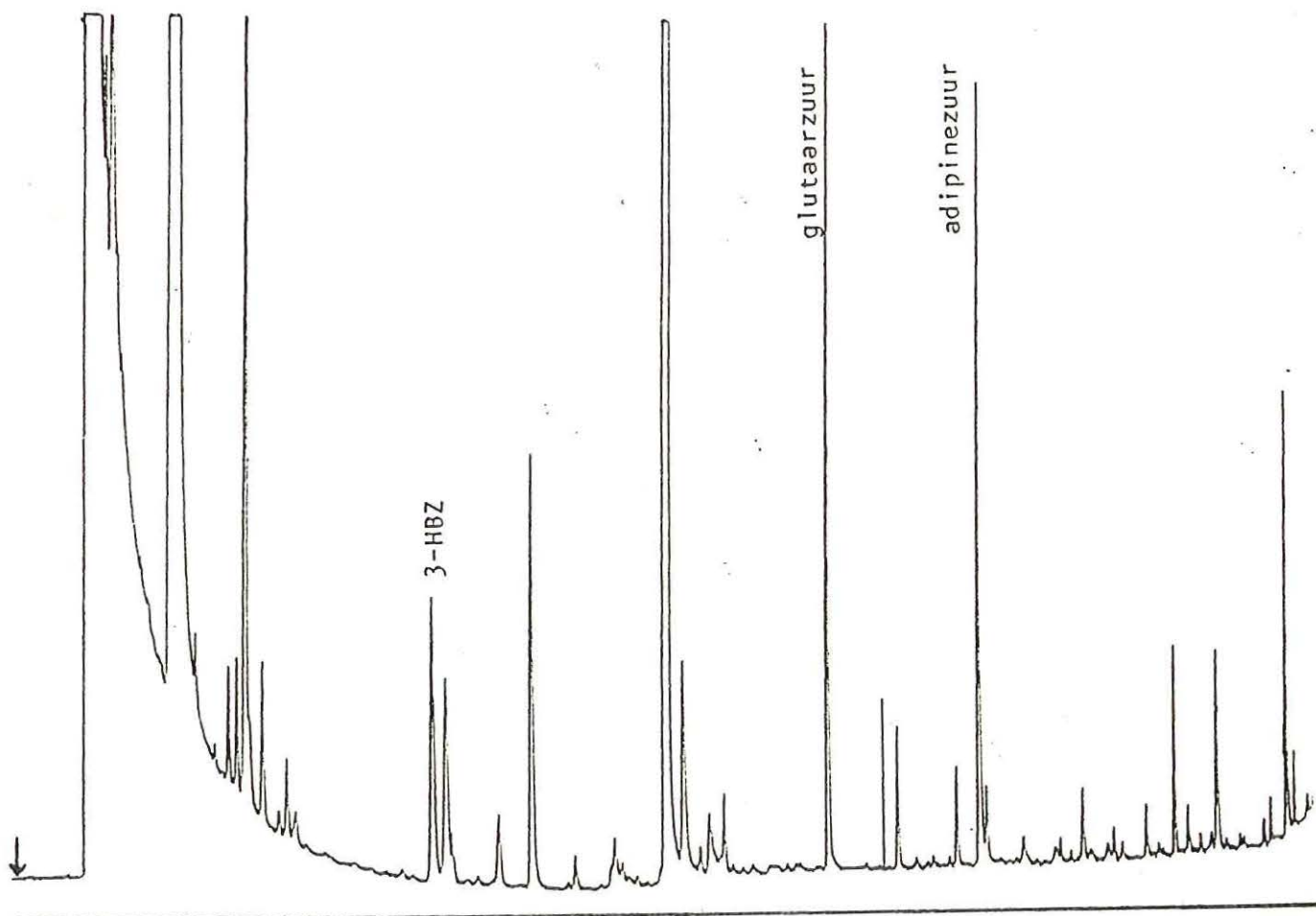
Een heldere waterige oplossing van 3-HBZ wordt bereid door een eihomogenaat, waaraan glutarzuur als interne standaard is toegevoegd, te klaren met zwavelzuur en fosforwolfraamzuur. Een deel van de oplossing wordt op een Extrelut kolom gebracht, die het water adsorbeert. Het 3-HBZ, glutarzuur en andere verbindingen worden met ethylacetaat van de kolom geëluëerd. Vervolgens wordt het eluaat na toevoeging van adipinezuur, een tweede interne standaard ter controle van de analyse, tot droog ingedampt. De organische zuren worden onder verwarming met zoutzure methanol gemethyleerd. Het zoutzuur wordt vervolgens met ammoniakale methanol geneutraliseerd en de oplossing wordt met natriumbicarbonaat op pH gebracht. Na ultra-filtratie is de oplossing gereed voor het gaschromatografisch onderzoek.

