

Afdeling Koolhydraat- en Vetchemie

RAPPORT 83.59

Datum: 1983-10-15

Pr.nr. 505.3000

Onderwerp: Onderzoek en analysemethoden
voor het aantonen van gefrak-
tioneerd botervet.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA + Van Slooten, sektorhoofd,
afdeling Koolhydraat- en Vetchemie, afdeling
Normalisatie/harmonisatie (Humme), projektbeheer,
WVC de Koe, NIZO Badings, KvW Olieman.

Afdeling Koolhydraat- en Vetchemie.

Datum: 1983-10-15

RAPPORT 83.59

Pr.nr. 505.3000

Project: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor oliën, vetten, vetprodukten en oliezaden.

Onderwerp: Onderzoek en analysemethoden voor het aantonen van gefraktioneerd botervet.

Doel:

Ontwikkeling van een methode voor het aantonen van gefraktioneerd botervet.

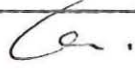
Samenvatting:

Voor het aantonen van gefraktioneerd botervet zijn de analyses van de vetzuursamenstelling, vetzuren in 2 positie, cholesterolgehalte en triglyceridesamenstelling onvoldoende.

Een meer betrouwbare detektiemethode werd ontwikkeld, gebaseerd op de kristallisatie van vnl. de verzadigde hogere triglyceriden in hexaan bij 12,5°C. Normaal botervet geeft daarbij geen kristallisatie terwijl gefraktioneerd botervet tot 15% kristal massa oplevert. Indien meer dan 0,5% kristallen worden gevonden dan is de aanwezigheid van gefraktioneerd botervet duidelijk aangetoond. Met in principe dezelfde methode is aantonen van de zachte fraktie mogelijk.

Conclusie:

Kristallisatie van botervet in hexaan bij 12,5°C is een betrouwbare methode voor het aantonen van gefraktioneerd botervet. De Engelse versie van dit rapport werd aangeboden aan IDF/AOAC Seminar organisatoren ter publikatie in de proceedings maart 1984 te Reading (Eng.).

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse 

Medewerker/samensteller: H.J. van der Kamp 

Projectleider: drs B.G. Muuse

1. Onderwerp

Kristallisatie van hoogsmeltende triglyceriden als methode voor het aantonen van gefractioneerd botervet.

Summary

A new method for the detection of fractionated butterfats by crystallisation of the higher melting saturated triglycerides.

The detection of fractionated butterfat in mixtures with normal butterfat is not possible by the analysis of fatty acid profile, fatty acids in 2-position, cholesterol amount or the classical analysis.

Analysis of the triglycerides by capillary gaschromatography with fused silica CP Sil 5 CB gave separations of the triglycerides by carbon number and (un-)saturation degree. Of particular interest was the separation of TG's C44-54 in MMS, MSS and SSS. For only the SSS triglycerides were increased during fractionation.

Those increased triglycerides were isolated by crystallisation of these fats in hexane at 12,5°C.

They consist of nearly only C14:0, C16:0 and C18:0 fatty acids.

Normal butterfat from either summer or winter season did not produce crystals under specified conditions. Any addition of hard fractionated butterfat to normal butterfat gave a linear increase of the amount of crystals.

Hard fractionated butterfats gave different amounts of crystals, depending on the degree or type of fractionation. Up to 15% crystals were found. With the method 0,1% of crystals could be determined.

Obviously when more than 0,5% crystals is found, the occurrence of hard fractionated butterfat is proven.

Based on the same principle, the detection of soft fractionated butterfat is possible as well but with less sensitivity than in case of hard fractionated butterfat.

2. Inleiding

Botervet kan gefractioneerd worden met fysische of chemische technieken. In Nederland wordt voor botervet uitsluitend het fysische procédé toegepast. Andere procédés zijn niet toegestaan.

Bij deze bewerking wordt botervet gesmolten, vervolgens partieel gekristalliseerd door langzame afkoeling en tenslotte worden de gevormde kristallen afgefiltreerd door middel van een vacuumfilter. De afgescheiden kristalmassa bevat ongeveer 70% ingesloten vloeibaar botervet (1). Naast deze harde hoogsmeltende fraktie wordt een zachte, vloeibare fraktie verkregen.

Het is vooral de harde fraktie waar de banketbakkerij in is geïnteresseerd voor de bereiding van korst- en bladerdeegprodukten (croissants, korstgebak e.d.) (2). Meer en meer worden deze harde frakties van botervet toegepast in het nederlandse banket en chocolade. De zachte fraktie vindt haar toepassing vrijwel uitsluitend in de ijsbereiding. De aanduiding boter of roomboter is aan stringente regels onderworpen. Het gebruik van gefractioneerd botervet is aanleiding om te overwegen dit op te nemen in de aanduidingen van de ingrediënten. Om deze aanduiding vervolgens op juistheid te toetsen werd in het kader van de "Studiegroep - Aantonen van gefractioneerd botervet" van de Nederlandse Wetenschappelijke Commissie voor Melk en Zuivelprodukten een methode ontwikkeld.

