

Afdeling Additieven Datum: 1982-11-08
VERSLAG 82.93 Pr.nr. 505.0200

Onderwerp: De polarografische bepaling
 van nicotinezuur in vlees.

Bijlagen: 4.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Additieven (4x), afdeling Normalisatie (Humme), Pro-
jektbeheer, afdeling Contaminanten, afdeling Dierge-
neesmiddelen, afdeling Zware Metalen, afdeling Vlees
en Vleesprodukten, afdeling Hollman.

Afdeling Additieven.

Datum: 1982-11-08

VERSLAG 82.93

Pr.nr. 505.0200

Projekt:

Onderwerp: De polarografische bepaling van nicotinezuur in vlees.

Bijlagen: 4.

Doel:

Het ontwikkelen van een bepaling voor het aantonen en bepalen van nicotinezuur inclusief het amide in vlees.

Een dergelijke methode is nodig met het oog op onderzoek ten behoeve van Konsumenten Kontakt in december 1982.

Samenvatting:

Er wordt een polarografische methode beschreven voor de bepaling van nicotinezuur na extractie van het nicotinezuur en nicotinamide uit vlees m.b.v. een buffer met een pH van 2.5

Het gehalte nicotinezuur wordt d.m.v. standaardadditie bepaald.

Conclusie:

De methode is geschikt voor het bepalen van nicotinezuur bij gehalten > ca 1 mg/kg.

Wel dient indien het gehalte toegevoegd nicotinezuur bepaald moet worden rekening gehouden te worden met het van nature aanwezige nicotinamide.

Het verdient dan ook aanbeveling een inventariserend onderzoek te doen naar de aanwezigheid van nicotinamide in vlees afkomstig van diverse diersoorten.

Verantwoordelijk: Dr W.G. de Ruig

Medewerkers/Samenstellers: T.D.B. van der Struijs, H. Hooyerink

Projektleider: dr W.G. de Ruig

1. Inleiding

Bij de wijziging van het Vlees en Vleeswarenbesluit (Warenwet) van 16 juni 1981 werd het gebruik van nicotinezuur als kleurbehoudend middel toegevoegd aan toebereid rauw gehakt en verse worst niet langer toegelaten.

Ten behoeve van Konsumenten Kontakt zal rond december 1982 een aantal monsters gehakt op de aanwezigheid van nicotinezuur onderzocht moeten worden, daar de verdenking bestaat dat ondanks de intrekking van de toelating tot het gebruik van nicotinezuur dit middel nog wordt toegepast.

Uit literatuurgegevens blijkt dat nicotinezuur in vlees zowel polarografisch (1), als met colorimetrische methoden (2) (auto-analyzer), als met HPLC (3) kan worden bepaald. Gezien het beperkte aantal monsters en de eenvoud van de techniek lijkt het operationeel maken van een polarografische methode het meest zinvol.

2. Principe

Nicotinezuur wordt met behulp van een citroenzuurfosfaatbuffer uit het gehakt geextraheerd. Van het extract wordt na centrifugeren een aliquot overgebracht in een polarografievat waarna een "differential puls polarogram" wordt opgenomen van - 1.000 Volt tot - 1.350 Volt. Het gehalte aan nicotinezuur wordt d.m.v. standaardadditie bepaald.

3. Invloed van de pH

De reductie van nicotinezuur vindt plaats bij vrij sterk negatieve spanning van de werkelektrode, zelfs zeer dicht bij die spanning waarbij de ontleding van de basiselectrolyt begint.

De reductiepotentiaal van nicotinezuur is afhankelijk van de pH van de oplossing (fig. 1, 2). Verhoging van de pH doet de reductiepotentiaal naar negatiever waarden verschuiven.

Bij een pH hoger dan ca. 5 wordt nicotinezuur pas gereduceerd wanneer ook de electrolytische ontleding van het electrolyt begonnen is.

De polarografische bepaling van nicotinezuur dient dan ook bij een pH < 4 te geschieden. Een tweede effect waarmee rekening gehouden dient te worden is het verschuiven van de potentiaal waarbij het electrolyt wordt ontleed ten gevolge van een veranderde pH.