In de gaschromatograaf wordt 1  $\mu$ l geïnjecteerd en 1:7 gesplit. De componenten worden op een CP Wax 57 CB fused silica capillaire kolom (20 m x 0.22 mm i.d.) onder bepaalde omstandigheden gescheiden (fig. 1).

Het gehalte 3-HBZ in het monster wordt berekend uit de piekoppervlakten van 3-HBZ en glutaarzuur en met behulp van de responseverhouding van glutaarzuur en 3-HBZ in de vlamionisatiedetector.

De methode is een verbeterde versie van die gepubliceerd door Littmann *etal.* (13). Met name de tijdsduur van de analyse is teruggebracht van ca. 6½ tot ca. 2½ uur.

Een praktisch gebrek van de methode is het dichtslibben van de kolom met zout, waardoor al na 20-100 injecties effecten in het chromatogram zichtbaar worden. Dit probleem kan worden ondervangen door te silyleren in plaats van te methyleren. Silyleren geeft ook de mogelijkheid om splitless (on-column) te injecteren waardoor de detectiegrens van de methode tot onder 0.1 mg/kg. kan worden verlaagd.



Figuur 1 Chromatogram van de methylesters van een ei-extract. Condities: zie tekst.

### 3. Gehalten 3-HBZ in consumptie-eieren, koelhuisseieren, bevruchte niet bebroede eieren, eiprodukten en bedorven eieren

Voor een goed begrip van hetgeen in dit hoofdstuk zal worden besproken, is het noodzakelijk vooraf enige toelichting te geven.

Tijdens de ontwikkelingsfase van de (enzymatische) methode zijn vele monsters eieren onderzocht. Op een bepaald moment werden gehalten 3-HBZ gevonden tussen 1 en 2 mg/kg voor consumptie-eieren, bevruchte niet bebroede eieren, koelhuisseieren en verschillende eiprodukten.

Op basis van literatuurgegevens was echter bekend, dat, met name consumptie-eieren, lagere gehalten 3-HBZ bevatten (10). Daarom werd, met succes, getracht de methode zodanig te verbeteren, dat deze lagere gehalten ook bereikbaar waren. Vervolgens is een gedeelte van de hiervoor genoemde type eieren opnieuw onderzocht hetgeen gemiddelde gehalten variërend van 0.7 tot 1.1 mg 3-HBZ/kg opleverde. Deze resultaten zijn samengevat in tabel 1. De monsters waarvan om verschillende redenen geen nieuwe analyses konden worden uitgevoerd zullen wel worden besproken, maar zijn niet in de tabel opgenomen. Dit om te voorkomen, dat bij het beschouwen van de tabel alléén, verkeerde conclusies worden getrokken.

Uit de literatuur is bekend dat niet alleen in bebroede eieren, maar in alle eieren 3-HBZ voorkomt. Wil 3-HBZ een goede indicatie zijn om bebroede eieren in eiprodukten aan te tonen, dan is het van belang de gehalten in alle mogelijke eieren en eiprodukten te kennen. Tevens dient bekend te zijn wat de invloed is op het 3-HBZ gehalte van bepaalde handelingen zoals opslag bij verschillende temperaturen en verwerkingsmethoden.

Het gehalte 3-HBZ in consumptie-eieren is in dit onderzoek beschouwd als basis. Zowel voor batterij- als voor scharreleieren werd een gemiddelde 3-HBZ gehalte gevonden van 0.7 mg/kg (tabel 1), hetgeen in goede overeenstemming is met in de literatuur vermelde gaschromatografisch verkregen resultaten (10). De spreiding in het gehalte 3-HBZ in consumptie-eieren afkomstig van verschillende koppels is gelijk aan die na herhaalde analyse van één monster met een gehalte van 0.8 mg/kg. Hieruit volgt dat de spreiding in het gehalte in consumptie-eieren kleiner is dan de spreiding in de analyse.

