

Projectnr.: 714.71.314.01

Operationeel maken van methoden t.b.v. Wettelijke en Dienstverlenende taken (WDT)

Projectleider: Ing. M.A.H. Baltussen

Rapport 2003. 017

Juli 2003

Vetgehalte bepaling in magere melkpoeder, caseïnaat en kunstmelkvoeder met behulp van accelerated solvent extraction (ASE)

Maria Baltussen

Afdeling Analyse & Ontwikkeling / Cluster Samenstellingonderzoek

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2003, RIKILT – Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

Adrie Vermunt

Wim Traag

Jacob de Jong

Nico Broex

marketing & communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

| INHOUD | blz. |
|---|-------------|
| 1 INLEIDING | 3 |
| 1.1 Principe | 3 |
| 1.2 ASE versus A0656 | 3 |
| 2 METHODE | 4 |
| 2.1 Vaststellen van de optimale samenstelling van de extractievloeistof | 4 |
| 2.2 Vergelijking van de methoden | 4 |
| 2.2.1 MMP en caseïnaat | 4 |
| 2.2.2 Nauwkeurigheid | 4 |
| 3 RESULTATEN | 5 |
| 3.1 Optimale samenstelling van de extractievloeistof | 5 |
| 3.2 Vergelijking van de methoden | 8 |
| 3.2.1 MMP en caseïnaat | 8 |
| 3.2.2 Caseïnaten en nauwkeurigheid | 9 |
| 4 CONCLUSIES | 9 |
| 5 LITERATUUR | 10 |

1 INLEIDING

Conventionele methoden om vet kwantitatief te bepalen in droge melkproducten zijn arbeidsintensief, verbruiken veel brandbare, organische oplosmiddelen en behoeven speciale veiligheidsvoorzieningen. In dit onderzoek wordt gekeken of ASE een geschikt alternatief kan zijn. De methode is gebaseerd op een applicatie van Dionex (1) en een onderzoek van Richardson (2001). In het onderzoek van Richardson wordt i.e.i. uitgegaan van een mengsel van hexaan, dichloormethaan (DCM) en methanol. Hexaan wordt in het onderzoek later vervangen door petroleumether omdat deze minder giftig en goedkoper is.

In geval van caseïnaat wordt er een eis gesteld aan het maximale vet & as gehalte (EU verordening 2921\90). Dit betekent dat er geen exact getal gegeven hoeft te worden wanneer aan de eis wordt voldaan. Afwijkingen in de gehalten bij vergelijking tussen de ASE-methode en de referentiemethode, mits binnen te stellen grenzen, zijn dan niet perse onacceptabel. Bevestiging van monsters kan met de referentiemethode gebeuren.

Het doel van het onderzoek is het vinden van het optimale extractiemengsel dat het vetgehalte geeft wat vergelijkbaar is met de referentiemethode (RSV A0656). Tevens wordt gekeken of hexaan vervangen kan worden door petroleumether.

1.1 Principe

De extractie wordt uitgevoerd onder hoge temperatuur en druk met een mengsel van organische oplosmiddelen. De polariteit van het mengsel is bepalend voor het optimaal extraheren van het vet. Door een te hoge polariteit kunnen er teveel niet-vet bestanddelen worden geëxtraheerd en met een te lage polariteit kan vet achterblijven in het monster.

In de referentiemethode voor caseïnaat wordt het product eerst opgelost in water en ontsloten met een zure hydrolyse waarna het vet geëxtraheerd wordt met diëthylether en petroleumether.

1.2 ASE versus A0656

Werkschema's van de beide analyse methoden zijn als bijlage 1 bijgevoegd.

De overeenkomst tussen beide methoden is het inwegen van het monster en het droogproces in de stoof.

De capaciteit is voor beide methoden 24 buizen per keer.