Deze potentiaal verschuift bij dalende pH naar minder hoge waarden, zodat bij een $\text{pH} < 1.5$ de nicotinezuurpiek wederom in de ontledingsgolf van het electrolyt verdwijnt. De pH van de oplossing zal dus moeten liggen tussen 2.5 en 4.

4. Invloed concentratie

Im combinatie met de pH van de oplossing kan de concentratie van het te bepalen nicotinezuur de oorzaak zijn van het optreden van twee reductiepieken in het "differential puls" polarogram (fig. 3). Het verdient derhalve aanbeveling, ook na standaardadditie te voorkomen, dat de concentratie in de meetoplossing $> 2 \text{ mg/l}$ bedraagt. Dit ter voorkoming van verschuiving van piekpotentiaal en splitsing in twee pieken.

5. Monstervoorbereiding

Op grond van bovenstaande overwegingen is gekozen voor het gebruik van een bufferoplossing als grondelectrolyt.

Daar vlees zelf ook over enige buffer-capaciteit beschikt moet de pH van de buffer lager worden gekozen dan de uiteindelijk gewenste pH van 3.0 - 3.5.

Er van uit gaande dat indien het gebruik van nicotinezuur wordt toegepast men dit zal doen tot gehalten overeenkomende met oudere warenwet-toelatingen (0,015%) en de wens dat na standaardadditie in de meetoplossing gehalte $< 2 \text{ mg/l}$ bevat, zal over het algemeen een verdunning van 10-20 maal op zijn plaats zijn. Proefondervindelijk werd vastgesteld dat voor deze verdunningen een citroenzuur-fosfaarbuffer met pH 2.5 volstaat om een uiteindelijke pH van 3 tot 3.5 te bereiken.

Homogeniseren van het vleesmonster met de buffer m.b.v. een Sorvall Omnimixer gevolgd door centrifugeren bij 2500 rpm levert een extract op, dat geschikt is voor direkte "differential puls" bepaling van nicotinezuur.

6. Kwantificering

Daar de hoogte en de plaats(en) van de polarografische piek(en) afhankelijk zijn van een groot aantal factoren (o.a. hoogte kwikkolom, temperatuur, pH oplossing, concentratie) verdient het aanbeveling voor kwantificeren gebruik te maken van een standaardadditie methode.

7. Resultaten

De resultaten zijn opgenomen in tabel 1.

Tabel 1. Resultaten polarografische nicotinezuurbepalingen in gehakt + kalfsvlees.

monster	nicotinezuur- gehalte %	gem. %	gem. reco- very %
gehakt	0,018		
gehakt	0,018	0,018	
gehakt	0,019		
gehakt + 0,010%	0,026		
gehakt + 0,010%	0,027	0,027	90
gehakt + 0,010%	0,028		
gehakt + 0,020%	0,037		
gehakt + 0,020%	0,035	0,036	90%
gehakt + 0,020%	0,036		
gehakt + 0,030%	0,048		
gehakt + 0,030%	0,047	0,048	100%
gehakt + 0,030%	0,049		