De gehalten 3-HBZ in bevruchte en vervolgens bewaarde eieren zijn van dezelfde grootte orde als die in consumptie-eieren (tabel 1). Deze conclusie stemt overeen met die van Thomas en Stock (12) voor eieren bewaard bij 20-25<sup>0</sup>C. Bewaren van bevruchte eieren bij 30<sup>0</sup>C leidde volgens dezelfde onderzoekers reeds na 10 dagen tot een vertienvoudiging van het 3-HBZ gehalte.



Tabel 1 3-HBZ gehalte (in mg/kg vloeibaar heelei) in consumptie-eieren, bevruchte niet bebroede eieren, eiprodukten en bedorven eieren.

	n	$\bar{x}$	min.-max.
Consumptie-eieren : batterij	15	0.7	0.4 - 1.0
scharrel	5	0.7	0.4 - 1.0
Bevruchte niet bebroede eieren bewaard bij 20-25°C :	3	1.0	
6 dagen	3	1.0	
12 dagen	3	0.8	
18 dagen	3	1.1	
Eiprodukten :			
heeleipoeder	5	0.7	0.5 - 0.8
vloeibaar heelei met broedei*	15	29.6	6.0 - 120.3
Bedorven eieren	6	1.5	0.6 - 2.8

\*met 5-100% toegevoegd broedei

Koelhuisseieren, om in de inleiding van dit hoofdstuk genoemde redenen niet opgenomen in de tabel, vertoonden eveneens een gehalte 3-HBZ vergelijkbaar met dat van consumptie-eieren.

Eiprodukten: Wil een methode voor het aantonen van bebroede eieren in eiprodukten betrouwbaar zijn, dan mag geen enkele behandeling van de eieren aanleiding zijn voor afwijkende analyseresultaten. Om dit te controleren zijn monsters vloeibaar heelei en heeleipoeder onderzocht.

Van een serie van 24 monsters vloeibaar heelei, waarin volgens de fabrikanten geen broedeieren waren verwerkt, bevatten 18 monsters 3-HBZ gehalten van dezelfde grootte-orde als consumptie-eieren. De overige 6 monsters vertoonden gehalten 3-HBZ tot ca. 7.5 mg/kg. Op grond van de resultaten van het hier beschreven onderzoek lijkt het aannemelijk dat in de genoemde 6 monsters geringe hoeveelheden uitgeschouwde broedeieren zijn verwerkt. Ook de resultaten van deze monsters zijn om eerdergenoemde redenen niet opgenomen in tabel 1.

De vloeibaar heelei monsters waarin verschillende hoeveelheden (5-100%) uitgeschouwde heldere broedeieren waren verwerkt vertoonden een duidelijk verhoogd 3-HBZ gehalte.

In de geanalyseerde heeleipoeders werden geen verhoogde gehalten aangetroffen.

Ofschoon slechts een klein aantal gepasteuriseerde monsters beschikbaar was, mag, mede gezien de resultaten van Jones en Ellingworth (11), worden geconcludeerd, dat deze behandeling geen invloed heeft op het 3-HBZ gehalte.

Ter completering van het onderzoek naar het aantonen van bebroede eieren in eiprodukten via het gehalte aan 3-HBZ kwam de vraag aan de orde in welke mate het bedorven zijn van eieren ook een verhoogd gehalte kan geven.

Om deze vraag te beantwoorden is een aantal bedorven eieren bemonsterd. Hierbij werden consumptie-eieren gebruikt die spontaan en na inoculatie met *Bacillus cereus* en incubatie bij 30<sup>0</sup>C zijn bedorven. Het maximum gehalte 3-HBZ dat werd aangetroffen bedroeg 2.8 mg/kg (zie tabel 1), dat wil zeggen significant hoger dan in consumptie-eieren. Toch zal dit geen probleem opleveren voor het stellen van normen voor het 3-HBZ gehalte, daar bedorven eieren (ook) niet mogen worden verwerkt.

