

Afd.Vlees en Vleesprodukten 1982-10-18

VERSLAG 82.79 Pr.nr. 505.7010

Onderwerp: Spectrum en stabiliteit van
fosfomolybdeenblauw bij re-
ductie met ascorbinezuur.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd. Vlees en
Vleesprodukten (4x), afd. Normalisatie (Humme), afd.
Projektadministratie, Projektleider (Elenbaas).

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van vleesvreemde eiwitten.

Onderwerp: Spectrum en stabiliteit van fosfomolybdeenblauw bij reductie met ascorbinezuur

Doel:

Het verkrijgen van een goede kleuringsmethode voor het bepalen van fosfaat t.b.v. een analysevoorschrift voor fytaat in vleeswaren, dat door de werkgroep MOVE wordt ontwikkeld.

Samenvatting:

Het kleurcomplex fosfomolybdeenblauw, gevormd uit fosfaat met het kleurreagens molybdaat-antimoontartraat-ascorbinezuur is vergeleken met het klassiek verkregen complex; fosfaat met molybdaat-hydrazinesulfaat. De vergelijking is beperkt gebleven tot het spectrum en de stabiliteit van de kleur.

Conclusie:

1. Absorptiemaximum ligt bij de ascorbinezuurmethode niet bij 900 nm maar bij 882 nm.
2. Spectrofotometers die niet hoger kunnen meten dan 800 nm kunnen de absorptie bij zowel de hydrazinemethode als de ascorbinezuurmethode bij andere golflengten meten. Zie figuur 1,2 en figuur 3,4.
3. Grote verschillen tussen beide methoden zijn er niet wat betreft de nauwkeurigheid, maar wat de praktische uitvoering aangaat, verdient de ascorbinezuurmethode duidelijk de voorkeur.

Verantwoordelijk: drs H.L. Elenbaas

Samenstellers: P. Stouten, drs H.L. Elenbaas

Medewerker: P. Stouten

Projectleider: drs H.L. Elenbaas

Inleiding

De werkgroep Methoden Onderzoek Vleesvreemde Eiwitten wil een methode voorstellen voor de bepaling van soja-eiwit in vleesprodukten aan de hand van het gehalte aan fytine (1). De hoeveelheid fosfaat zal fotometrisch worden gemeten volgens een gemodificeerde methode van Edwards, Molof en Schneeman (2).

Het fosfaat reageert met het kleurreagens ammoniummolybdaat-kallumantimoontartraat tot fosfomolybdeenzuur, dat na reductie met ascorbinezuur overgaat in fosfomolybdeenblauw. De absorptie wordt gemeten bij 900 nm. Dit lijkt ons wat ongelukkig gekozen golflengte vooral voor laboratoria die niet in het bezit zijn van een spectrofotometer welke tot 900 nm kan meten.

Voor het vaststellen van de absorptiemaxima bij lagere golflengten is het absorptiespectrum opgenomen.

Deze kleurmethode, de ascorbinezuurmethode (1), is verder onderzocht op kleurstabiliteit en vergeleken met de klassieke kleurmethode van fosfaat, waarbij het fosfomolybdeenzuur wordt gereduceerd met hydrazine: de hydrazinemethode (3).

Werkwijze

Bij het onderzoek is uitgegaan van standaard fosfaatoplossingen, de onderstaande beschrijvingen slaan op de kleuring van deze oplossingen.

A. De Hydrazinemethode (3) FMB.A:

1. Verdun 10 ml van de standaardfosfaatoplossing (100 $\mu\text{g } \underline{\text{P}}^*/\text{ml}$) met water in een maatkolf van 100 ml.
2. Pipetteer 3 ml in een maatkolf van 50 ml, breng het volume op ca. 25 ml.
3. Voeg toe 20 ml molybdaat-hydrazinereagens toe vul aan met water en meng.
4. Plaats de kolf gedurende 15 min in een kokend waterbad. Koel af tot kamertemperatuur.
5. Meet de extinctie binnen 1 uur tegen een blanco bij 820 nm.

Het molybdaat-hydrazinereagens: Meng onmiddellijk voor het gebruik 125 ml van de natriummolybdaatoplossing (25 g/l zwavelzuur 10 N), met 50 ml van de hydrazinesulfaatoplossing (1,5 g/l). Vul aan tot 500 ml. De gebruikte standaardoplossing heeft een concentratie van 30 $\mu\text{g } \underline{\text{P}}/50 \text{ ml}$.

* $\underline{\text{P}} = \text{PO}_4^{3-}$.

B. De ascorbinezuurmethode (1) FMB-B:

1. Pipetteer 3 ml van de standaardfosfaatoplossing (20 $\mu\text{g P/ml}$) in een maatkolf van 50 ml.*
2. Breng met water het volume op ca. 30 ml.
3. Voeg met behulp van een pipet 8 ml werkkleurreagens (0,53 g L(+) ascorbinezuur per 100 ml voorraadkleurreagens**, dagelijks vers bereid) toe, vul aan en meng.
4. Laat de oplossing 10 min staan bij kamertemperatuur.
5. Meet de absorptie van de oplossing bij een golflengte van 900 nm t.o.v. water (blanco).

* De gebruikte standaardfosfaatoplossing heeft een concentratie van 60 $\mu\text{g P/50 ml}$.