In de literatuur worden veranderingen o.i.v. fraktioneren aangegeven voor een reeks van kenmerken. Deze kengetallen van botervet worden door het fraktioneren echter zo weinig beïnvloed dat ze niet of nauwelijks buiten de grenzen liggen die voor normaal botervet worden gebruikt (3,4). In de vetzuursamenstelling is de verschuiving in de 18:0/18:1 verhouding het meest opvallend (4,5,6, 8,9,10,11). De langketen verzadigde vetzuren zijn in toenemende mate aanwezig in harde botervetfrakties, hetgeen in combinatie met een laag boterzuur- en capronzuurgehalte enige indicatie geeft voor de aanwezigheid van harde botervetfrakties (tabel 1).

Preferentie van vetzuren met een ketenlengte vanaf C12 voor de middenpositie van de triglyceriden is bij alle frakties nagenoeg hetzelfde (tabel 2). Hieruit is geen enkele indicatie te verkrijgen voor de aanwezigheid van harde of zachte botervetfrakties.

Het cholesterol in botervet komt na de fraktionering relatief minder voor in de harde fraktie dan in de zachte fraktie (tabel 3). Het verschil is echter te gering om kleinere hoeveelheden harde fraktie aan te tonen.

In de triglyceridesamenstelling is met name een toename geconstateerd in de triglyceriden met langketen verzadigde vetzuren van C46-54 (6,7,8,10).

Parodi (12,14,15) vond met Ag^+ DLC in de harde frakties vooral een verhoging van de triglyceridegroepen SSS, $\text{SSM}_{\text{trans}}$ en SSM_{cis} (S = verzadigd, M = monoeen onverzadigd vetzuur).

De in de literatuur genoemde klassieke kengetallen: refraktometerindex, dichtheid en joodgetal geven nauwelijks veranderingen te zien (6,7,8). Het is vooral de hoeveelheid vaste stof die in harde frakties toeneemt en mogelijk een controlemethode biedt (7,8,10). Methoden die de hoeveelheid vaste stof bepalen zijn de caroteenbepaling in het totale vet en in het vloeibare deel van het vet (6,17), NMR bepaling van de kristallijnestof (8,17) en Differentieel Thermische Analyse (11,17).

De onderzochte en hier beschreven methode bepaalt de hoeveelheid vaste stof die door kristallisatie in hexaan bij 12,5°C ontstaat. Bij deze temperatuur vindt bij analyse van ongefractioneerde boter uit zowel de zomer- als de winterperiode geen kristallisatie plaats.

De vorming van enig kristal duidt derhalve op een verhoogd gehalte aan hoogsmeltende triglyceriden in het botervet en dus op fraktionering. In dit onderzoek wordt de triglyceridesamenstelling nader uitgewerkt als basis van dit onderzoek en wordt ingegaan op de kristallisatiemethode en de samenstelling van de daarbij verkregen kristal massa. Voorts wordt het resultaat vermeld van de toepassing van de ontwikkelde methode op diverse botervetten van verschillende aard en herkomst.

3. MATERIAAL EN METHODEN

Water en eiwitvrij botervet

Als studiemateriaal werd één partij botervet gebruikt ter bestudering van de methodiek. Daarna werden 97 botervetten onderzocht waarbij, indien voorhanden, zowel het oorspronkelijke botervet (19) als de daaruit bereide harde (19) en zachte frakties (4) werden geanalyseerd. Het betrof zowel zomer- (31) als winterboter (43). De monsters werden ontvangen van VIB, BCF, NIZO en uit eigen voorraad.

Of inderdaad sprake was van zomer- of winterboter werd gecontroleerd m.b.v. de vetzuurverhoudingen 18:1/16:0 en 18:0/14:0. Voor nederlandse zomerboter liggen deze verhoudingen gemiddeld beide op ca. 1,1 en voor winterboter beide op ca. 0,8 (zie tabel 4 en figuur 1) (13,18).

De botervetten die voor fraktionering gebruikt werden waren van nederlandse doch ook veelal van andere nationaliteit.

Analysemethoden

Vetzuursamenstelling. IUPAC 2.301 variant 5 (methylesterbereiding) en IUPAC 2.302 (capillair GC).

Triglyceridesamenstelling. RIKILT methode nr. 71 D 129 (Bijlage I)
Capillair gaschromatografische analyse met gaschromatograaf Varian 3700, kolom type CP Sil 5 CB Fused Silica, lengte ca. 10 m; 0,23 mm ID. Splitverhouding 1:20, injectievolume 1 µl van een 2% oplossing in hexaan.

Triglyceridefraktionering. RIKILT methode nr. 71 D 128 (Bijlage II).

4. RESULTATEN EN DISCUSSIE

Triglyceride-onderzoek

De toegepaste GCC analyse van de triglyceriden gaf een scheiding van de triglyceriden zowel met verschillend koolstofnummer als met een verschillend aantal dubbele banden. Traitler en Prévôt (16) publiceerden als een van de eersten deze triglyceridescheiding voor melkvet. Zij identificeerden de opgesplitste triglyceriden voor C54 als resp. 000, S00, SS0 en SSS in opeenvolgende retentietijd. De positionele isomeren werden daarbij niet gescheiden.