#### 4. Gehalten 3-HBZ in uitgeschouwde broedeieren

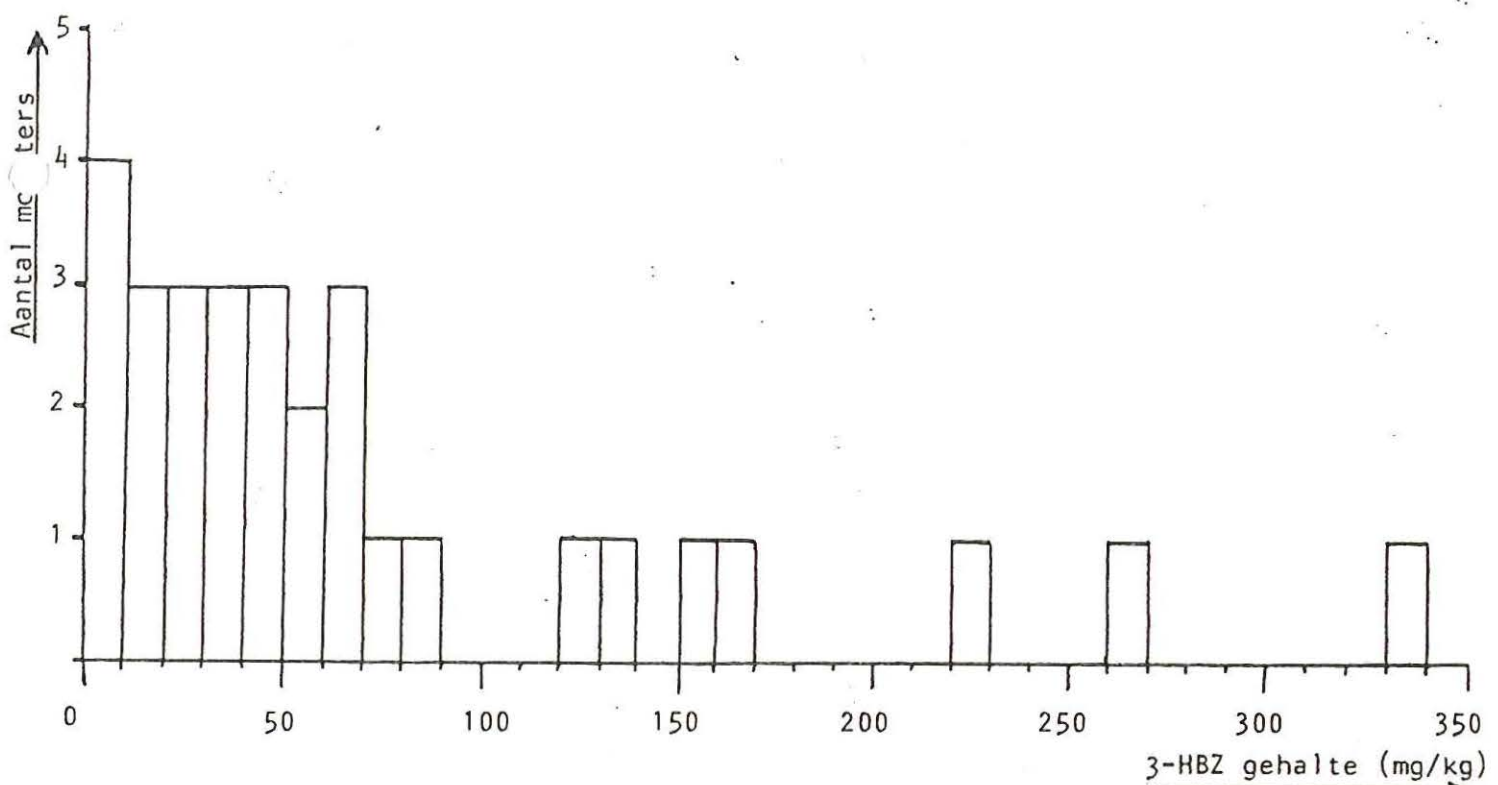
Het onderzoek richtte zich vervolgens op de gehalten 3-HBZ in op verschillende tijdstippen uitgeschouwde broedeieren. Daartoe zijn bij een aantal broederijen uitgeschouwde heldere broedeieren gehaald. Afhankelijk van de broederij werd meestal geschouwd tussen de 10e en 18e broeddag. Bij enkele broederijen werden monsters verkregen van 7 dagen bebroede heldere eieren. Elk monster bestond steeds uit 60 eieren. Deze werden op het Spelderholt nageschouwd en verdeeld in heldere, twijfelachtige en niet heldere eieren, om de wijze van schouwen op het 3-HBZ gehalte te beoordelen.