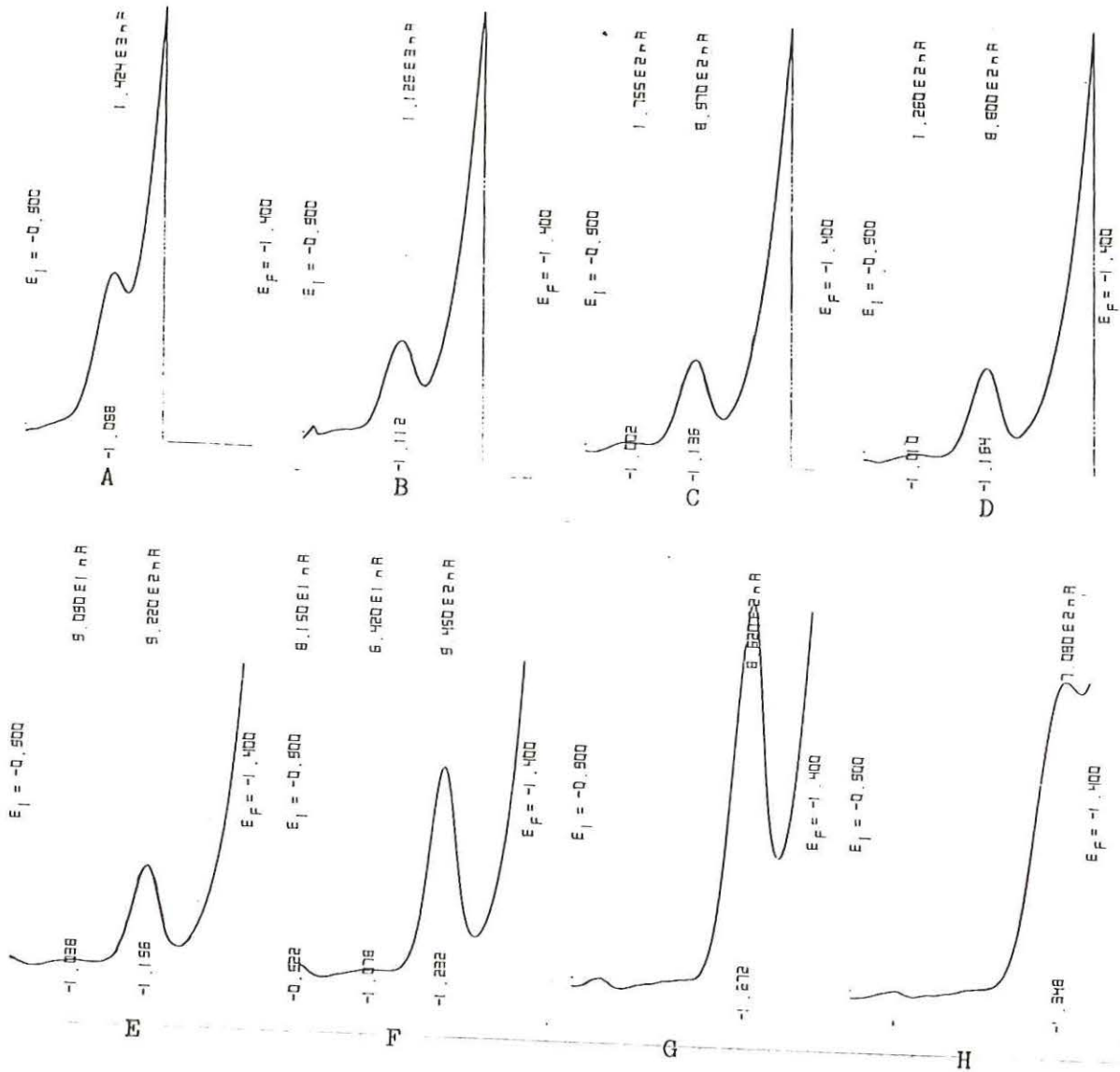
Conclusies

De methode is geschikt voor de kwantitatieve bepaling van nicotinezuur in vleesmonsters. Bij interpretatie van de verkregen analyseresultaten moet rekening gehouden worden met van nature in vlees aanwezig nicotinezuur en/of het amide daar dit wordt meegeëxtraheerd.

Literatuur:

1. P.W.C.M. van Dungen. De Ware(n) Chemicus 2 (1972) 108-112.
2. H.W. van Gend. De Ware(n) Chemicus 3 (1973) 61-67.
3. A. de Bruin. De Ware(n) Chemicus 7 (1977) 165-166.