Ons onderzoek van de diverse botervetfrakties (hard, uitgangsmateriaal en zacht) gaf duidelijke verschillen tussen die frakties te zien in de triglyceride-samenstelling (tabel 5, figuur 2 a en b en chromatogrammen bijlage III). Evenals de vetzuursamenstelling gaf dit echter slechts een indicatie of botervet al dan niet gemengd is met gefractioneerd botervet.

Goed te zien was in grafiek 2b dat de frakties m.n. verschilden in het gehalte aan verzadigde triglyceriden (SSS) met hoge koolstofnummers C44-54.

In alle botervetten was daarnaast het basispatroon van het uitgangsmateriaal herkenbaar in de lagere triglyceriden C26-40 en de enkelvoudige (SSO) en tweevoudige (S00) onverzadigde triglyceriden van C44-54. Dit is verklaarbaar vanwege het hoge gehalte aan vloeibaar vet (70%) dat ook nog in de harde frakties voorkomt.

De geconstateerde toename van het gehalte aan C44-54 in de harde frakties (grafiek 2a) kan dus toegeschreven worden aan verrijking van de verzadigde triglyceriden (SSS). Dit laatste heeft ertoe geleid deze SSS triglyceride te isoleren om zodoende hun toename te benutten en daarmee fraktionering van botervet aan te tonen.

Kristallisatiemethode

Voor de afscheiding van de SSS triglyceriden C44 en hoger, werden de botervetten gekristalliseerd in hexaan bij 12,5°C.

Alleen bij een verrijking, door het fraktioneren, van SSS triglyceriden werd een kristallisatie van deze triglyceriden verkregen.

Eerste experimenten met herhaald wassen van de kristal massa met koude hexaan gaven een slechte reproduceerbaarheid met een standaarddeviatie van 1,5-3,0%. Een veel betere reproduceerbaarheid (SD 0,3% zie tabel 6) werd verkregen door invoering van een herkristallisatie en eenmalig uitwassen van de kristallen met hexaan van 4°C. De methode is een empirische methode waarbij sprake is van een gestandaardiseerde kristallisatietechniek waarbij geen volledige kristallisatie werd nagestreefd. De vetzuur- en triglyceridesamenstelling van de verkregen kristal massa is opgenomen in de tabellen 7 a en b. Een chromatogram van de triglyceridesamenstelling werd opgenomen in bijlage IV.

De lineariteit van de methode werd getoetst door het maken van een mengreeks uit gefractioneerd en niet gefractioneerd botervet (zie tabel 8 en figuur 3).

De grafiek laat zien dat bij de gekozen temperatuur en kristallisatieomstandigheden, de rechte lijn door de meetpunten door het nulpunt gaat van niet gefractioneerd botervet. Dit botervet kristalliseerde dus nog net niet.

Tevens blijkt hieruit dat de hoeveelheid botervet die in bewerking wordt genomen desnoods mag bestaan uit een tot 25 g aangevulde hoeveelheid botervet.

Daarbij moet het botervet waarmee wordt aangevuld, nog net geen kristallisatie vertonen. Dit kan van belang zijn voor het geval minder dan ca. 10 gr botervet voor handen is. Vanwege het werken bij verlaagde temperatuur lijkt het niet aan te bevelen om met kleinere hoeveelheden botervet en hexaan te werken in verband met temperatuursveranderingen van het oplosmiddel tijdens de bewerking.

De in Nederland gebruikelijke harde botervetfrakties geven bij deze methode tot 15% kristal massa (zie tabel 9) terwijl nog 0,1% kristal massa is te bepalen.

Door de eenvoud van de analyse en de nauwkeurigheid van de bepaling vormt deze kristallisatiemethode een gemakkelijke en goedkope methode voor het aantonen van gefractioneerd botervet.

Onderzoek van de 74 niet gefractioneerde botervetten heeft aangetoond dat geen van de monsters een kristal massa leverde. In twee gevallen werd 0,2% gevonden wat vermoedelijk te wijten was aan stolling van vloeibaar vet tijdens de filtratie. Wanneer meer dan 0,5% kristal massa wordt gevonden mag klaarblijkelijk gesproken worden van aanwezigheid van gefractioneerd botervet.

Interpretatie van het percentage kristal massa

Daar gefractioneerd botervet geen gestandaardiseerd produkt is, is niet zonder meer een percentage harde fraktie te berekenen. Dit is wel mogelijk indien een percentage bekend is van de kristal massa van een standaard harde fraktie. Dit percentage zal in de orde grootte van 10% liggen. In dat geval is aan te geven hoeveel procent van een harde fraktie herleid op standaard kwaliteit voorkomt. Voor het aantonen van gefractioneerd botervet is het echter voldoende om een grens vast te stellen waarboven gesproken kan worden van aanwezigheid van hard gefractioneerd botervet. Dit onderzoek geeft aan dat een grens van 0,5% kristal massa daarvoor verantwoord is.

Wanneer in een produkt ook andere vetten en met name geharde vetten voorkomen naast melkvet, dan kan een kristal massa verkregen worden die niet altijd hoeft te wijzen op harde frakties van botervet. Het aantonen van harde botervetfrakties zal derhalve altijd gepaard moeten gaan met het aantonen van de afwezigheid van onder de genoemde omstandigheden kristalliseerbare melkvreemde vetten.

Hiervoor staan genormaliseerde methoden ter beschikking zoals vetzuur-samenstelling, sterolgehalte en samenstelling, tocoferolanalyse e.d.