De verschillen zijn hieronder getabelleerd voor 24 buizen;

| ASE | A0656 |
|--|--|
| extractie gebeurt per monster, duurt 8 uur, kan overnacht plaatsvinden | alle monsters worden gelijktijdig geëxtraheerd, duurt 2 uur, kan alleen overdag |
| 45 min. indampen in turbovap | 45 min. indampen op warmhoudplaatje |
| extractie gaat automatisch, weinig handelingen | extractie gaat handmatig, meer handelingen |
| 600 ml extractiemiddel | 2200 ml extractiemiddel |
| geen speciale voorzieningen nodig afgezien van een goede zuurkast | Speciale werkomgeving nodig i.v.m. de hoge vlambaarheid van de extractiemiddelen |

Praktisch gezien biedt de ASE veel voordelen;

- Mits de extractie overnacht gebeurt is er een tijdwinst van ongeveer 2 uur.
- Doordat de extractie automatisch is zijn het aantal handelingen veel minder.
- Een besparing van ongeveer 1500 ml organisch oplosmiddel per 24 buizen.
- De bepaling kan in een zuurkast op het lab plaatsvinden, geen etherlokaal nodig.

2 METHODE

2.1 Vaststellen van de optimale samenstelling van de extractievloeistof

Er worden 3 producten onderzocht; magere melkpoeder, caseïnaat en kunstmelkvoeder (KUVVO). 2 g van het product werd in bewerking genomen.

tabel 2.1 *gegevens monsters*

| | <i>vetgehalte ref. methode (%)</i> | <i>r (%)</i> | <i>RSV</i> |
|------------------|--|--------------|------------|
| MMP | 1% | 0,1 | A0756 |
| caseïnaat | 0,62% | 0,1 | A0656 |
| KUVVO | 20,7% | 0,4 | A0732 |

De extractie condities zijn conform de applicatie van Dionex. Volgens Richardson levert verhogen van de temperatuur een hogere recovery van het vet en wordt de extractie temperatuur daarom 90°C i.p.v. 80°C. Na de extractie worden de monsters bij 50 °C in 20 min. droog gedampt in de Zymark Turbovap. De Turbovap heeft een capaciteit van 6 monsters. Extractie en indampen van 6 monsters duurt totaal ongeveer 2 uur.

De buizen waarin de extractie vloeistof wordt opgevangen, worden voor de extractie 1 uur gedroogd bij 102°C, vervolgens 30 min. afgekoeld in een exsiccator met silicagel en gewogen. Na het indampen wordt dit herhaald.

Monsters worden in triplo geanalyseerd.

2.2 Vergelijking van de methoden

2.2.1 MMP en caseïnaat

Na het vaststellen van de optimale samenstelling van de extractievloeistof worden een aantal monsters MMP en caseïnaat uit het reguliere aanbod geanalyseerd waarvan het vetgehalte met de referentiemethode reeds bepaald is.

Deze monsters worden in duplo geanalyseerd en het gemiddelde wordt vergeleken met het gehalte dat gevonden is met de referentie methode.

2.2.2 Nauwkeurigheid

Om wat meer gegevens te verkrijgen over de nauwkeurigheid van de ASE-methode worden 3 x 9 caseïnaat monsters op vet geanalyseerd met de referentiemethode en met de ASE-methode. De resultaten worden met behulp van een t-toets met elkaar vergeleken.

3 RESULTATEN

3.1 Optimale samenstelling van de extractievloeistof

Extracties werden eerst met een extractiemiddel uitgevoerd dat hexaan, dichloormethaan en methanol bevatte. Daarnaast werd dezelfde extractie gedaan met petroleumether i.p.v. hexaan. Uit tabel 3.1, 3.2 en 3.3 blijkt dat extractie met petroleumether i.p.v. hexaan vrijwel dezelfde vetgehalten en herhaalbaarheid r geeft. In de volgende experimenten werd petroleumether gebruikt.

De herhaalbaarheid r is voor MMP en caseïnaat in een aantal gevallen hoger dan 0,1. Dit kan verbeteren door toenemen van de vaardigheid in de methode.