De categorie niet heldere eieren bestaat uit eieren die ten onrechte in het monster aanwezig zijn (schouwfouten). Over de definitie van de categorie twijfelachtig kan men van mening verschillen. Per monster is de helft van elke categorie apart uitgeslagen en, voor zover mogelijk, tot een drietal mengmonsters (helder, twijfelachtig, niet helder) verwerkt. De andere helften van de drie categorieën werden samengevoegd tot een totaal gemiddeld monster van de hele partij. De resultaten staan vermeld in tabel 2. Opvallend is de grote variatie in de 3-HBZ gehalten van de monsters, hetgeen moge blijken uit figuur 2. Tevens blijkt dat goed nageschouwen het 3-HBZ gehalte voor een partij eieren kan verlagen.

Voor de eieren geschouwd tussen de 7e en 18e dag blijft het gehalte 3-HBZ in de categorie helder met 29 mg/kg hoog. Verder valt op dat bij de twijfelachtige eieren uit de praktijk een hoger gehalte 3-HBZ wordt aangetroffen dan bij de niet heldere. Op de mogelijke oorzaken van dit verschijnsel wordt in hoofdstuk 5 nader ingegaan.

Tabel 2 3-HBZ gehalten in tussen de 7e en 18e dag uitgeschouwde eieren in mg/kg

	n	$\bar{x}$	min.-max.
Praktijk (gemiddeld)	30	76	1.5-338
Op COVP nageschouwd			
helder	30	29	0.7-143
twijfelachtig	28	242	10 -424
niet helder (afgestorven)	7	98	46 -214



Figuur 2 Frequentieverdeling van het 3-HBZ gehalte in praktijkmonsters uitgeschouwde broedeieren met een broedtijd van 7-18 dagen.

Omdat er in de praktijk weinig 6-daagse uitgeschouwde heldere eieren beschikbaar waren, zijn op het Spelderholt 19 groepen van elk 120 eieren, afkomstig uit de praktijk, ingelegd en na 6 dagen geschouwd. Ook hierbij is per groep eieren, voor zover mogelijk, een onderverdeling gemaakt in heldere, twijfelachtige en "afgestorven" eieren. De resultaten van de analyses van deze eieren staan in Tabel 3.

Tabel 3 3-HBZ gehalten in op de 6e dag uitgeschouwde eieren, in mg/kg

	n <sup>1)</sup>	k <sup>2)</sup>	$\bar{x}$	$\bar{x}$ (gew.) <sup>3)</sup>	min.-max.
Helder (H)	19	253	1.0	1.0	0.4 - 1.8
Twijfelachtig (T)	7	10	1.4	1.4	0.7 - 2.4
H + T	26	263	1.1	1.0	0.4 - 2.4
Afgestorven	18	53	10.2	9.7	2.9 - 41.4

1) aantal monsters, 2) aantal eieren, 3) gewogen gemiddelde

De gedurende 6 dagen bebroede heldere eieren vertoonden na analyse een 3-HBZ gehalte van gemiddeld 1.0 mg/kg (gewogen gemiddelde eveneens 1.0 mg/kg. De eieren van de categorie "twijfelachtig" zullen in de praktijk, ten minste voor een deel, bij de heldere terecht komen. Daarom is het zinvol de categorieën helder en twijfelachtig als één groep te beschouwen.

Voor de in de tabel opgenomen resultaten heeft dit slechts tot gevolg dat alleen het rekenkundige gemiddelde enigszins wordt verhoogd (gaat van 1.0 naar 1.1 mg/kg). Voor het gewogen gemiddelde maakt het niet uit dat de resultaten van H en T worden samengevoegd. Binnen de categorie twijfelachtig werd voor één monster (bestaande uit één ei) een 3-HBZ gehalte gevonden van 19.1 mg/kg. Een duplo-bepaling van dit monster was niet mogelijk, omdat er onvoldoende materiaal over was. Daarom kon niet worden nagegaan of deze uitbijter, volgens welke toets dan ook, het gevolg was van een vergissing tijdens het schouwen of een analysefout.

Daar bij controle in de praktijk nooit een enkel ei zal worden geanalyseerd, maar een mengmonster van een "goede steekproef", zal een enkele vergissing bij het schouwen geen probleem opleveren zoals blijkt uit het gewogen gemiddelde, dat op 1.1 mg/kg komt indien de waarde 19.1 mg/kg wordt meegenomen in de berekening.