Zachte frakties

Ook voor het aantonen van de zachte fraktie van botervet is de methode in principe toepasbaar indien bij lagere temperatuur wordt gekristalliseerd.

In dat geval geeft het niet gefraktioneerde botervet een variabel hoog gehalte aan kristal massa afhankelijk van het soort botervet terwijl de zachte fraktie een gehalte geeft dat afhankelijk is van de mate van fraktioneren.

Door deze variaties in kristal massa gehalte zullen de aantoonbaarheids-grenzen veel ruimer gesteld moeten worden dan bij de harde fraktie het geval is.

Literatuur

Voor het literatuuronderzoek werd door het PUDOC een computeruitdraai geleverd op de trefwoorden die duiden op botervet, fraktionering, triglyceriden en analyse van.

Dit leverde met twee bestanden FSTA (Food Science and Technological Abstracts) en CAB (Chemical Abstracts of Dairy Science) resp. 78 en 88 literatuurverwijzingen die elkaar grotendeels overlappen.

1. J.E. Schaap en G.A.M. Rutten. Voedingsmiddelentechnologie (1974) 39, 8.
2. J.E. Schaap en J.C. Kim. Voedingsmiddelentechnologie (1981) 14, 23-25.
3. R.G. Black. Australian J. of Dairy Technol. (1973) 28, 116-119.
4. B.G. Muuse, H.J. v.d. Kamp. RIKILT rapport 83.3 (1983).
5. J.E. Schaap, H.T. Badings, D.G. Schmidt en E. Frede. Neth. Milk Dairy J. 29 (1975) 242-252.
6. H.T. Badings, J.E. Schaap, C. de Jong en H.G. Hagedoorn. Milchwissenschaft 38 (1983) 95-97.
7. H.T. Badings, J.E. Schaap, C. de Jong en H.G. Hagedoorn. Milchwissenschaft 38 (1983) 150-156.
8. J.M. de Man and M. Finoro. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 13 (1980) 13, 167-173.
9. H. Timmen. 19e IDF congres B 7 (1974) 491.
10. G. Lechat, P. Varchon, S. Kuzdzal-Savoie, D. Langlois, W. Kuzdzal. Le Lait (1975) mai-juin no. 545-546 p. 295-309.
11. Ch. Deroanne and A. Guyot. Bull. Rech. Agron Gembloux (1974) 9, 261-275.
12. P.W. Parodi. The Australian J. of Dairy Technol. March (1974) 20-22.
13. B.G. Muuse, H.J. v.d. Kamp. RIKILT rapport 82.100 (1982).
14. P.W. Parodi. J. of Dairy Res. (1981) 48, 131-148.
15. P.W. Parodi. The Australian J. of Dairy Technol. March (1980) 17-22.
16. H. Traitler, A. Prevot. J. of High. Resolution Chrom. and Chrom. Comm. (1981) 4, 109-114.
17. J.E. Schaap, G.A.M. Rutten. Neth. Milk Dairy J. (1974) 28, 166-174.
18. H. Hendrickx, A. Huyghebaert, H. de Moor 19e IDF Congres (1974) B 5, 230.

Tabel 1 Gemiddelde vetzuursamenstelling van hard-, zacht- en niet-gefraktioneerd botervet (4). (% FA/FA)

	hard	oorspr. botervet	zacht
C 4:0	3,3	4,0	4,2
C 6:0	1,8	2,2	2,3
C 8:0	1,1	1,3	1,3
C10:0	2,4	2,7	2,8
C12:0	3,3	3,3	3,4
C14:0	10,4	10,0	9,9
C16:0	27,0	24,5	23,9
C18:0	14,5	12,1	11,2
C18:1	24,5	27,5	28,0

Tabel 2 Percentage van het voorkomen van een vetzuur op de midden positie in de triglyceriden (preferentiepercentage) in hard- zacht- en niet-gefraktioneerd botervet (4).

	hard	oorspr. botervet	zacht
C12:0	48	49	51
C14:0	56	54	56
C16:0	41	39	39
C18:0	17	19	18
C18:1	26	25	24

Tabel 3 Procentueel gehalte aan cholesterol in hard-, zacht- en niet-gefraktioneerd botervet (4).

	hard	oorspr. botervet	zacht
cholesterol	0,231	0,278	0,291

Tabel 4 Vetzuursamenstelling van botervet gedurende de periode
juli 1981 - maart 1982 (13). Uitgedrukt in % FA/totaal FA

periode	juli	aug.	sept.	okt.	nov.	jan.	febr.	maart	gemiddeld
	1	2	3	4	5	6	7	8	
C 4:0	4,15	4,05	3,99	3,98	3,92	3,95	4,04	4,11	4,02
C 6:0	2,21	2,20	2,12	2,15	2,21	2,22	2,26	2,27	2,21
C 8:0	1,30	1,32	1,23	1,27	1,35	1,36	1,36	1,36	1,32
C10:0	2,73	2,78	2,54	2,68	2,92	3,01	2,99	2,98	2,83
C12:0	3,44	3,47	3,33	3,55	4,13	4,31	4,11	4,24	3,84
C14:0	10,29	10,42	10,20	10,35	11,39	11,73	11,51	11,55	10,97
C16:0	25,76	24,88	24,61	25,10	27,73	29,40	29,21	28,90	27,08
C18:0	11,41	11,77	11,64	11,01	10,04	9,78	10,16	10,24	10,69
C18:1	27,05	26,86	28,43	27,68	24,62	22,90	22,45	22,96	25,30
verhouding									
18:1/16:0	1,05	1,08	1,16	1,10	0,98	0,78	0,77	0,77	0,93
18:0/14:0	1,10	1,13	1,14	1,06	0,88	0,83	0,88	0,89	0,97

Tabel 5 Gemiddelde triglyceridesamenstelling van hard-, zacht- en niet-gefraktioneerde botervetten in procenten (opp./opp.)

