

Afdeling Additieven 1982-03-16
Verslag 82.27 pr.nr. 505.0200

Onderwerp: Ontwikkeling methode voor de
kwantitatieve bepaling van benzoëzuur en
sorbinezuur in (vlees) salades.

Verzendlijst: directeur, sectorchef (3x), De Ruig, afd. Additieven,
afd. Contaminanten, afd. Diergeneesmiddelen, afd. Zware
Metalen, Hollman, normalisatie (Humme), projektbeheer,
circulatie PVS, direktie VKA

Afdeling Additieven

Datum: 1982-03-16

Pr.nr. 505.0200

VERSLAG 82.27

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diverse additieven.

Onderwerp: Ontwikkeling methode voor de kwantitatieve bepaling van benzoëzuur en sorbinezuur in (vlees)salades.

Bijlagen: 1. Intern analysevoorschrift G 124.

Doel:

Ontwikkeling van een analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van conserveermiddelen in sterk emulsievormende produkten.

Samenvatting:

Er wordt een methode beschreven voor de bepaling van benzoëzuur en sorbinezuur in sterk emulsievormende produkten, bestaande uit een voorbereiding m.b.v. Extrelut kolommen van de Fa. Merck, gevolgd door hogedrukvlloeistofchromatografische scheiding m.b.v. een reversed phase systeem.

Conclusie:

De methode is snel en zeer geschikt voor analyse van benzoëzuur en sorbinezuur in sterk emulsievormende produkten. Door geringe aanpassingen is de methode tevens geschikt te maken voor de bepaling van andere conserveermiddelen en voor de analyse van conserveermiddelen in andere produkten.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

R

Medewerkers/Samenstellers: J.J. van Oostrom, T.D.B. van der Struijs

Projectleider: dr W.G. de Ruig

TS
vD

Inleiding

Door de industrie wordt veelal benzoëzuur en sorbinezuur toegepast als conserveermiddel.

De analyse van deze conserveermiddelen in salades is ruwweg te splitsen in twee gedeelten, te weten

- a. extractie uit de matrix en
- b. kwantificeren van de te bepalen componenten.

De eerste stap geschiedt veelal met behulp van een Soxhlet apparaat of door gebruik te maken van scheitrechters.

Vooraf bij ingewikkelde matrices als salades leidt dit tot bijzonder tijdrovende methoden, dit niet in de laatste plaats door de aanwezigheid van emulgatoren en het ten gevolge hiervan optreden van emulsies. Voor deze tijdrovende extractieprocedure bestaat echter een alternatief, namelijk het gebruik van wegwerp Extrelut kolommen (Merck, Darmstadt B.R.D.) welke de isolatie van organische stoffen vooral bij het werken met gecompliceerde matrices enorm kunnen vereenvoudigen. Deze werkwijze wordt op grote schaal toegepast in de klinische chemie, maar heeft ook zijn intrede gedaan in de voedingsmiddelen chemie.

De tweede stap, de kwantitatieve bepaling van geëxtraheerde stoffen kan zowel chromatografisch als spectrofotometrisch geschieden. Van deze methoden geniet de hogedrukvlloeistofchromatografische methode de voorkeur, daar deze methode niet gepaard hoeft te gaan met derivatiseren (GLC). Terwijl de storing van de in het U.V. absorberende overige componenten voorkomen wordt door chromatografische scheiding. Bovenstaande overwegingen hebben geleid tot de ontwikkeling van een methode bestaande uit extractie met behulp van Extrelut kolommen gevolgd door hogedrukvlloeistofchromatografische bepaling van benzoëzuur en sorbinezuur waardoor de tot op heden gebruikte zeer bewerkelijke methode vervangen wordt door deze minder bewerkelijke en meer reproduceerbare methode.

Werkwijze

Zie voor de gevolgde werkwijze intern voorschrift G 124. Bepaling van benzoëzuur en sorbinezuur in (vlees)salades (HPLC-methode) (bijlage 1).

Resultaten extractie

Er wordt een overzicht gegeven van parameters welke de recovery beïnvloeden.

In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de recovery van benzoëzuur en sorbinezuur na extractie m.b.v. Extrelut kolommen.

Tabel 1

Monster	Recovery (%)	
	<u>Benzoëzuur</u>	<u>Sorbinezuur</u>
Vette salade	101	102
Normale salade	98	99
Droge salade	107	103
Standaard opl.	99	97

In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de recovery van benzoëzuur en sorbinezuur na elutie met verschillende hoeveelheden extractievloeistof.