Een exacte berekening van de spreiding over verschillende monsters is niet mogelijk, vanwege de ongelijke verdeling van de eieren in de monsters. De gemiddelde analysespreiding van de methode zelf over het traject van 0 - 5 mg/kg is 0.33 mg/kg (15).

Op grond van de in dit onderzoek gebruikte eieren levert een schatting van de standaardafwijking een waarde op van 0.36 mg/kg voor heldere 6-daagse eieren. Tabel 4 geeft een overzicht van de geschatte (gewogen) standaardafwijkingen en enige éézijdige overschrijdingswaarden.

Tabel 4 *Gewogen gemiddelden, standaardafwijkingen en de overschrijdingswaarden met bepaalde betrouwbaarheid (éénzijdig) in mg 3-HBZ/kg van de in tabel 3 genoemde heldere en twijfelachtige eieren*

	$\bar{x}$ (gew.)	s(gew.)	overschrijdingswaarden	
			5%	1%
Helder	1.0	0.36	1.6	1.9
H + T	1.0	0.37	1.6	1.9

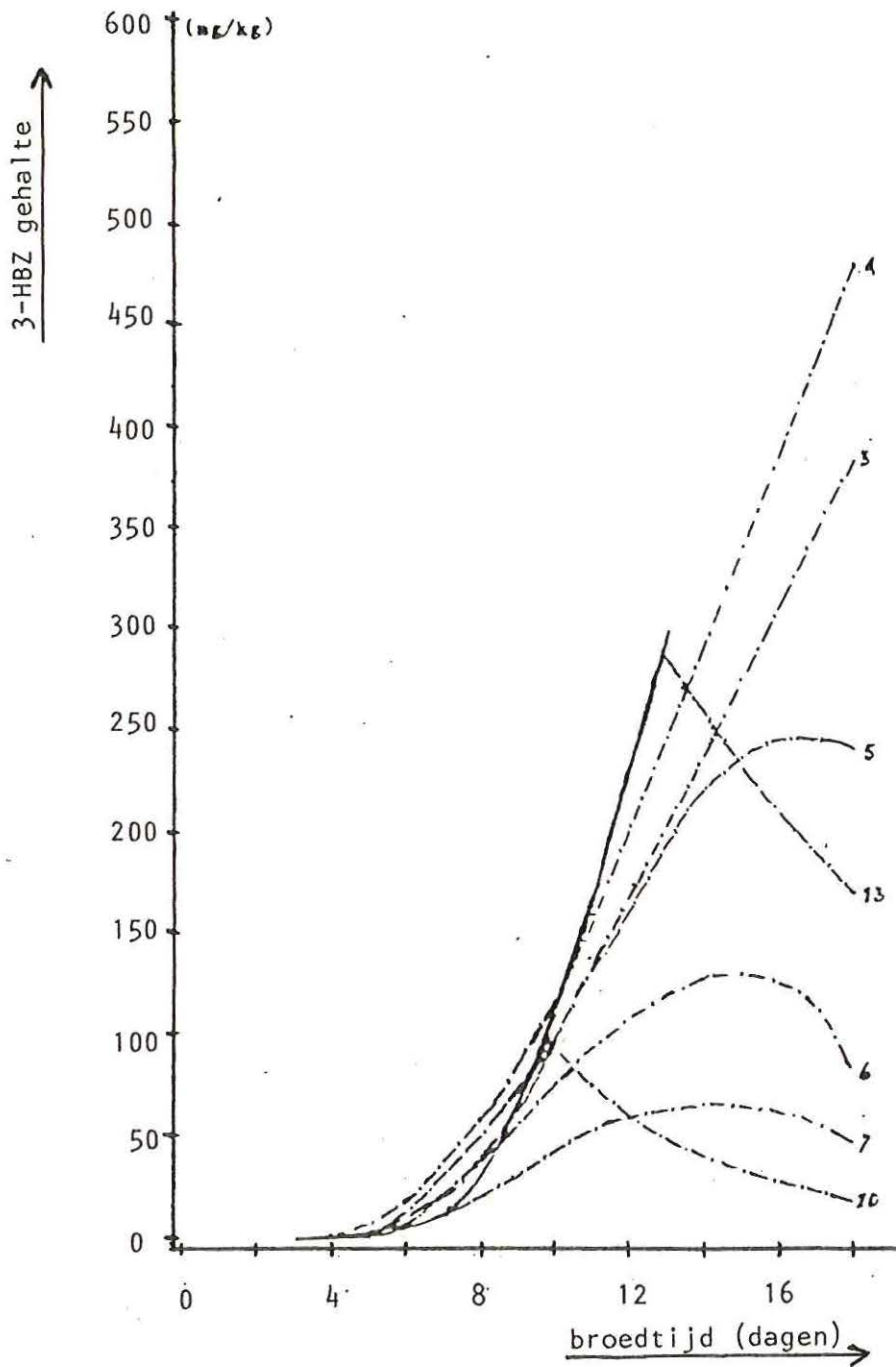
#### 5. Effect van het tijdstip van afsterven van de kiem op het 3-HBZ gehalte

