

BESCHIKKING
van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie
tot aanvulling van Beschikking M (72) 14 betreffende de toepassing
van Benelux-referentiemethoden van onderzoek inzake soepen
M (79) 8

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,

Gelet op artikel 1 van het Protocol van 29 april 1969 inzake de afschaffing van controles en formaliteiten aan de binnengrenzen van Benelux en inzake de opheffing van de belemmeringen van het vrije verkeer,

Gelet op de Beschikking van het Comité van Ministers van 29 mei 1972, M (72) 14, betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek inzake soepen, gewijzigd bij Beschikking van 26 januari 1976, M (76) 5,

Overwegende dat het, gezien de veelvuldige toepassing van glutaminezuur in soepen noodzakelijk is gebleken om een referentiemethode van onderzoek ter bepaling van dit zuur in deze waar vast te stellen,

Heeft het volgende beslist :

Artikel 1

De methoden van onderzoek, gehecht aan de Beschikking van het Comité van Ministers van 29 mei 1972, M (72) 14, betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek inzake soepen, gewijzigd bij Beschikking van 26 januari 1976, M (76) 5, worden aangevuld met de methode hieronder beschreven voor glutaminezuur in soepen :

1. Doel en toepassingsgebied

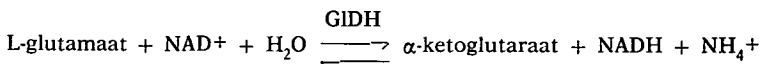
Dit voorschrift beschrijft de enzymatische bepaling van glutaminezuur in gebruiksgereede soepen, respectievelijk volgens de aanwijzingen op de verpakking uit soep-concentraten en/of soepen in droge vorm bereide soepen.

2. Definitie

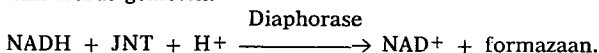
Het gehalte aan glutaminezuur gemeten op de navolgend beschreven wijze wordt uitgedrukt in gewichtsprocenten van de gebruiksgereede resp. volgens de aanwijzingen vermeld op de verpakking bereide soep.

3. Beginsel

Bij de oxidatieve desaminering van L-glutaminezuur door nicotine-amide-adenine-dinucleotide (NAD) in aanwezigheid van het enzym glutamaat-dehydrogenase (GDH) ontstaat α -ketoglutaraat evenals gereduceerd nicotine-amide-adenine-dinucleotide (NADH).



Het gevormde NADH reageert met joodnitrotetrazoliumchloride (JNT) in aanwezigheid van diaphorase tot een formazaan waarvan de extinctie bij 492 nm wordt gemeten.



4. Reagentia

Indien niet uitdrukkelijk anders vermeld dienen alle reagentia analytisch zuiver te zijn. Water moet van de kwaliteit dubbel uit glaswerk gedestilleerd zijn of gelijkwaardig.

- 4.1. Triethanolamine-hydrochloride.
- 4.2. Dikaliumwaterstoffosfaat.
- 4.3. Kaliumdiwaterstoffosfaat (volgens Sørensen).
- 4.4. Kaliumhydroxide-oplossing 2 N.
- 4.5. Kaliumhydroxide-oplossing 0,2 N.
- 4.6. Triton X-100; Serva *)/Heidelberg of gelijkwaardig. Neem voor het pipetteren van deze visceuse oplossing een pipet met een brede uitstroomopening.
- 4.7. Nicotineamide-adenine-dinucleotide, NAD.
- 4.8. Joodnitrotetrazoliumchloride, JNT.
- 4.9. Diaphorase, gelyofiliseerd; 30 mg lyofilisaat bevatten 10 mg enzym.
- 4.10. Glutamaat-dehydrogenase (GIDH) oplossing in glycerine; 10 mg/ml.
- 4.11. Glutaminezuur.
- 4.12. Bufferoplossing; pH = 8,6.
 - 4.12.1. Los 4,65 gram triethanolamine-hydrochloride (4.1.) op in ongeveer 80 ml water, breng pH van de oplossing met ongeveer 11 ml 2 N kaliumhydroxide (4.4.) op 8,6, voeg 1,6 ml Triton X-100 (4.6.) toe en meng. Vul met water in een maatkolf van 100 ml tot de maatstreep aan en meng nogmaals.
 - 4.12.2. Los 2,15 gram dikaliumwaterstoffosfaat (K_2HPO_4) en 17,5 mg kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4) op in water, vul in een maatkolf van 100 ml met water tot de maatstreep aan en meng.
 - 4.12.3. Bereid de bufferoplossing pH = 8,6 door het mengen van 60 ml oplossing 4.12.1. en 15 ml oplossing 4.12.2. Deze bufferoplossing is bij kamertemperatuur tenminste 2 maanden houdbaar.

*) Het vermelden van handels- en/of merknamen vormt géén enkele aanbeveling en is uitsluitend bedoeld als identificatie.