C-nr.*	hard	oorspr. botervet	zacht
26	0,3	0,3	0,4
28	0,6	0,7	0,9
30	1,2	1,5	1,6
32	2,5	3,2	3,5
34	5,6	6,9	7,5
36	9,9	12,3	13,3
38	11,3	13,7	14,9
40	8,5	10,0	10,7
42	7,4	7,3	7,2
44 2+1	1,9	2,5	2,7
0	5,9	4,0	3,2
46 2+1	2,5	3,2	3,4
0	6,2	3,4	2,1
48 2+1	4,1	4,4	4,6
0	5,0	2,3	1,2
50 2	1,1	1,3	1,2
1	4,7	4,6	5,1
0	3,5	1,6	
52 2	2,1	2,6	2,8
1	2,5	2,2	2,3
0	1,4	0,4	0,0
54 3	0,4	0,5	0,6
2	0,6	0,8	0,8
1	0,4	0,5	0,4
0	0,3	0,0	0,0

* De code 0, 1, 2 en 3 bij de koolstofnummers heeft betrekking op het aantal dubbele bindingen in het triglyceride.

Tabel 6 Variatiecoëfficiënt van de kristallisatiemethode.

Gevonden waarden

1e dag 14,0 - 14,6%

2e dag 14,7%

3e dag 14,5 - 14,5%

Gem. 14,46 S.D. = 0,27% V.C. = 1,87%

Tabel 7 Samenstelling van de kristal massa.

a. Vetzuursamenstelling		b. Triglyceridesamenstelling	
C 4:0	0,1	C26	-
C 6:0	0,1	C28	-
C 8:0	0,1	C30	0,1
C10:0	0,3	C32	0,1
C12:0	1,0	C34	0,3
C14:0	9,4	C36	0,6
C16:0	40,1	C38	0,7
C18:0	36,9	C40	0,7
C18:1	5,1	C42	1,1
		C44:0	3,4
		C46:0	10,5
		C48:0	19,1
		C50:0	27,0
		C52:0	19,6
		C54:0	4,7

Tabel 8 Lineariteit van de kristallisatiemethode.

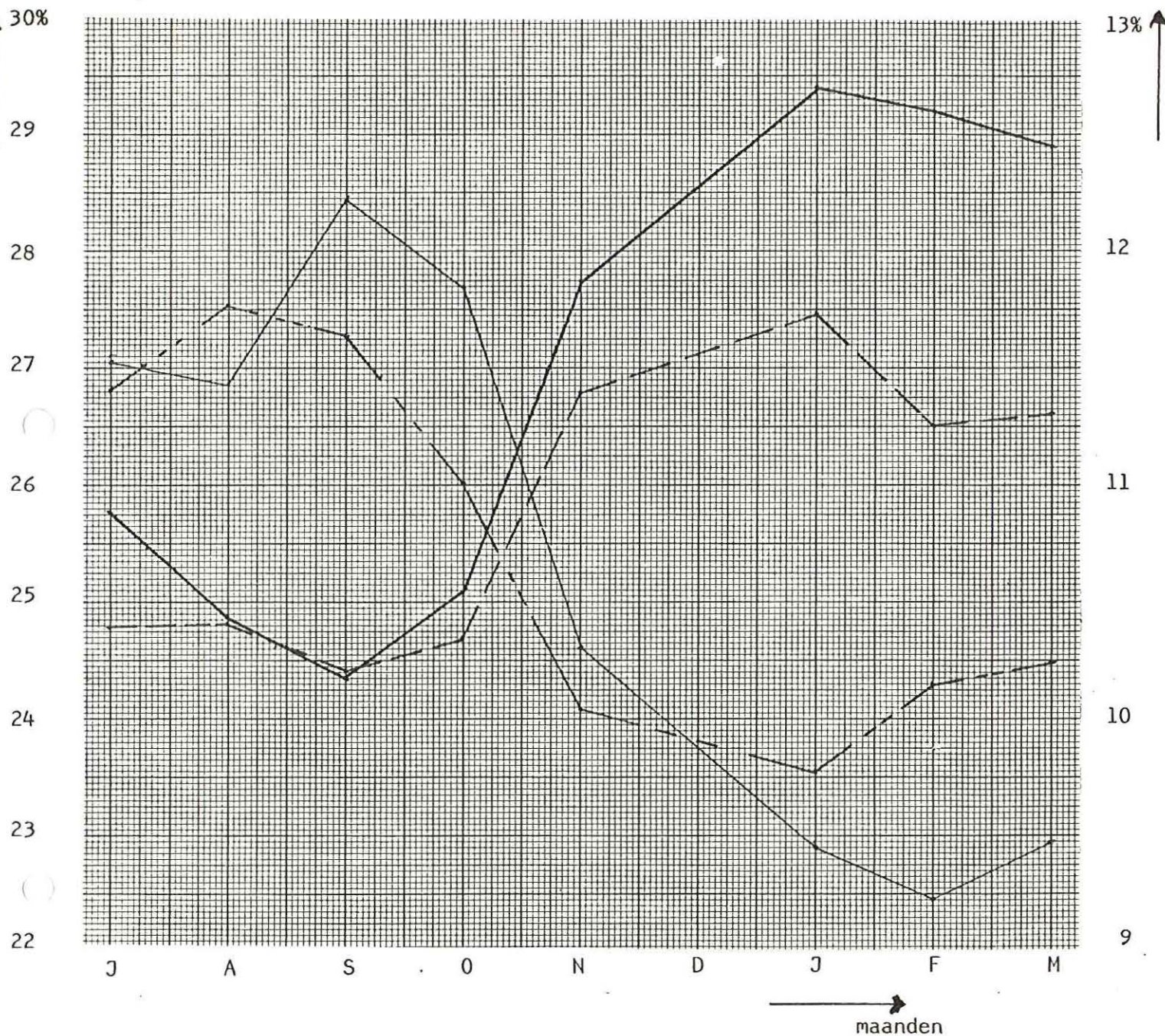
Procentuele mengverhouding	kristal massa
gefraktioneerde-niet gefractioneerde	percentage
100-0	10,0
80-20	9,3
60-40	5,9
40-60	4,3
20-80	2,3
0-100	< 0,1