Voor het verkrijgen van enig inzicht in het verloop van het gehalte 3-HBZ in eieren tijdens het broedproces en voor het vinden van een verklaring voor het hoge gehalte 3-HBZ in de "twijfelachtige" eieren van de praktijkmonsters, is een experiment uitgevoerd waarbij de kiemen kunstmatig werden gedood en de eieren vervolgens verder werden bebroed. Van de levende kiemen werd het 3-HBZ gehalte in een mengmonster van 15 eieren vastgesteld op de broeddagen 1, 4, 7, 10 en 13. Op elk van deze dagen werd een aantal eieren afgekoeld tot 0°C, gedurende enkele uren bij deze temperatuur opgeslagen en vervolgens teruggeplaatst in de broedmachine. De eieren behandeld op dag 1 werden bemonsterd op de dagen 4, 7, 10, 13 en 18; de eieren behandeld op dag 4 werden bemonsterd op de dagen 7, 10, 13 en 18; etc. Telkens werd een mengmonster van ca. 15 eieren van elke categorie samengesteld. De resultaten van deze proef staan weergegeven in figuur 3. De koude behandeling op dag 1 had een niet voldoende kiemdodend effect. Slechts enkele eieren vertoonden bij voortgezet broedproces geen groei.

Deze eieren kunnen een afgestorven kiem bevatten, maar het is ook mogelijk dat het onbevuchte eieren zijn geweest of eieren waarvan de kiem reeds was afgestorven. Eieren waarvan de kiem op dag 4 werd gedood vertoonden een exponentiële toename van 3-HBZ, aanvankelijk zelfs groter dan bij "levende" eieren. Behandeling op dag 7 gaf nog slechts een geringe stijging in 3-HBZ gehalte en de op de dagen 10 en 13 behandelde eieren laten een daling in 3-HBZ gehalte zien bij voortgezet broedproces.

Gedeeltelijke herhaling van het experiment, waarbij de eieren werden behandeld op dag 3, 4, 5 en 6 bevestigden het beeld verkregen in het eerste experiment, nl. dat de stijging in 3-HBZ gehalten bij het afsterven van de kiem op dag 4 het grootst is. Dit verschijnsel, ook waargenomen door Salwin etal. (6), verklaart het hoge gehalte 3-HBZ in lang bebroede eieren van de categorie "twijfelachtig" in vergelijking met de niet heldere (zie hoofdstuk 4). De laatste categorie bevat vermoedelijk een groot percentage eieren dat later in het broedproces is afgestorven, en vertoont daardoor lagere 3-HBZ gehalten.

Het significante verschil (Wilcoxon-toets) in 3-HBZ gehalte tussen de 6-daagse heldere eieren en de consumptie-eieren (1.0 vs. 0.7 mg/kg) wordt veroorzaakt doordat er tussen de heldere eieren zich exemplaren bevinden, waarvan de kiem vóór de 4e dag is afgestorven en 3-HBZ is gaan produceren.



Figuur 3 Invloed van het tijdstip van afsterven op het verloop van het 3-HBZ gehalte. De cijfers bij de curven geven de dag van de koude behandeling aan.