** De voorraadkleurreagens:

Los op 6 g ammoniummolybdaat en 0,137 g kaliumantimoontratraat in 400 ml water. Voeg toe 500 ml H_2SO_4 -oplossing (2,5 mol/l) en meng. Verdun tot 1 l met water en meng opnieuw.

C. Absorptiespectra:

Direct na het bereiden zijn van de beide gekleurde fosfaat-oplossingen het spectrum opgenomen van 900-500 nm met behulp van de Beckman DU-8 spectrofotometer. Na 1 uur is opnieuw het spectrum opgenomen, dit leverde geen verschillen op, overeenkomstig de literatuur (2,4).

D. Kleurstabiliteit:

Bij de FMB-A methode werd bij de 1ste meting 4 gekleurde fosfaatoplossingen genomen, bij de 2de meting 3 gekleurde fosfaatoplossingen.

Bij de FMB-B methode werden voor zowel de 1ste keer als de 2de keer 4 gekleurde fosfaatoplossingen genomen.

Van deze oplossingen werd de absorptie gemeten na resp. 0, 15, 30, 45 en 60 min bij 820 resp. 900 nm (zie grafieken 7 en 8).

Resultaten en Discussie:

Absorptiespectra

De absorptiespectra van fosfomolybdeenblauw volgens de FMB-A methode en volgens de FMB-B methode zijn weergegeven in de fig. 1 en 2 resp. 3 en 4.

Het spectrum volgens de FMB-A methode heeft een absorptiemaximum, dat bij 820 nm ligt. Metingen bij deze methode kunnen ook eventueel plaatsvinden bij resp. 675 tot 625 nm. Maar de absorptie hierbij is wel 2 keer zo laag.

Het spectrum van de FMB-B methode is in twee keer opgenomen: van 900 tot 850 nm en van 850 tot 500 nm (fig. 3 en 4), omdat n.l. bij 900 nm het meten problemen geeft. Waarschijnlijk te grote energiever verschillen rond om de 900 nm maken dat metingen bij deze golflengte niet betrouwbaar zijn (fig. 5).

Neemt men het spectrum over het gehele gebied, dan vertoont dit spectrum afwijkingen met dat volgens de literatuur (2, 4).

Wanneer het spectrum in twee keer opgenomen is, heeft het absorptie maxima bij 715 en 882 nm overeenkomstig de literatuur (2, 4) en niet bij 900 nm zoals het voorschrift (1) aangeeft. Ter controle hebben we apart metingen uitgevoerd bij 882 en 900 nm. De absorptie bij 882 nm was hoger dan bij 900 nm (tabel I).

De kleur van zowel FMB-A als van FMB-B is over het gehele gebied gedurende één uur constant gebleven. De absorptie van de FMB-B methode is:

$$\frac{30}{60} \times \frac{0,210}{0,524} = 5 \times \text{kleiner dan die van de FMB-A methode.}$$

Statistische berekeningen:

Volgens de variantie analyse is de V_{res} en V_{tijd} voor de FMB-A methode iets hoger dan voor de FMB-B methode. Bij de V_{serie} is het omgekeerde het geval (zie Tabel II en III).

De spreiding tussen de series is groter dan de spreiding binnen de series bij beide methoden.

De verschillen blijken vrij gering te zijn en we kunnen niet zeggen dat de ene methode nauwkeuriger is dan de andere voor de standaardoplossingen.

Hydrazinemethode:

Voordelen	Nadelen
A. Stabiel spectrum; geen invloed op metingen bij 820 nm	Bij gebruik van kunststof- cuvetten ontstaat na ca. 4 min gasontwikkeling
B. Groot mol.abs. coëfficiënt bij 820 nm	Kleurontwikkeling d.m.v. 15 min in kokend waterbad (dus niet zo geschikt voor automatisering)

Ascorbinezuurmethode:

Voordelen	Nadelen
A. Werkt bijzonder fijn: eenvoudig en snel	Metingen zoals aangegeven in de literatuur (900 nm) zijn niet te vertrouwen (wel bij 882 nm)
B. Geen gasontwikkeling	Klein mol.abs. coëfficiënt, niet zo geschikt voor metingen van lage concentraties fosfor
C. Geen kokend waterbad voor kleurontwikkeling, geschikt voor grote series en auto- matisering	

Conclusies:

1. Bij de ascorbinezuurmethode ligt het absorptiemaximum voor fosfomolybdeenblauw bij 882 nm.
2. Bij gebruik van spectrofotometers die niet hoger kunnen meten dan bij 800 nm, kan de kleurintensiteit van fosfomolybdeenblauw gemeten worden bij 675 tot 625 nm bij de hydrazinemethode en bij 700 tot 725 nm bij de ascorbinezuurmethode.
3. Na afweging van de voor- en nadelen is gebleken, dat de hydrazinemethode het meest voldoet en betrouwbaar is, vergeleken met de ascorbinezuurmethode met metingen bij 900 nm. Wanneer echter bij de ascorbinezuurmethode bij 882 nm of 715 nm gemeten wordt, dan geniet deze methode voor niet te lage fosforconcentraties de voorkeur boven de hydrazinemethode.

Met dank aan:

S. Werdmuller voor haar verwerking van de statistische gegevens en J. van Trijp voor het behulpzaam zijn met het verwerken van enige gegevens op de computer.