De extractie van de KUVVO werd i.e.i. in een buis van 11 cm uitgevoerd. Extractie van 2 g materiaal met een hoog vetgehalte geeft verlies aan recovery (Richardson 2001). In zo'n geval is het beter om 1 g te extraheren. Voor KUVVO's is dit echter geen optie omdat het monster niet zo homogeen is als b.v. volle melkpoeder, waardoor er een grotere spreiding kan ontstaan. Een alternatief is het gebruik van een extractiebuis van 22 cm. Uit de resultaten in tabel 3.3 blijkt dat er inderdaad een hoger vetgehalte werd gevonden, het verschil is echter niet significant. Voor de zekerheid werd in de opvolgende analyses de buis van 22 cm gebruikt voor de KUVVO's.

tabel 3.1 *Vetgehalte, sd en r van MMP bij verschillende extractiemengsels*

| <i>extractie vloeistof</i> | <i>H : DCM : M</i> | | | <i>PE : DCM : M</i> | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------|----------|-----------------------|-----------|----------|
| | <i>vetgehalte (%)</i> | <i>sd</i> | <i>r</i> | <i>vetgehalte (%)</i> | <i>sd</i> | <i>r</i> |
| 5 : 2 : 1 | 0,556 | 0,067 | 0,186 | 0,509 | 0,019 | 0,054 |
| 2 : 2 : 1 | 1,097 | 0,056 | 0,158 | 1,165 | 0,174 | 0,487 |
| 1 : 1 : 1 | 1,754 | 0,064 | 0,180 | 1,543 | 0,078 | 0,219 |

tabel 3.2 *Vetgehalte, sd en r van een caseïnaat monster bij verschillende extractiemengsels*

| <i>extractie vloeistof</i> | <i>H : DCM : M</i> | | | <i>PE : DCM : M</i> | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------|----------|-----------------------|-----------|----------|
| | <i>vetgehalte (%)</i> | <i>sd</i> | <i>r</i> | <i>vetgehalte (%)</i> | <i>sd</i> | <i>r</i> |
| 2 : 2 : 1 | 0,512 | 0,021 | 0,060 | 0,640 | 0,037 | 0,104 |
| 1 : 1 : 1 | 0,763 | 0,047 | 0,131 | 0,803 | 0,023 | 0,064 |
| 2 : 3 : 3 | 1,181 | 0,039 | 0,109 | 1,198 | 0,021 | 0,059 |

tabel 3.3 *Vetgehalte, sd en r van een KUVVO monster bij verschillende extractiemengsels*

| <i>extractie vloeistof</i> | <i>H : DCM : M</i> | | | <i>PE : DCM : M</i> | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------|----------|-----------------------|-----------|----------|
| | <i>vetgehalte (%)</i> | <i>sd</i> | <i>r</i> | <i>vetgehalte (%)</i> | <i>sd</i> | <i>r</i> |
| 5 : 2 : 1* | 17,177 | 0,424 | 1,186 | 17,305 | 0,477 | 1,336 |
| 5 : 2 : 1** | | | | 17,857 | 0,301 | 0,842 |

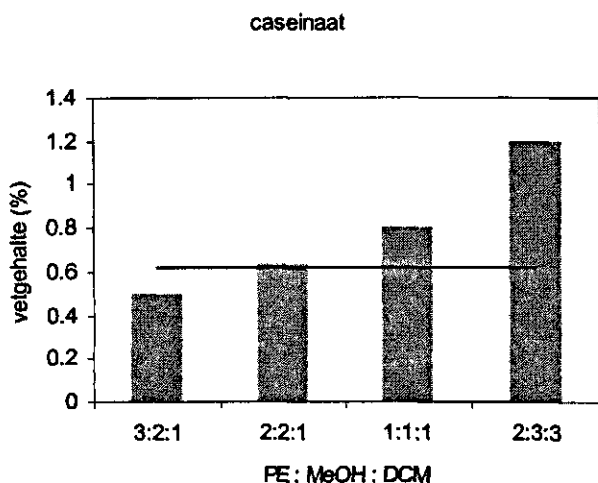
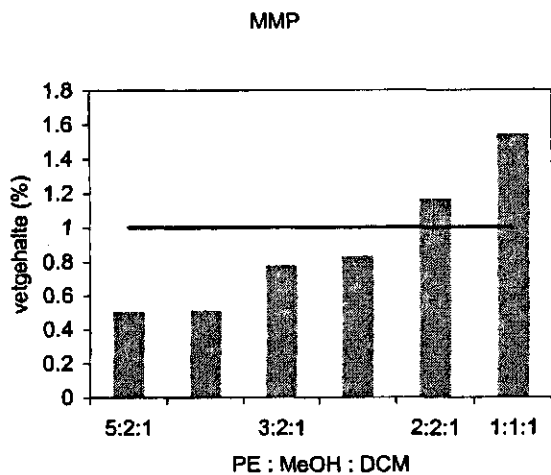
* extractiebuis van 11 cm