Tabel 9 Percentage kristal massa van 19 monsters hard gefractioneerd botervet

4,3 - 5,1 - 5,4 - 5,4 - 5,5 - 7,9 - 8,0 - 8,2 - 8,8 - 9,1 - 10,0 -
11,4 - 11,9 - 11,9 - 13,6 - 13,6 - 13,8 - 14,8 - 15,4.

gehalte
C16:0
C18:1

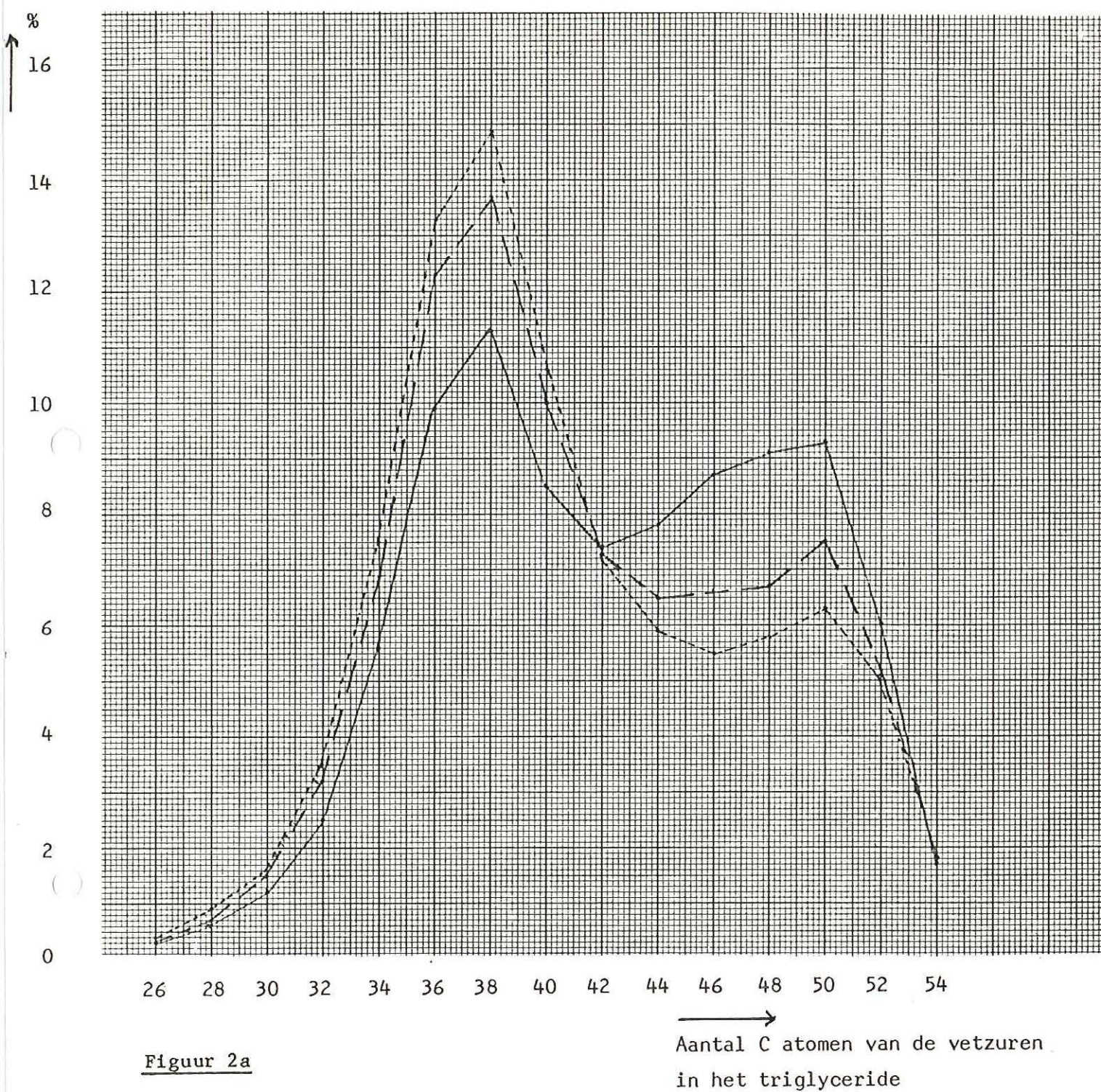
gehalte
C14:0