Literatuur

1. Concept voorschrift, Werkgroep Methodeonderzoek vleesvreemde eiwit-
ten (MOVE) 1982.
De bepaling van soja-eiwit in vleesprodukten door middel van het
fytaatgehalte.
2. Edwards, G.P., Molof, A.H. and Schneeman, R.W.
"Determination of orthophosphate in fresh and saline waters".
Jour. Am. Wat. Wks. Assoc., 57 : 917, . 1965.
3. Intern Analysevoorschrift nr. 62001.
Vlees, bepaling van het gehalte aan plantaardig soja-eiwit door
middel van het fytaatgehalte.
4. Murphy, J., and Riley, J.P.
"A modified single solution method for the determination of
phosphate in natural waters".
Anal. Chim. Acta, 27 : 31, 1962.

Fig 1

SCAN 00 900.0NM TO 500.0NM
INTERVAL TIME 0000 MIN
SLIT 02
READ AVERAGE 1
SCAN SPEED 050 NM/MIN BACKGROUND SPEED 100 NM/MIN
CHART SPEED 02 CM/MIN
TEST ID Hydrazine methode
OPERATOR P. Stouka

ABS

DATE 1982-08-07
PEAK PICK

FMB-A

0 min

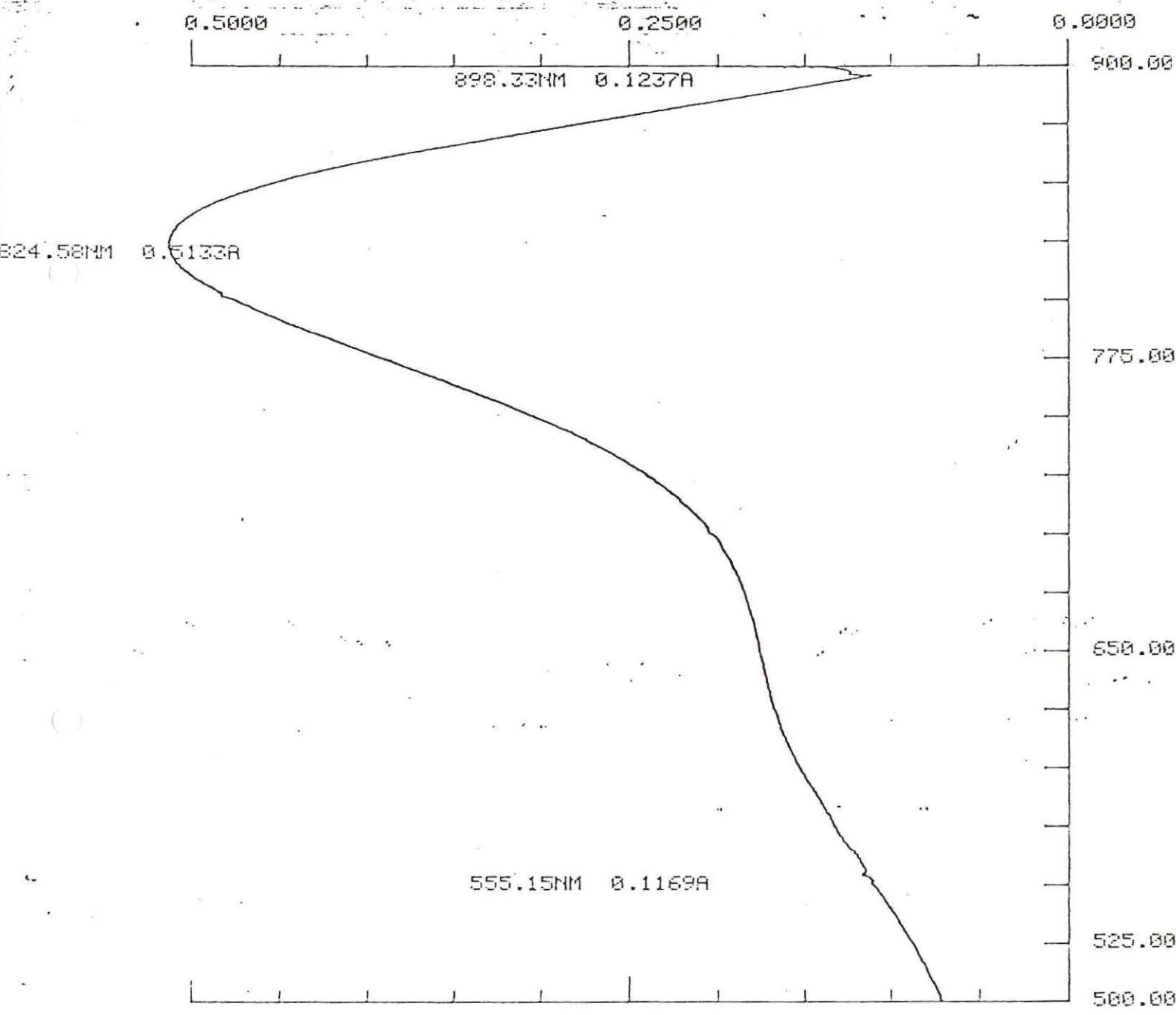


Fig 2

λ scan: 900 nm to 500 nm

60 min

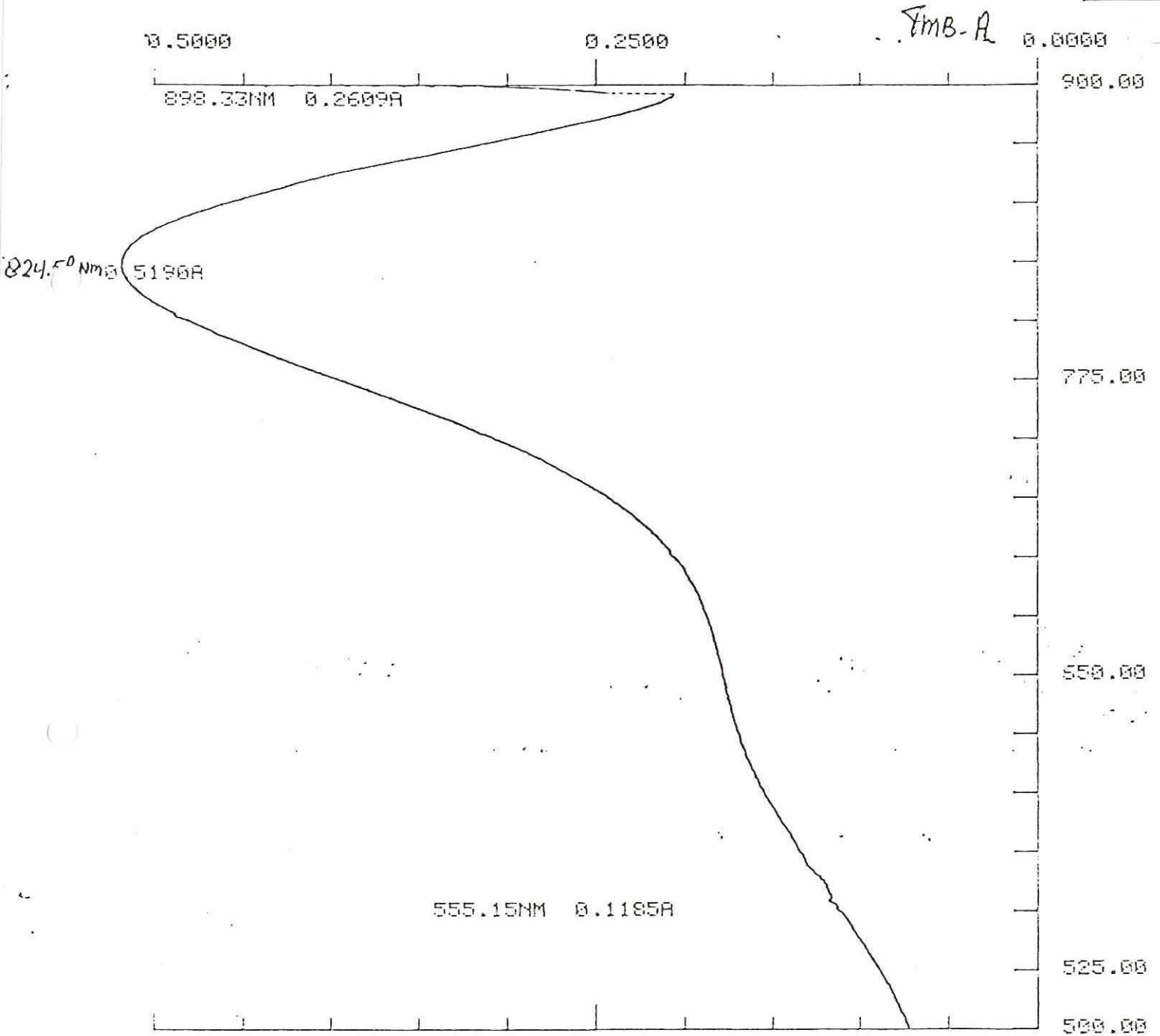


Fig 3

SCAN 00 900.0NM TO 850.0NM / 850 - 500.0 NM
INTERVAL TIME 0000 MIN
SLIT 05
LEAD AVERAGE 1
SCAN SPEED 050 NM/MIN BACKGROUND SPEED 100 NM/MIN
CHART SPEED 02 CM/MIN
TEST ID Starcinus ruxus
OPERATOR G. Stanton