** extractiebuis van 22 cm

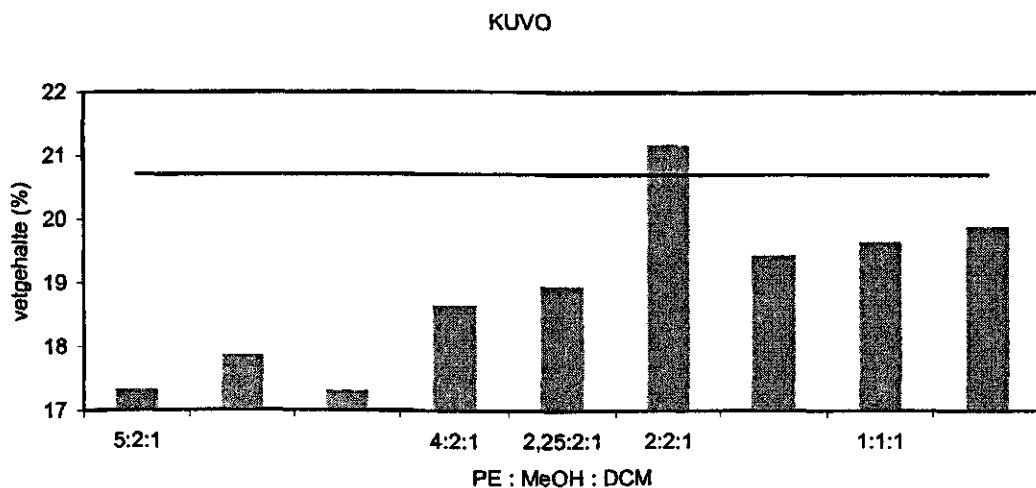
In staafdiagrammen 3.1 t/m 3.3 staan de vetgehalten uitgezet tegen de samenstelling van de extractievloeistof in toenemende polariteit. De horizontale streep geeft het niveau van het vetgehalte aan gemeten door de referentiemethode.

Voor alle producten blijkt het gevonden vetgehalte toe te nemen met toenemende polariteit van het extractiemiddel. Het optimum ligt voor MMP en caseïnaat bij de verhouding 2 : 2 : 1 van het mengsel PE : DCM : M.

De optimale verhouding is voor de KUVO nog niet gevonden (grafiek 3.3). De gehalten als functie van de verhouding oplosmiddelen geven geen lineair verband zoals voor MMP en caseïnaat. Dit is waarschijnlijk toe te schrijven aan de inhomogeniteit van de KUVO.



Staafdiagram 3.1 en 3.2, *Invloed van de toenemende polariteit van de extractievloeistof op de analyse van het vetgehalte van MMP en caseinaat.*



Staafdiagram 3.3. *Invloed van de toenemende polariteit van de extractievloeistof op de vetextractie van KUVO.*

3.2 Vergelijking van de methoden

3.2.1 MMP en caseïnaat

Resultaten staan in tabel 3.4 en 3.5 waarbij het extractiemiddel bestaat uit petroleumether, dichloormethaan en methanol. Voor het verschil, werd het vetgehalte gevonden met de ASE-methode afgetrokken van het vetgehalte gevonden met de referentiemethode.