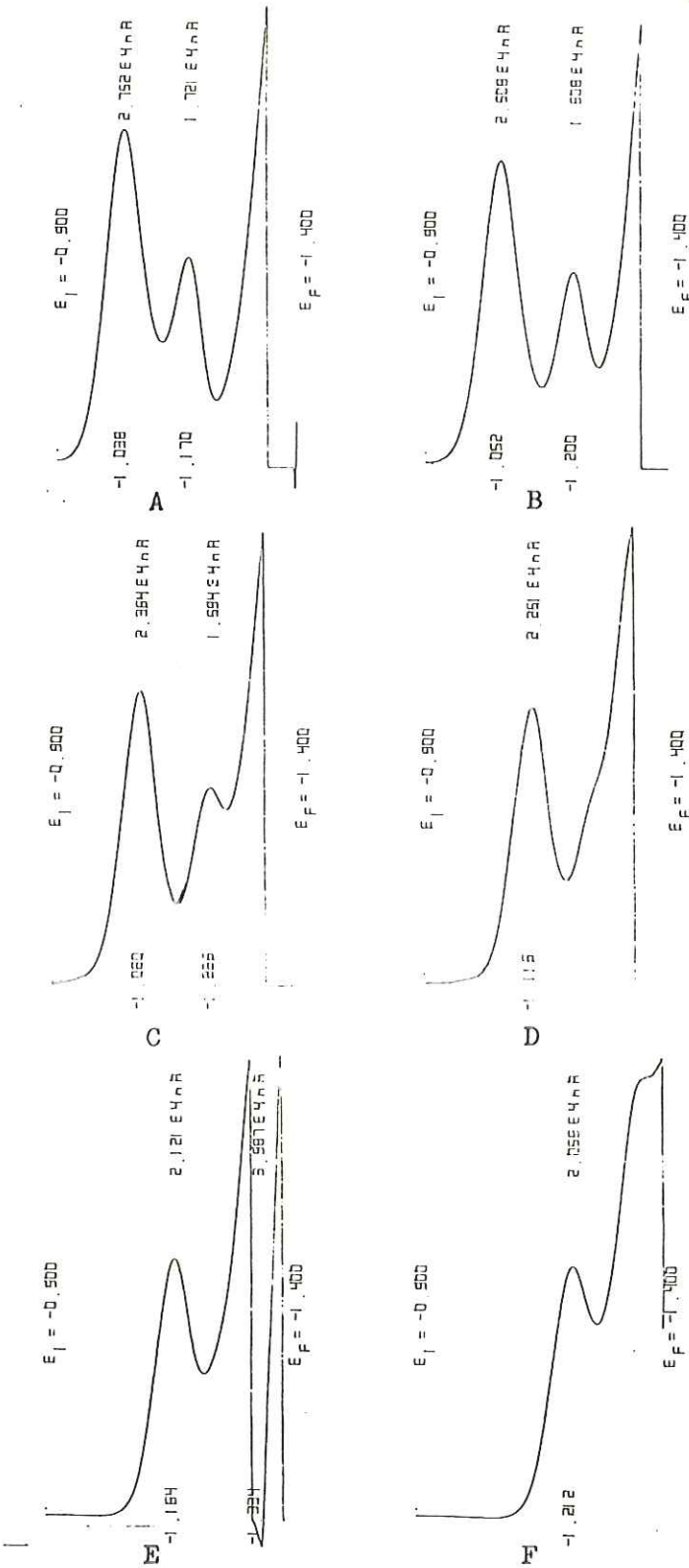
Figuur 1



pH invloed bij lage concentraties nicotinezuur

	A	B	C	D	E	F	G	H
pH	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0

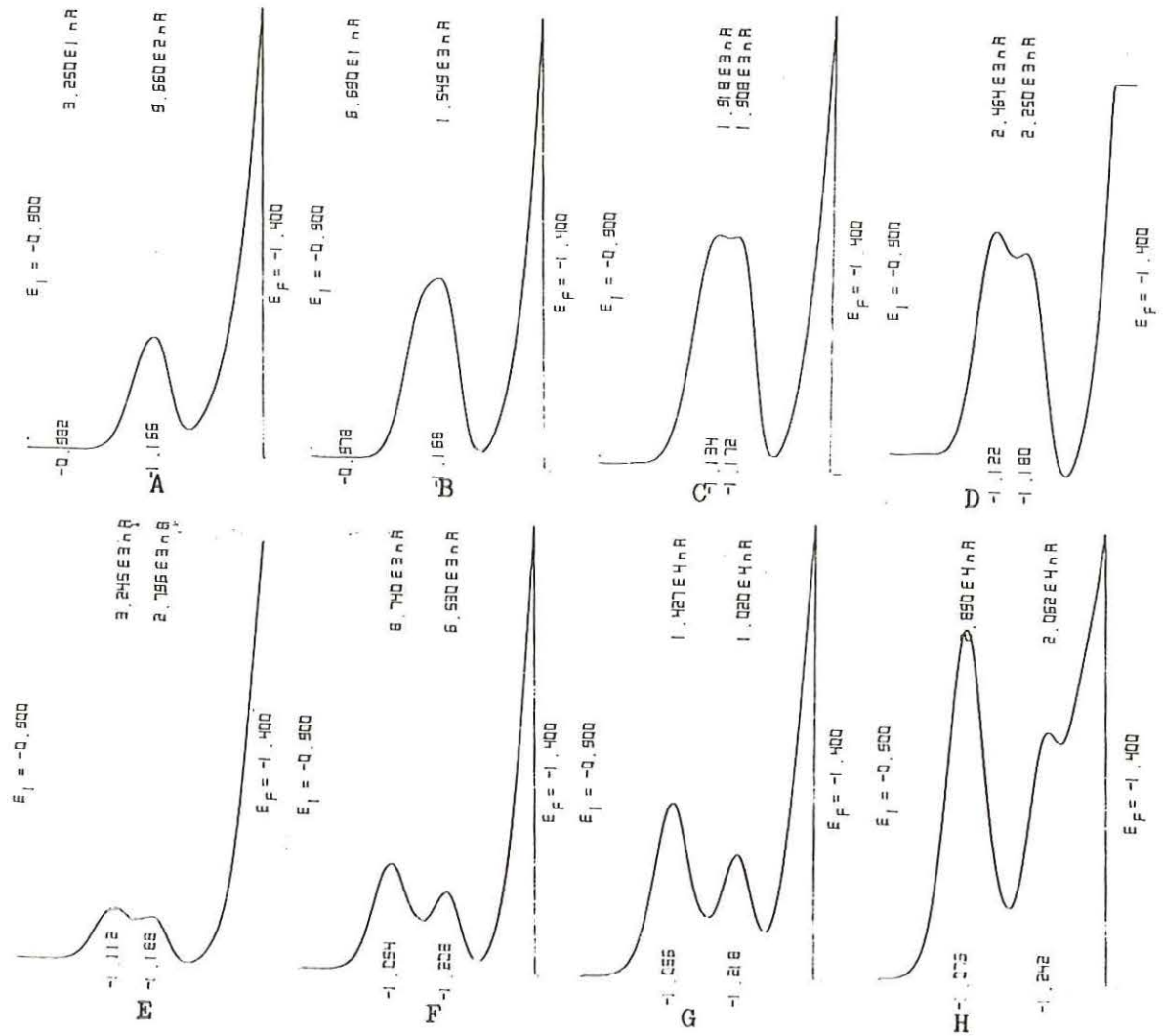
Figuur 2



pH invloed bij hoge concentraties nicotinezuur

	A	B	C	D	E	F
pH	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5

Figuur 3



Invloed van de concentratie nicotinezuur bij
gelijkblijvende pH

A B C D E F G H
2 6 10 14 20 60 100 140 mg/kg

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. G 125

1e oplage (1982-11-22)

DE POLAROGRAFISCHE BEPALING VAN NICOTINEZUUR IN VLEES

Verzendlijst: afdeling Normalisatie/harmonisatie, bibliotheek (5x),
sektorhoofd, afdeling Additieven (4x).

G125.0

De polarografische bepaling van nicotinezuur in vlees

1. Doel en toepassingsgebied

Dit voorschrift beschrijft een methode voor het bepalen van nicotinezuur in vlees en vleesprodukten m.b.v. "differential pulse" polarografie.

2. Principe

Aan een afgewogen hoeveelheid (gemalen) vleesmonster wordt een hoeveelheid bufferoplossing (pH 2,5) toegevoegd.