Tabel 2

Extractie- vloeistof	Recovery (%)	
	<u>Benzoëzuur</u>	<u>Sorbinezuur</u>
50 ml	96,8	94,1
100 ml	100,0	100,0
150 ml	100,0	100,0
200 ml	100,0	100,0
250 ml	100,0	100,0
300 ml	100,0	100,0

Conclusies met betrekking tot de extractie:

Extrelut kolommen zijn uitstekend bruikbaar voor de extractie van benzoëzuur en sorbinezuur uit salades. De extractie is relatief weinig arbeidsintensief en kan vermoedelijk met geringe aanpassingen bruikbaar gemaakt worden voor de bepaling van benzoëzuur en sorbinezuur in tal van andere producten.

Hogedrukvloeistofchromatografische scheiding

In vergelijking tot de momenteel bij het RIKILT in gebruik zijnde kwantitatieve bepalingsmethoden voor benzoëzuur en sorbinezuur is de hogedrukvloeistofchromatografie relatief eenvoudig uit te voeren. In tegenstelling tot andere methoden kan deze methode na geringe aanpassing (andere golflengte voor de detectie) tevens gebruikt worden voor de kwantitatieve bepaling van mierzuur, propionzuur en p-hydroxybenzoëzuur.

Daar voor de analyse noch gebruik gemaakt wordt van gradiëntelutie, noch van verhoogde kolomtemperaturen kan volstaan worden met een zeer eenvoudige chromatografische opstelling.

Het gebruik van een gebufferde elutievloeistof voorkomt de dissociatie van de vrije zuren en draagt zorg voor een goed gedefinieerd elutiepatroon.

Literatuur

Leuenberger U et al.

Determination of Food Preservatives and saccharin by High-Performance Liquid Chromatography.

J. of Chromatography, 173 (1979) 343-348.

Hild J. und Gertz C.

Möglichkeiten der analytischen Erfassung von Konservierungsstoffen in Lebensmitteln.

II Gaschromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie T.A.B.S. Verfahren.

ZLUF 170 (1980) 110-114.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT G 124

1e oplage (1982-03-03)

BEPALING VAN BENZOEZUUR EN SORBINEZUUR IN (VLEES)SALADES
(HPLC-METHODE)

Verzendlijst: afd. Normalisatie/harmonisatie, Bibliotheek (15x),
Buizer, afd. Additieven (5x), Buizer, Tuinstra, Van der
Veen, Hollman, Herstel

Bepaling van benzoëzuur en sorbinezuur in (vlees)salades
(HPLC-methode)

1. Doel

Deze methode beschrijft de isolatie, de hoge druk vloeistofchromatografische scheiding en spectrofotometrische detectie van benzoëzuur en sorbinezuur in (vlees)salades.

2. Toepassinggebied

De beschreven methode van onderzoek is toepasbaar op de onder 1. genoemde produkten. Per conserveermiddel zijn gehalten > 1 mg/kg produkt aantoonbaar en kwantificeerbaar.

3. Beginssel

Het produkt wordt gehomogeniseerd en verdund. Door het toevoegen van zwavelzuur worden de conserveermiddelen in hun vrije zuurvorm gebracht. Een aliquot van het monster wordt op een Extrelut kolom gebracht. De conserveermiddelen worden van de kolom geextraheerd. Het extract wordt drooggedampt, waarna het residu wordt opgelost in de loopvloeistof. Een deel van deze oplossing wordt hogedruk vloeistofchromatografisch gescheiden op een reversed phase kolom en de conserveermiddelen worden spectrofotometrisch gedetecteerd bij een golflengte van 232 nm.

4. Definitie

Benzoëzuur en sorbinezuur zijn voedingsmiddelenadditieven en worden toegepast als conserveermiddelen.

5 Reagentia

Alle reagentia dienen van zodanige kwaliteit te zijn dat geen interferenties voorkomen.

5.1 Benzoezuur (p.a.)

5.1.1 Standaardoplossing benzoezuur van 25-1000 mg per liter, in loopvloeistof (5.11)

5.2 Sorbinezuur (p.a.)

5.2.2 Standaardoplossing sorbinezuur van 25-1000 mg per liter, in loopvloeistof (5.11)

5.3 Chloroform (p.a.)

5.4 2-Propanol (p.a.)