Uit de analyse van de eerste 3 MMP monsters blijkt het vetgehalte te hoog met extractiemiddel 2 : 2 : 1, in vergelijking met de vetgehalten gevonden met de referentiemethode. Het extractiemiddel was blijkbaar te polair. Hierop werden de monsters nogmaals geanalyseerd met 2,45 : 2 : 1. Deze verhouding was ook als optimum gevonden door Richardson (2001). De vetgehalten blijken nu beter overeen te komen. Er zijn echter wel vrij grote verschillen in de vetgehalten tussen de ASE- en de referentiemethode die per monster wisselen.

Uit de resultaten van de caseïnaten blijkt het verschil minder groot te zijn tussen de beide extractiemiddelen. Het vetgehalte van de zure caseïnaat is met de verhouding 2,45 : 2 : 1 echter veel te laag, de verhouding 2:2:1 lijkt beter. Het verschil met de referentiemethode blijft voor zure caseïnaat echter groot. Voor de overige caseïnaten blijkt er net als bij MMP verschil te zijn tussen de beide methoden, echter minder groot.

tabel 3.4 *vetgehalte (%) in MMP monsters en het verschil tussen de referentiemethode en de ASE-methode*

| <i>monster</i> | | | | <i>verschil</i> | |
|----------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| | <i>2 : 2 : 1</i> | <i>2,45 : 2 : 1</i> | <i>ref. methode</i> | <i>2 : 2 : 1</i> | <i>2,45 : 2 : 1</i> |
| 81518 | 0,847 | 0,619 | 0,7 | -0,147 | 0,081 |
| 81512 | 0,944 | 0,675 | 0,6 | -0,344 | -0,075 |
| 81627 | 1,008 | 0,842 | 0,7 | -0,308 | -0,142 |
| 81080 | | 0,963 | 0,9 | | -0,063 |
| 81791 | | 0,726 | 0,7 | | -0,026 |
| 82040 | | 0,772 | 0,6 | | -0,172 |

tabel 3.5 *Vetgehalte (%) in caseïnaat monsters en het verschil tussen de referentiemethode en de ASE-methode*

| <i>monster</i> | | | | <i>verschil</i> | |
|----------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| | <i>2 : 2 : 1</i> | <i>2,45 : 2 : 1</i> | <i>ref. methode</i> | <i>2 : 2 : 1</i> | <i>2,45 : 2 : 1</i> |
| 79276 | 0,498 | | 0,45 | -0,048 | |
| 79273 | 0,360 | | 0,38 | 0,020 | |
| 80769 | 0,352 | | 0,38 | 0,028 | |
| 78211 * | 0,887 | 0,817 | 1,36 | 0,473 | 0,527 |
| 81400 | 0,456 | 0,402 | 0,42 | -0,036 | 0,016 |
| 81873 | 0,407 | 0,354 | 0,38 | 0,026 | -0,027 |
| 82026 | 0,355 | | 0,37 | 0,015 | |
| 82034 | 0,635 | | 0,63 | -0,005 | |
| 82037 | 0,560 | | 0,48 | -0,120 | |

* zure caseïnaat

3.2.2 Caseïnaten en nauwkeurigheid

27 caseïnaat monsters werden gemeten.

Uit de analyses van de eerste monsters bleek al snel (resultaten niet weergegeven) dat het vetgehalte te laag uitviel t.o.v. de referentiemethode. Daarom werd in alle volgende analyses de verhouding in de extractievloeistof veranderd naar 2,25:2:1.

Er werd een two-sample t-toets op de resultaten uitgevoerd, tabel 3.6. De zure caseïnaten zijn niet meegenomen in de t-toets.

Het gemiddelde vetgehalte van de caseïnaten gemeten met de referentie methode is 0,513 % en gemeten met de ASE methode is 0,416%. De t-toets geeft een berekende T die groter is dan de getabelleerde t wat betekent dat er een significant verschil is tussen de 2 analyse methoden. Dit verschil kan mogelijk verkleind worden door de extractievloeistof verder te optimaliseren.