DATE 12/5/1962
PEAK PICK

Fin
0 min

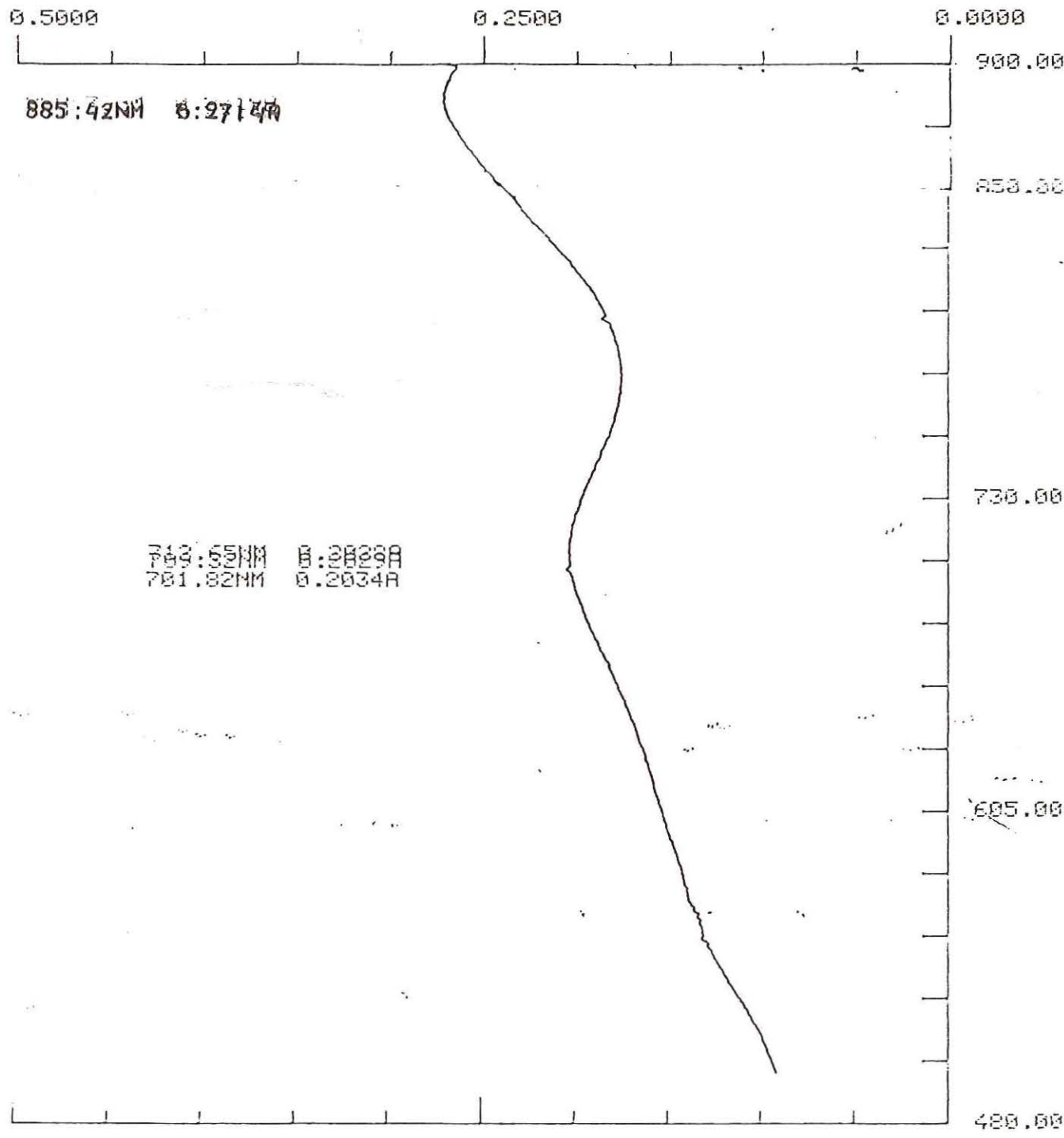


Fig 4

SCAN 00 900.0NM TO 500.0NM / 0.50-500, ABS
INTERVAL TIME 0000 MIN
LIT 05
READ AVERAGE 1
SCAN SPEED 050 NM/MIN BACKGROUND SPEED 100 NM/MIN
HART.SPEED 02 CM/MIN
EST ID Ascorbinsäure methode.
OPERATOR P. Stauder.