C18:0



Figuur 1

Seizoenvariatie in de vetzuurgehalten van 18:1, 18:0, 16:0 en 14:0

— — — — C14:0
 - - - - C18:0
 — — — — C18:1
 ————— C16:0

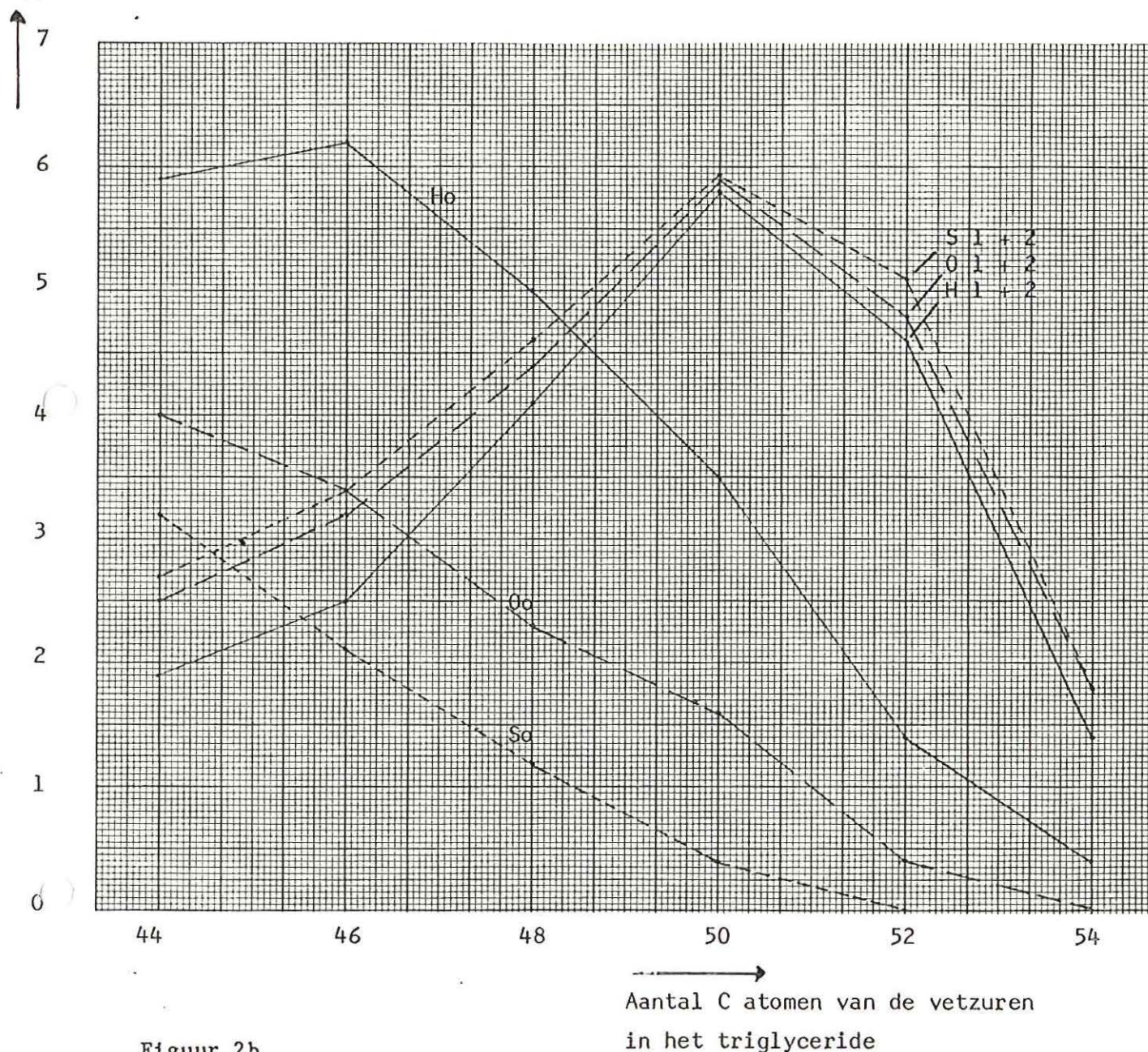


Figuur 2a

Triglyceridesamenstelling van resp. hard-, zacht- en niet gefractioneerd botervet.