- 4.13. Nicotineamide-adenine-dinucleotide-oplossing (NAD-oplossing).
Los 60 mg NAD op in 12 ml water. De oplossing is bij + 4 °C tenminste 4 weken houdbaar.
- 4.14. Joodnitrotetrazoliumchloride-oplossing (JNT-oplossing).
Los 30 mg joodtetrazoliumchloride op in 50 ml water. De oplossing is bij + 4 °C tenminste 4 weken houdbaar.

NOOT

JNT en zijn oplossingen zijn lichtgevoelig en moeten derhalve zoveel mogelijk, óók gedurende de analyse, op een donkere plaats worden bewaard.

- 4.15. Diaphorase-oplossing ; 1 mg enzym per ml oplossing.
Los 9 mg gelyofiliseerd diaphorase op in 3 ml water. De oplossing is bij + 4 °C tenminste 4 weken houdbaar.
- 4.16. Glutaminezuurstandaard-oplossing.
Los 50 mg glutaminezuur (4.11.) op in ongeveer 25 ml water, breng de pH van de oplossing met behulp van 0,2 N kaliumhydroxide (4.5) op 7,0, vul in een maatkolf van 50 ml met water tot de maatstreep aan en meng.
- 4.17. Verdunde glutaminezuurstandaard-oplossing.
Pipeteer 5,0 ml van de standaardoplossing 4.16. in een maatkolf van 100 ml, vul met water tot de maatstreep aan de meng. De glutaminezuur concentratie (c) van de oplossing bedraagt 50.10⁻³ mg/ml. Bereid deze oplossing vlak voor het gebruik vers.

5. Apparatuur

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk evenals :

- 5.1. pH-meter.
- 5.2. Filterfotometer of spectrofotometer afleesbaar op 0.001 extinctie eenheden (b.v. Zeiss PL-4 of gelijkwaardig) instelbaar op een golflengte van 492 nm. Gebruik indien beschikbaar een gethermostatiseerde kuvethouder.
- 5.3. Gethermostatiseerd waterbad ingesteld op 25 °C en voorzien van rondpomp.
- 5.4. Enzympipetten, waarvan de graduering niet tot in de uitloop is voortgezet.
- 5.5. Kuvetten met een optische weglengte van 1 cm.
- 5.6. Kunststof spatel aan het uiteinde rechthoekig omgebogen teneinde de inhoud van de kuvetten te mengen.

6. Monstervoorbereiding

- 6.1. Gebruik gebruiksgereede soepen als zodanig voor de navolgend beschreven voorbereiding van het monster. Ga bij soep-concentraten evenals soepen in droge vorm uit van de volgens voorschrift bereide soep, volg hiertoe de aanwijzingen vermeld op de verpakking.
- 6.2. Weeg 1 gram (M gram) volgens 6.1. verkregen goed gehomogeniseerde produkt tot op 1 mg nauwkeurig af in een bekglas en suspendeer in ongeveer 70 ml water. Verwarm de suspensie gedurende 10 minuten op een waterbad van 70 °C, koel af tot kamertemperatuur, vul in een maatkolf van 200 ml (V_1 ml) tot de maatstreep aan met water en meng. Filtreer een deel van de monsteroplossing door een vouwfilter en gebruik het filtraat voor de onder 7.1. beschreven meting.

7. Werkwijze

7.1. Monsteroplossingen

- 7.1.1. Breng met behulp van een gethermostatiseerd waterbad (5.3.) ingesteld op 25 °C de temperatuur van de bufferoplossing (4.12.3.), de verdunde en gefiltreerde monsteroplossing (6.2.) evenals een geschikte hoeveelheid water op 25 °C.
- 7.1.2. Plaats en tweetal kuvetten (5.5.) evenals een kuvet gevuld met water (7.1.1.) in de op 25 °C gethermostatiseerde kuvethouder van de filterfotometer of spectrofotometer (5.2.). Plaats in elk van de lege kuvetten een kunststofspatel (5.6.).
- 7.1.3. Pipetteer (5.4.) op de omgebogen kant van de kunststofspatel achtereenvolgens 1,00 ml bufferoplossing van 25 °C ; 0,20 ml NAD-oplossing (4.13.); 0,20 ml JNT-oplossing (4.14); 0,05 ml diaphorase-oplossing (4.15); 0,20 ml (v_1 ml) gefiltreerde monsteroplossing (6.2.) evenals 1,30 ml water van 25 °C.
- 7.1.4. Herhaal deze bewerking in de tweede kuvet. Neem 1,50 ml water van 25 °C in plaats van 0,20 gefiltreerde monsteroplossing en 1,30 ml water.
- 7.1.5. Meng de inhoud van de kuvetten met een kunststofspatel en meet na 2 minuten de extinctie E_{1M} van de oplossing (7.13.) en de extinctie E_{1B} van de blanco-oplossing (7.1.4.) bij 492 nm tegen water als referentie.
- 7.1.6. Pipetteer op de omgebogen kant van de kunststof spatel in de kuvet met de monsteroplossing en de blanco-oplossing telkens 0,05 ml GIDH-oplossing (4.10.) en meng.
- 7.1.7. Wacht tot de reactie tot stilstand is gekomen — dit is na ongeveer 10 minuten het geval en herkenbaar aan het niet meer veranderen van de extinctie — en noteer de extincties E_{2M} en E_{2B} gemeten bij 492 nm tegen water als referentie.