DATE 13/8/82.
PEAK PICK

Finb. A
60 min

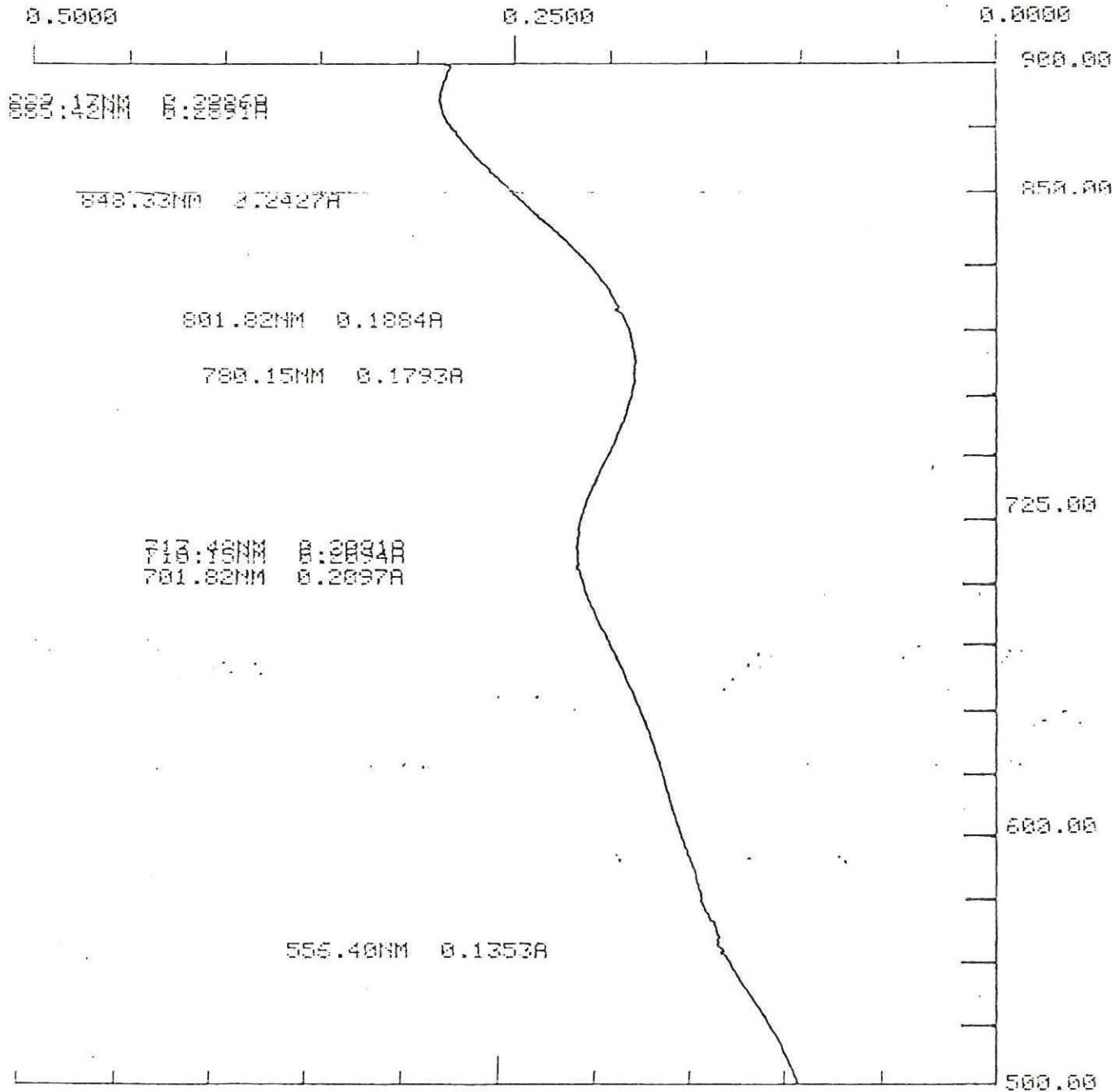
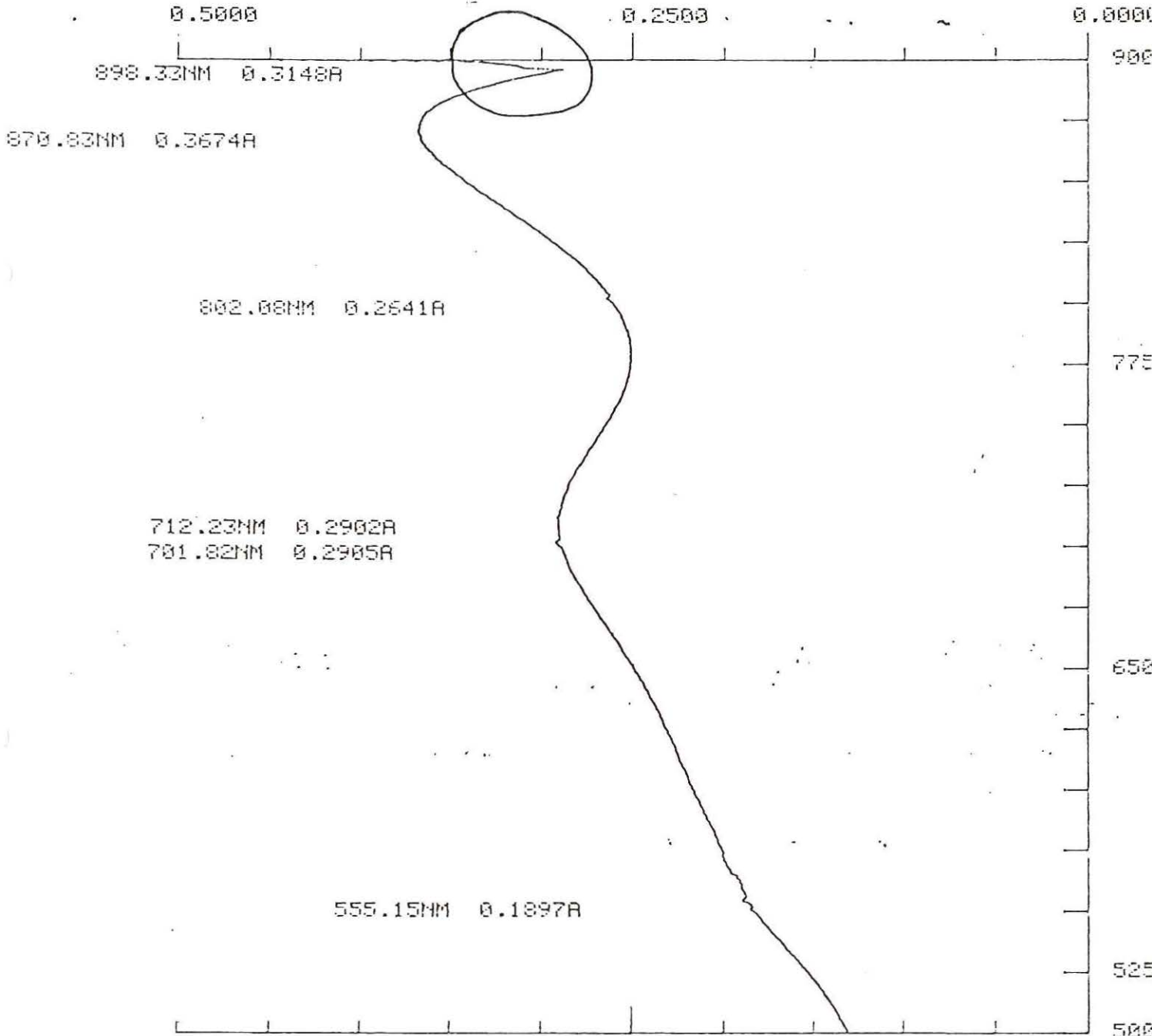