Uit de vergelijking van de referentiemethode met de ASE-methode blijkt verder dat de spreiding in de gehalteverschillen vrij groot is, tussen -0,120 % en 282 %. Met het optimaliseren van de extractievloeistof zal deze spreiding naar verwachting niet kleiner worden.

Een mogelijke oorzaak van dit probleem kan liggen in de heterogeniteit van de caseïnaten. Een caseïnaatmonster is meestal een mengsel van caseïnaten en er zijn verschillende productiemethoden. Hierdoor kan b.v. het zoutgehalte van het caseïnaatmonster variëren wat van invloed kan zijn op de mate van extractie.

Voor zure caseïnaten blijken de verschillen nog groter. De extractie blijkt voor zure caseïnaten niet volledig te zijn.

tabel 3.6 *Two Sample t-toets*

| | <i>referentie</i> | <i>ASE</i> |
|------------------------------|-------------------|------------|
| Gemiddelde | 0.447917 | 0.375063 |
| Variantie | 0.005965 | 0.008205 |
| aantal metingen | 24 | 24 |
| Gepoolde variantie | 0.007085 | |
| df | 46 | |
| T berekend | 2.998302 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 0.002184 | |
| t eenzijdig | 1.678659 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 0.004369 | |
| t tweezijdig | 2.012894 | |

4 CONCLUSIES

Hexaan kan vervangen worden door petroleumether.

De optimale verhouding van de oplosmiddelen voor MMP is 2,45:2:1 en voor caseïnaat 2,25:2:1. Voor KUVU's is het optimum niet vastgesteld.

De vetgehalten van caseïnaat en MMP verkregen met de ASE-methode zijn niet conform de vetgehalten verkregen met de referentiemethode. Dit verschil kan mogelijk verkleind worden door de verhouding van de oplosmiddelen in de extractievloeistof verder te optimaliseren.

Voor de zure caseïnen zal een andere samenstelling van extractievloeistoffen gebruikt moeten worden.

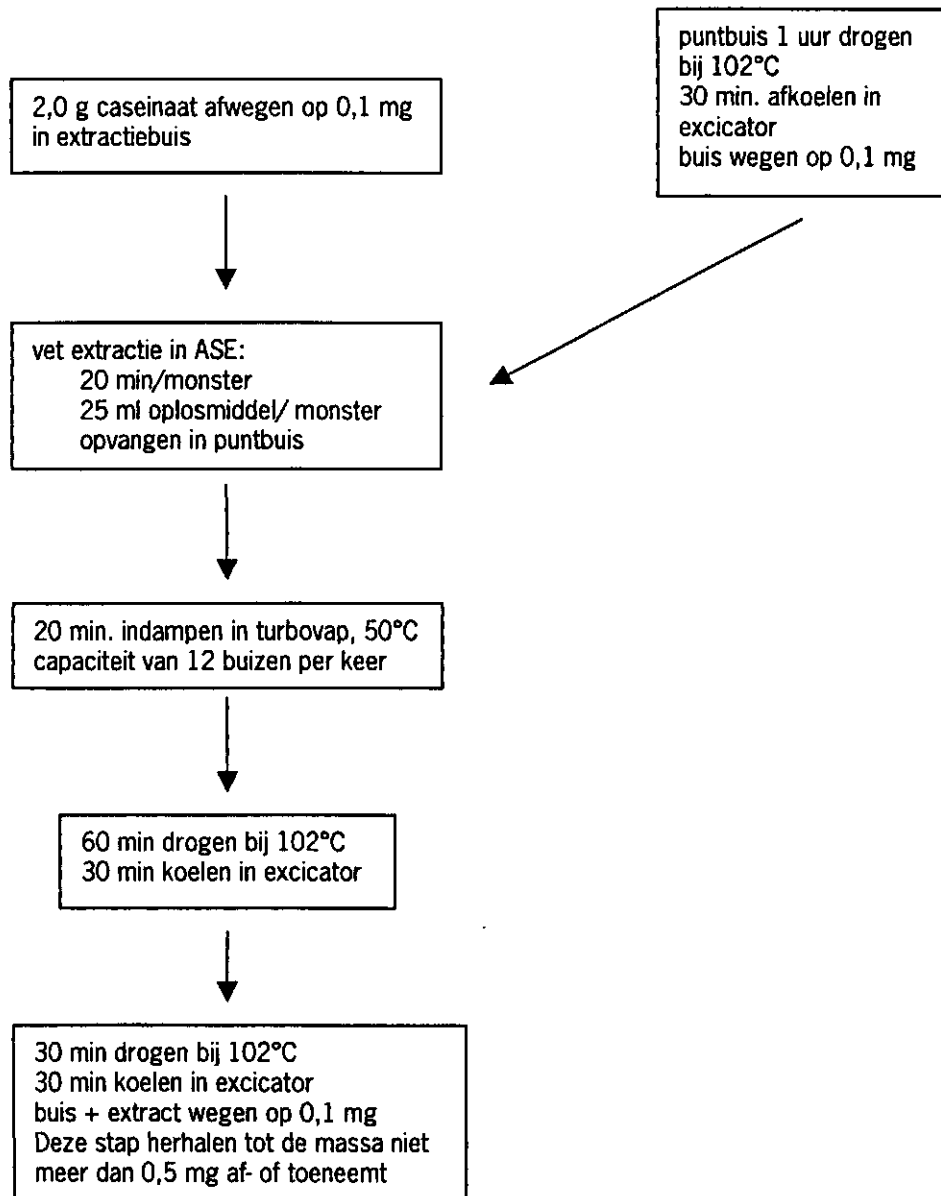
Uit het onderzoek kan geconcludeerd worden dat de ASE-methode voor de kwantitatieve analyse van vet in caseïnen niet voldoet.