5.5 Extractie vloeistof

90% chloroform (5.3) (v/v)

10% 2-propanol (5.4) (v/v)

5.6 Zwavelzuur (p.a.)

5.6.1 Zwavelzuur 0,25 M 14 ml zwavelzuur (5.6) verdunnen tot 1000 ml met water

5.7 Extrelut kolommen (Merck diagnostica)

5.7.1 Glaswol

5.7.2 Extrelut navullingen (Merck diagnostica)

5.8 Acetonitril (Lichrosorb)

5.9 Ammoniumacetaat (p.a.)

5.10 Azijzuur (p.a.)

5.11 Loopvloeistof

80% water (v/v)

20% acetonitril (5.8) (v/v)

0,39 g ammoniumacetaat (5.9) per liter. Breng dit mengsel met behulp van azijnzuur (5.10) op pH 4.4

5.12 Methanol (techn.)

N.B. Gebruik gedeïoniseerd water (6.7) of water van ten minste gelijke zuiverheid.

6. Apparatuur

6.1 Sorvall omnimixer met toebehoren

6.2 Rotavapor

6.3 Vacuumpomp

6.4 Koelwaterbad, bij een temperatuur van -10°C .

6.5 Ultrasoon bad

6.6 Vloeistofchromatograaf

6.6.1 Vloeistofleveringssysteem

6.6.2 Vloeistofinjectionkran

6.6.3 Voorkolom lengte 25 mm doorsnede 4 mm gevuld met Merck Perisorb RP 18 30 μm .

6.6.4 Analytische kolom lengte 250 mm doorsnede 4 mm gevuld met Merck Lichrosorb RP 18 5 μm .

6.6.5 Spectrofotometer met doorstroomcel

6.6.6 Recorder

6.7 Milli Q. reagent. Grade Water Systems (Millipore)

N.B. Het noemen van merknamen dient uitsluitend ter identificatie.

7. Werkwijze

7.1 Monstervoorbereiding. Homogeniseer het monster met behulp van een Sorvall omnimixer (6.1) bij 3000 r.p.m. gedurende 2 minuten. Weeg af in een omnimixerbuis 5.00 g gehomogeniseerd monster, voeg toe 50 ml 0,25 M zwavelzuur (5.6.1) en meng gedurende 3 minuten bij 3000 r.p.m. met behulp van een sorval omnimixer (6.1); breng de inhoud van de buis kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, vul aan met water tot de maatstreep en meng. Breng 20 ml van deze oplossing op een Extrelut kolom (5.7) en laat de oplossing gedurende 15 minuten absorberen aan het kolommateriaal. Extraheer met 100 ml extractievloeistof (5.5) en vang het extract op in een rondbodemkolf van 250 ml. Damp het extract in onder verminderde druk m.b.v. een rotavapor (6.2) bij 30°C tot ca. 5 ml. Neem de kolf van de rotavapor en droog de kolfinhoud bij kamertemperatuur onder een stikstofstroom. Los het residu op m.b.v. een ultrasoonbad (6.5) in 10 ml loopvloeistof (5.11).

7.2 Vloeistofchromatografie

Chromatografische condities

Loopvloeistof (5.11)

vloeistofsnelheid 1,0 ml per minuut

recorder 10 mV, 120 mm/uur

detector 232 nm, 0,1 Aufs (absorbance units full scale) - 0,01 Aufs.

Injecteer 50 µl van de volgens 7.1 verkregen oplossing en vergelijk retentietijden en piekhoogten (of piekoppervlakten) met die van de standaardoplossingen (5.1.1 en 5.2.1). Bereken hieruit de hoeveelheid benzoëzuur en/of sorbinezuur in het monster

8. Opmerkingen

1. Neem per serie monsters tevens een standaardmonster in bewerking ter controle van het terugvindingspercentage bij de voorbehandeling van het monster.

2. Verdun deze standaard met 0,125 M zwavelzuur en laat het evenwicht tussen zout- en zuurvorm van de conserveermiddelen zich gedurende 10 minuten instellen.
3. Vervang het bovenfilter van de Extrelut kolom (5.7) door glaswol.
4. Bereiding standaardoplossingen:
Los op 200 mg sorbinezuur of 200 mg benzoëzuur in enkele ml water onder toevoeging van ca. 0,2 g natriumhydroxide. Spoel over in een maatkolf van 100 ml en vul aan tot de maatstreep. Bereid uit deze stookoplossing de onder 5.1.1 en 5.2.2 vermelde standaardoplossingen.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

DR

Medewerkers/Samenstellers: J.J. van Oostrom en T.D.B. van der Struijs

vd

TS