Fig 5

λ SCAN 00 900.0NM TO 500.0NM
INTERVAL TIME 0000 MIN
SLIT 02
READ AVERAGE 1
SCAN SPEED 050 NM/MIN BACKGROUND SPEED 100 NM/MIN
CHART SPEED 02 CM/MIN
TEST ID Asorbinezuur methode
OPERATOR P. Stouten

ABS

DATE 10-09-02
PEAK PICK



VAR. 2 y1E -1

Abs. x 10⁻¹

6.00
 5.92
 5.83
 5.75
 5.67
 5.58
 5.50
 5.42
 5.33
 5.25
 5.17
 5.08
 5.00

0.00 10.02 20.03 30.05 40.07 50.08 60.10

VAR. 1 tijd in min

VERGELIJKING 2 FOSFORMETHODES

HYDRAZINEMETHODE

y = x + 0,524

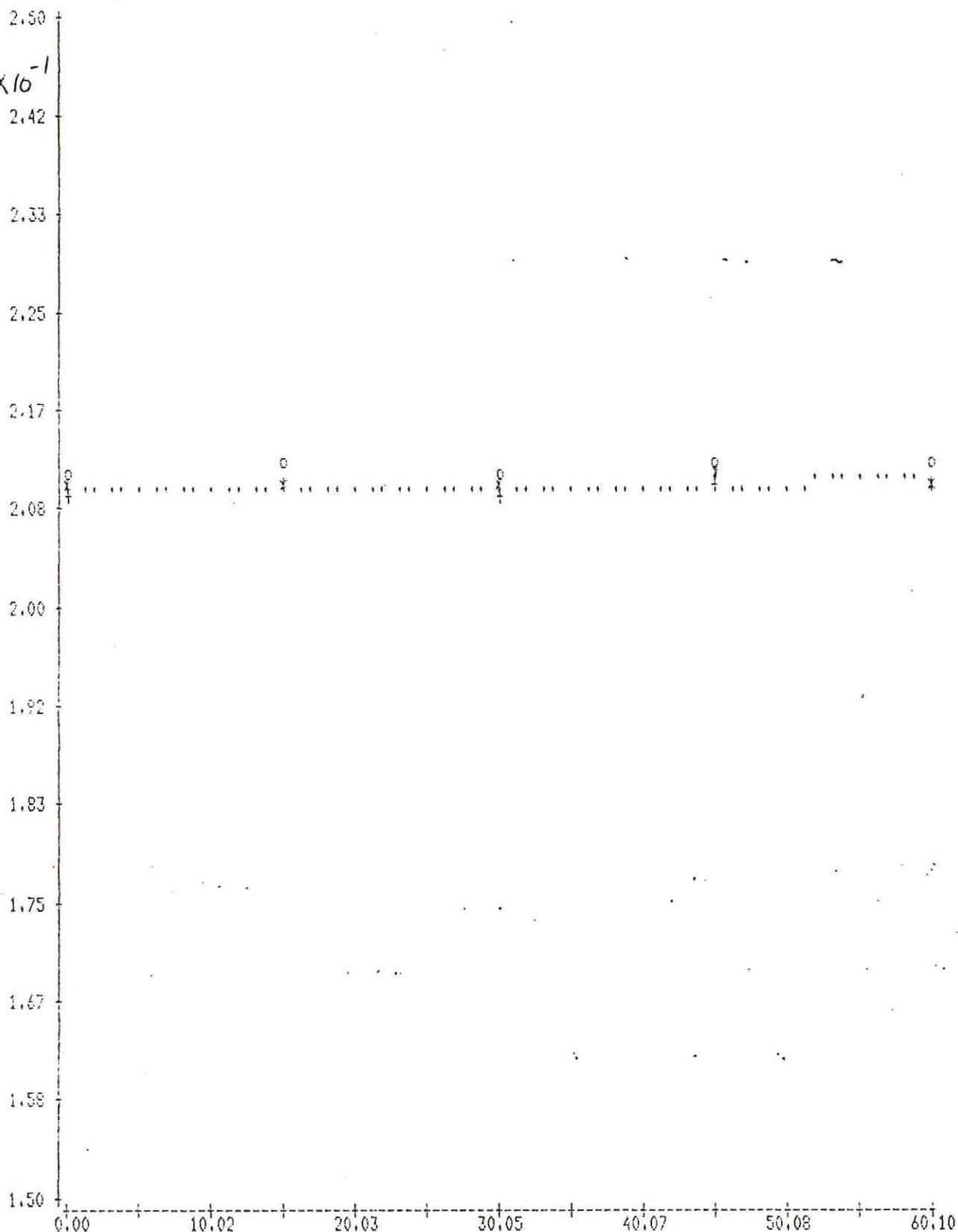
- *****: SUBS. 1
- +++++: SUBS. 2
- ooooo: SUBS. 3
- xxxxxx: SUBS. 4

Fig 7

FmB-B.