5 LITERATUUR

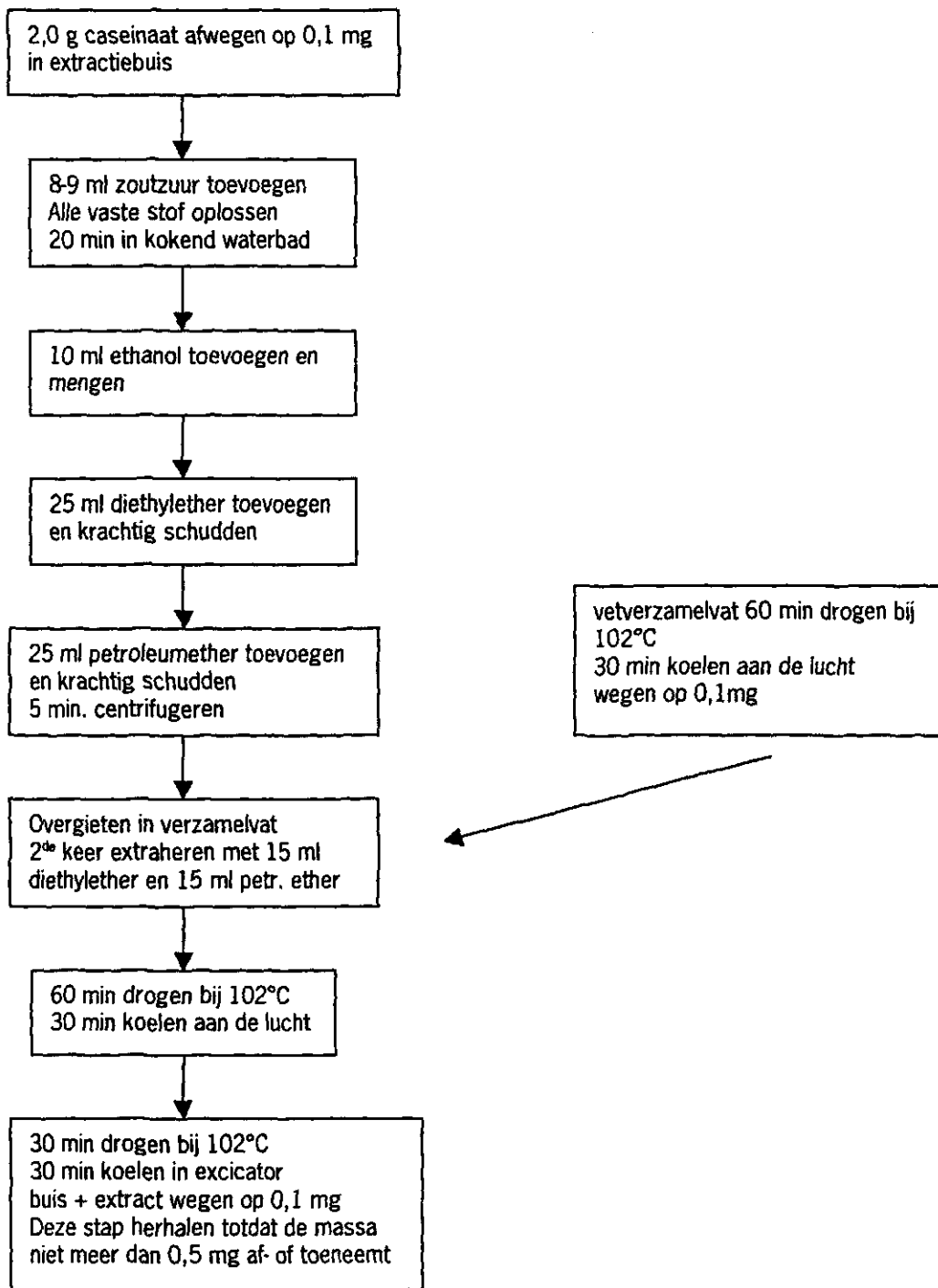
- 1 DIONEX Application Note 340, Determination of fat in dried milk products using accelerated solvent extraction (ASE).
- 2 Richardson, Russell K., Determination of fat in dairy products using pressurized solvent extraction (2001), *J. of AOAC Int.* **84** 1522-1533