Na homogeniseren (Sorvall Omnimixer) wordt de suspensie met buffer aangevuld tot een bekend volume. Na centrifugeren wordt een aliquotdeel van het aldus verkregen vleesextract gepolarografeerd. Het nicotinezuurgehalte wordt bepaald door standaardadditie.

3. Apparatuur

3.1 Bovenweger.

3.2 pH meter.

3.3 Homogenisator (b.v Sorvall Omnimixer).

3.4 Centrifuge.

3.5 Polarograaf + hulpmiddelen.

3.6 Pipetten 5 ml, 100 μ l, 20 μ l.

3.7 Erlenmeyers 50 ml.

3.8 Maatkolven 100 ml.

4. Chemicaliën

4.1 Citroenzuur $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ p.a.

4.1.1 Citroenzuur 0,1 M (21 g citroenzuur (4.1)/liter).

4.2 Dinatriumfosfaat (watervrij) p.a.

4.2.1 Dinatriumfosfaat 0,2 M (35,6 g dinatriumfosfaat (4.2)/liter).

4.3 Bufferoplossing pH 2,5.

Bereiding: Voeg aan een oplossing van 0,1 M citroenzuur (4.1.1) een zodanige hoeveelheid 0,2 M dinatriumfosfaat (4.2.1) toe dat de pH van het mengsel 2,5 bedraagt. Controleer de pH met een pH meter (3.2).

4.4 Nicotinezuur (p.a.).

4.4.1 Standaard nicotinezuuroplossing (1 mg/ml).

Breng 100 mg nicotinezuur (4,4) in een maatkolf van 100 ml. Los op in water, vul aan tot de maatstreep en meng.

4.4.2 Standaard nicotinezuuroplossing (0,1 mg/ml).

Breng 10 ml nicotinezuuroplossing (4.4.1) in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de maatstreep en meng.

5. Werkwijze

5.1 Weeg nauwkeurig 5 gram vleesmonster af (3.1) in een erlenmeyer (3.7). Voeg toe 25 ml bufferoplossing (4.3) en homogeniseer (3.3) gedurende 1 minuut (stand 5).

5.2 Breng het homogenisaat over in een maatkolf van 100 ml (3.8) en vul aan met buffer (4.3) tot de maatstreep.

5.3 Centrifugeer 10 ml van het homogenisaat gedurende 15 minuten bij een toerental van 10.000 rpm. Breng met behulp van een pipet (3.6) 5 ml van de waterige fractie over in een polarografiecel.

5.4 Stel de volgende parameters in bij gebruik van de PAR 374 polarografische analysator.

Analyt. Tech. - Diff. Pulse Polarog
Initial Potential - - 0.900 volt
Final Potential - - 1.400 Volt
Scan Rate - Fast
Replications - One
Sensitivity - Medium
Peak Potential - Pass
Purge - Auto
Purge Time - 5.0 Min
Blanks - None.

5.5 Neem het polarogram op.

5.6 Voeg hierna 100 µl (3.6) van de standaard nicotinezuuroplossing (4.4.2) toe. Neem nogmaals een polarogram op.

6. Berekening

De standaardadditie geeft een concentratiestijging van 2 mg/kg in de monsteroplossing.

Dit komt overeen met 40 mg/kg berekend op het monster.

Ten einde het gehalte toegevoegd nicotinezuur te bepalen moet gecorrigeerd worden voor het natuurlijk nicotinamidegehalte, dat meebepaald wordt.

De concentratie nicotinamide uitgedrukt als nicotinezuur bedraagt

Varkensvlees 40-87 mg/kg

Rundvlees 37-75 mg/kg

Kalfsvlees 64-80 mg/kg.

Bereken het gehalte nicotinezuur nu met behulp van de volgende formule:

$$\frac{P_m}{P_s - P_m} \times 40 - N = \text{mg/kg}$$

Waarbij

P_m = piekhoogte monsteroplossing

P_s = piekhoogte na standaardadditie

N = natuurlijk gehalte in te onderzoeken vlees(product).

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Samensteller/medewerker: T.D.B. van der Struijs