VAR. 2 x1E -1

Abs. x10⁻¹



VAR. 1

tijd in min.

VERGELIJKING 2 FOSFORMETHODES

Ascorbinezuurmethode. $y = x + 0,210$

*****:SUBS. 5
 ++++++:SUBS. 6
 oooooo:SUBS. 7
 xxxxxx:SUBS. 8

TABEL I

Proster conc. 30 µg/50 mL	λ 900 nm	λ 882 nm.
A	0.2752	0.2808
A'	0.2763	0.2814

A = monster meting na 0 min

A' = monster meting na 60 min

Tabel II

Hydrazinemethode

tijd serie	0	15	30	45	60	gem.
1	0.5142	0.5214	0.5230	0.5205	0.5205	0.5199
2	0.5167	0.5190	0.5190	0.5212	0.5165	0.5185
3	0.5093	0.5140	0.5145	0.5158	0.5129	0.5133
4	0.5223	0.5227	0.5238	0.5214	0.5173	0.5215
5	0.5193	0.5196	0.5205	0.5191	0.5180	0.5193
6	0.5238	0.5229	0.5236	0.5218	0.5189	0.5222
7	0.5280	0.5309	0.5289	0.5284	0.5255	0.5283
Gem.	0.5191	0.5215	0.5219	0.5212	0.5185	0.5204

Afwijkingen van seriegemiddelde

tijd serie	0	15	30	45	60
1	-0.0057	0.0015	0.0031	0.0006	0.0004
2	-0.0018	0.0005	0.0005	0.0027	-0.0020
3	-0.0040	0.0007	0.0012	0.0025	-0.0004
4	0.0008	0.0012	0.0025	-0.0001	-0.0042
5	0.0000	0.0005	0.0012	-0.0002	-0.0013
6	0.0016	0.0007	0.0014	-0.0004	-0.0033
7	-0.0003	0.0026	0.0006	0.0001	-0.0028
Gem.	-0.0013	0.0011	0.0015	0.0007	-0.0019
s(v)	0.00265	0.00078	0.00094	0.00132	0.00164

VARIANTIE ANALYSE

Variatiebron	Kwadratensom	Q	Gem. kwadraten	F
series	0.00061532	6	0.0001025539	31.73**
tijden	0.00006610	4	0.0000165250	5.12**
residu	0.00007753	24	0.0000032303	
totaal	0.00075895	34		

s(residu)	= 0.00180	V = 0.35
s(tijden)	= 0.00139	V = 0.28
s(series)	= 0.00446	V = 0.96
s(residu+tijden)	= 0.00226	V = 0.44
s(residu+series)	= 0.00481	V = 0.92
s(residu+tijden+series)	= 0.00500	V = 0.96

tijd serie	0	15	30	45	60	gem.
1	0.2075	0.2075	0.2077	0.2082	0.2082	0.2078
2	0.2056	0.2057	0.2062	0.2055	0.2059	0.2060
3	0.2104	0.2091	0.2091	0.2093	0.2098	0.2095
4	0.2113	0.2107	0.2104	0.2098	0.2104	0.2105
5	0.2101	0.2101	0.2103	0.2110	0.2108	0.2105
6	0.2092	0.2101	0.2090	0.2099	0.2099	0.2096
7	0.2117	0.2123	0.2119	0.2128	0.2128	0.2123
8	0.2099	0.2103	0.2103	0.2105	0.2105	0.2103
Gem.	0.2096	0.2095	0.2094	0.2096	0.2098	0.2096

Afwijkingen van seriegemiddelde

tijd serie	0	15	30	45	60
1	-0.0003	-0.0003	-0.0001	0.0004	0.0004
2	0.0006	-0.0003	0.0002	-0.0005	-0.0001
3	0.0009	-0.0004	-0.0004	-0.0002	0.0003
4	0.0008	0.0002	-0.0001	-0.0007	-0.0001
5	-0.0004	-0.0004	-0.0002	0.0005	0.0003
6	-0.0004	0.0005	-0.0006	0.0003	0.0003
7	-0.0006	0.0000	-0.0004	0.0005	0.0005
8	-0.0004	0.0000	0.0000	0.0002	0.0002
Gem.	0.0000	-0.0001	-0.0002	0.0001	0.0002
s(v)	0.00062	0.00032	0.00027	0.00048	0.00022

VARIANTE ANALYSE

Variatiebron	Kwadratensom	Q	Gem. kwadraten	F
series	0.00012817	7	0.0000183103	88.78**
tijden	0.00000082	4	0.0000002054	1.00
residu	0.00000577	28	0.0000002062	
totaal	0.00013477	39		

s(residu)	= 0.00045	V = 0.22
s(tijden)	= 0.00000	V = 0.00
s(series)	= 0.00190	V = 0.91
s(residu+tijden)	= 0.00045	V = 0.22
s(residu+series)	= 0.00196	V = 0.93
s(residu+tijden+series)	= 0.00196	V = 0.93