BIJLAGE 1

Vetgehalte bepaling in caseinaat m.b.v. ASE



Vetgehalte bepaling in caseinaat, A0656



BIJLAGE 2

Het vetgehalte per monster gemeten met de referentie- en ASE-methode en het verschil tussen deze.

| <i>monster</i> | <i>vetgehalte (%)</i> | | |
|----------------|-----------------------|------------|-----------------|
| | <i>ref. methode</i> | <i>ASE</i> | <i>verschil</i> |
| 84494 | 0,217 | 0,39 | 0,173 |
| 84497 | 0,469 | 0,41 | -0,059 |
| 84500 | 0,641 | 0,54 | -0,101 |
| 84784 | 0,449 | 0,52 | 0,071 |
| 84785 | 0,344 | 0,55 | 0,206 |
| 84786 | 0,416 | 0,51 | 0,094 |
| 84787* | 0,774 | 0,92 | 0,146 |
| 84788 | 0,269 | 0,44 | 0,171 |
| 84789 | 0,406 | 0,54 | 0,134 |
| 84806 | 0,383 | 0,43 | 0,047 |
| 84807 | 0,298 | 0,33 | 0,032 |
| 84863* | 0,774 | 1,18 | 0,406 |
| 84864* | 0,702 | 1,01 | 0,308 |
| 85384 | 0,377 | 0,32 | -0,057 |
| 85387 | 0,430 | 0,31 | -0,120 |
| 84790 | 0,417 | 0,5 | 0,083 |
| 85390 | 0,376 | 0,34 | -0,036 |
| 85393 | 0,353 | 0,38 | 0,027 |
| 87848 | 0,401 | 0,46 | 0,059 |
| 87851 | 0,482 | 0,5 | 0,018 |
| 87854 | 0,331 | 0,45 | 0,119 |
| 87857 | 0,370 | 0,41 | 0,040 |
| 87860 | 0,424 | 0,58 | 0,156 |
| 87861 | 0,337 | 0,45 | 0,113 |
| 87862 | 0,282 | 0,43 | 0,148 |
| 87863 | 0,238 | 0,52 | 0,282 |
| 87864 | 0,292 | 0,44 | 0,148 |

* zure caseinaat