-.-.-.-.- 3-HBZ gehalte na koude behandeling  
———— 3-HBZ gehalte in "levende" broedeieren

## 6. Conclusies

- Zowel de enzymatische als de gaschromatografische methode is geschikt gebleken voor het bepalen van 3-HBZ. De onderste detectiegrens van de enzymatische methode is ca. 0.5 mg/kg, die van de gaschromatografische is lager dan 0.1 mg/kg.
- Er is geen onderscheid aantoonbaar in het 3-HBZ gehalte van consumptie-eieren van verschillende koppels. De totale spreiding in het 3-HBZ gehalte voor monsters van verschillende koppels ligt in dezelfde grootteorde als die van de analyse.
- Het is niet mogelijk op grond van uitwendig schouwen onderscheid te maken, zoals de wet vereist, tussen bevruchte en onbevruchte heldere eieren.
- Het 3-HBZ gehalte in eieren welke gedurende langer dan 6 dagen zijn bebroed, is, ook na zeer zorgvuldig schouwen, erg hoog vergeleken bij consumptie-eieren (ca. 30 tegen ca. 0,7 mg/kg).
- De 6 dagen bebroede eieren in dit onderzoek bevatten, na verwijdering van de monsters met zichtbare afgestorven kiemen, een gewogen gemiddeld gehalte van 1.0 mg/kg 3-HBZ met een grenswaarde van 1.6 ( $p < 0.05$ ) en 1.9 ( $p < 0.01$ ).
- Het hoge gehalte 3-HBZ in langer dan 6 dagen bebroede eieren van de categorie "twijfelachtig", kan worden verklaard uit het moment van afsterven van de kiem. De hoogste gehalten worden gevonden in eieren, waarvan de kiem op de vierde broeddag is afgestorven. Omdat het niet mogelijk is door middel van schouwen onderscheid te maken tussen langer dan 6 dagen bebroede, heldere, vroegtijdig afgestorven eieren en onbevruchte eieren, kunnen zeer hoge gehalten 3-HBZ voorkomen in met dergelijke te lang bebroede eieren bereide ei producten.
- Indien in monsters een lager gehalte 3-HBZ wordt gevonden dan 2-3 mg/kg is dat géén garantie dat de eieren niet langer dan 6 dagen zijn bebroed. Indien het gehalte hoger ligt dan 2-3 mg/kg dan zijn er òf niet heldere 6-daagse bebroede eieren òf langer dan 6 dagen bebroede eieren verwerkt.
- Het opslaan van bevruchte eieren bij temperaturen hoger dan 25<sup>0</sup>C leidt tot een verhoogd 3-HBZ gehalte (12). Bewaring van bevruchte eieren bij een temperatuur lager dan 25<sup>0</sup>C en van consumptie-eieren in het algemeen en bewerkingsprocedures hebben geen invloed op het 3-HBZ gehalte.



## 7. Literatuur

1. EEG-verordening nr. 2772/75 van de Raad van 29 oktober 1975
2. PBO-voorschrift E-5b, art. 1 en 6, lid 2 en 9
3. Csuka, J., Nový, J. en Jiřosová, Z., Br. Poult. Sci., 14(1973)203
4. Harwalkar, V.R., J. Inst. Can. Technol. Aliment., 1 (1968) 150
5. Cattaneo, P., Neri, M. en Cantoni, C., Indust.Aliment., 18(1979)31
6. Salwin, H., Staruszkiewicz jr., W.F. en Bond, J.F., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 55(1972)458
7. Staruszkiewicz jr., W.F., Bond, J.F. en Salwin, H., J. Chromatogr. 51(1970)423
8. Staruszkiewicz jr., W.F. en Starling, M.K., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 54(1971) 773
9. Robinson, D.S., Barnes, E.M. en Taylor, J., J.Sci.Food Agric., 26(1975)91
10. Heaney, R.K. en Curtis, R.F., J. Sci. Food Agric., 27(1976)1057
11. Jones, J.M. en Ellingworth, C.E., J.Fd.Technol., 14(1979)199
12. Thomas, N.L. en Stock, S.W., J.Fd.Technol., 17(1982)649
13. Littmann, S., Schulte, E. en Acker, L., Z. Lebensm. Unters.Forsch., 175(1982)101
14. Parry, A.E.J., Robinson, D.S. en Wedzicha, B.L., J.Sci.Food Agric., 31(1980)905
15. Elenbaas, H.L., Haasnoot, W., Muuse, B.G., Rutjes, B., Stouten, P., Steverink, A.T.G. en Uijttenboogaart, Th.G., te publiceren in: J.Agric. Food Chem., 1985
16. Haasnoot, W., Stouten, P. en Elenbaas, H.L., De Ware(n)-Chemicus 14(1984)40
17. Uijttenboogaart, Th.G., Steverink, A.T.G., Elenbaas, H.L., Haasnoot, W., Muuse, B.G., Rutjes, B. en Stouten, P., te publiceren in J. Agric. Food Chem., 1985.