7.2. Meting van de molaire extinctiecoëfficiënt

7.2.1. Voor de berekening van de molaire extinctiecoëfficiënt van glutaminezuur moet de extinctie van een glutaminezuurstandaardoplossing op de wijze als beschreven onder 7.1. worden gemeten. Gelijktijdig met de glutaminezuurstandaard moet een blancooplossing eveneens op de wijze als aangegeven onder 7.1. worden gemeten. Neem 0,20 ml (V_2 ml) verdunde standaardoplossing (4.17.) in plaats van 0,20 ml gefiltreerde monsteroplossing (7.1.3.) en voer de bepaling in duplo uit.

8. Berekeningen

8.1. Bereken het gehalte aan glutaminezuur in gewichtsprocenten van de gebruiksgereede resp. volgens voorschrift bereide soep (6.1. en 6.2.) met behulp van de formule :

$$\% \text{ glutaminezuur} = \Delta E \times \frac{V \times M_w}{\epsilon \times d \times v_1 \times 1000} \times \frac{V_1}{1000} \times \frac{100}{M}$$

$$\text{of } \% \text{ glutaminezuur} = \Delta E \times \frac{3,00 \times 147,13}{\epsilon \times 1 \times 0,20 \times 1000} \times \frac{200}{1000} \times \frac{100}{M}$$

$$\text{of } \% \text{ glutaminezuur} = 44,139 \times \frac{\Delta E}{\epsilon \times M}$$

waarin :

$\Delta E = (E_{2M} - E_{1M}) - (E_{2B} - E_{1B})$ gemeten onder 7.1. voor de blanco- en de monsteroplossing

V = het totaal volume van de oplossingen (7.1.) gepipetteerd in de kuvetten ; $V = 3,00$ ml

M_w = het molekulgewicht van glutaminezuur ; $M_w = 147,13$

V_1 = het volume van de monsteroplossing (6.2.) ; $V_1 = 200$ ml

ϵ = de gemiddelde molaire extinctiecoëfficiënt zoals berekend onder 8.2.

d = de optische weglengte van de gebruikte kuvetten in cm ;
 $d = 1,000$ cm

v_1 = het volume van de in onderzoek genomen hoeveelheid monsteroplossing (7.1.3.) ; $v_1 = 0,20$ ml

M = de inweeg van de waar in grammen (6.2.)

8.2. Bereken de molaire extinctiecoëfficiënt in cm^2/μ mol met behulp van de formule :

$$\epsilon = \Delta E \times \frac{V \times M_w}{c \times d \times v_2 \times 1000} \quad \frac{\text{cm}^2}{\mu \text{ mol}}$$

$$\text{of } \varepsilon = \Delta E \times \frac{3,00 \times 147,13}{c \times 1 \times 0,20 \times 1000} \quad \frac{\text{cm}^2}{\mu \text{ mol}}$$

$$\text{of } \varepsilon = 2,207 \times \frac{\Delta E}{c} \quad \frac{\text{cm}^2}{\mu \text{ mol}}$$

waarin :

$\Delta E = (E_{2M} - E_{1M}) - (E_{2B} - E_{1B})$ gemeten onder 7.2. voor de blanco- en de standaardoplossing

V = het totaal volume van de oplossingen (7.2.) gepipetteerd in de kuvetten ; V = 3,00 ml

Mw = het molekuulgewicht van glutaminezuur ; Mw = 147,13

c = de concentratie in mg/ml van de verdunde glutaminezuur standaardoplossing (4.17.)

d = de optische weglengte van de kuvetten in cm ; d = 1,000 cm

v_2 = het volume van de in onderzoek genomen hoeveelheid standaardoplossing (7.2.1.) ; $v_2 = 0,20$ ml

Gebruik het gemiddelde van de berekende molaire extinctiecoëfficiënten voor de onder 8.1. beschreven berekening van het glutaminezuurgehalte van de monsters.

Artikel 2

1. De regeringen van de Beneluxlanden zullen de nodige maatregelen nemen, opdat de referentiemethode van onderzoek voor glutaminezuur in soepen, zoals beschreven in artikel 1 van de onderhavige beschikking, uiterlijk drie maanden na de ondertekening van de beschikking als de enige referentiemethode wordt beschouwd.
2. Uiterlijk 6 maanden na afloop van de dag van ondertekening, zoals bedoeld in lid 1, brengt ieder der regeringen verslag uit aan het Comité van Ministers over de maatregelen die zijn getroffen ter uitvoering van de onderhavige beschikking. Bij dit verslag zal de tekst van de nationale uitvoeringsmaatregelen worden gevoegd.

GEDAAN te Brussel, op 4 mei 1979.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

G. THORN