zacht gefractioneerd botervet
 normaal botervet - - - - -
 hard gefractioneerd botervet ———

opp %

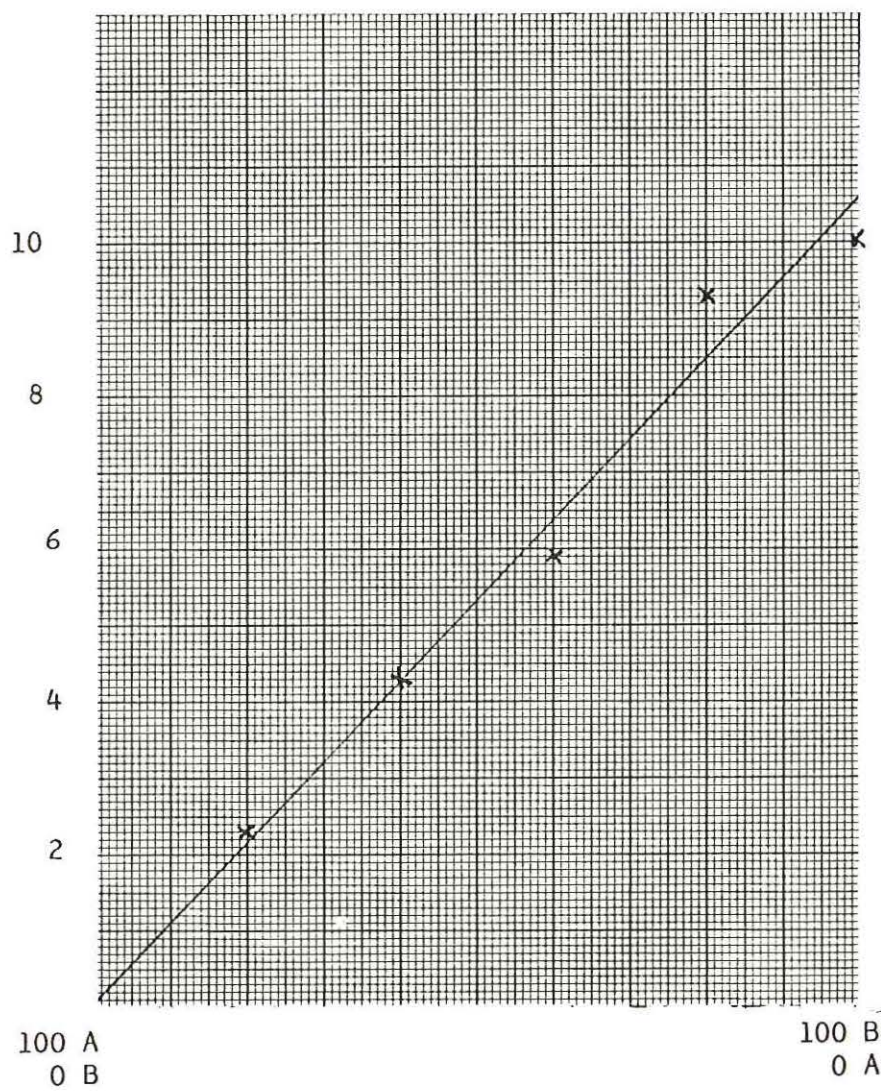


Figuur 2b

Triglyceridesamenstelling van resp. hard- en zacht gefractioneerd botervet en oorspronkelijk niet gefractioneerd botervet. De gehalten zijn weergegeven per koolstofnummer en gescheiden in verzadigde (0) en onverzadigde (1+2) triglyceriden.

zacht		0 = SSS	S = verz. vetz.
oorspronkelijk botervet	-----	1 = SS0	0 = onverz. vetz.
hard	—————	2 = S00	

percentage
kristal massa



Figuur 3

Procentuele mengverhouding.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. 71 D 129

1e oplage (1983-09-14)

PLANTAARDIGE EN DIERLIJKE OLIËN EN VETTEN - BEPALING VAN DE KWALITA-
TIEVE TRIGLYCERIDE SAMENSTELLING

Verzendlijst: Normalisatie/harmonisatie, sektorhoofd, Bibliotheek (5x),
afdeling Koolhydraat- Vetchemie (5x).

Plantaardige en dierlijke oliën en vetten - Bepaling van de kwalitatieve triglyceride samenstelling

1. Onderwerp

Deze methode beschrijft de kwalitatieve gaschromatografische bepaling van een mengsel van triglyceriden.

2. Toepassingsgebied

De methode is van toepassing bij het onderzoek van plantaardige en dierlijke oliën en vetten, welke triglyceriden bevatten met niet meer dan 54 C-atomen en met een percentage meervoudig onverzadigde vetzuren kleiner dan 5%.

3. Reagentia

- Draaggas : helium, zeer goed gedroogd en met een zuurstofgehalte van minder dan 10 mg/kg.
- Hulpgas : waterstof, zuiverheid ten minste 99,9%, organisch materiaal moet afwezig zijn; lucht, organisch materiaal moet afwezig zijn.
- Standaard : mengsel van triglyceriden of triglyceriden van een vet b.v. botervet.

4. Toestellen en hulpmiddelen

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

4.1 Gaschromatograaf, geschikt voor het gebruik van capillaire kolommen.

4.1.1 Injektor:

Moet geschikt zijn voor het gebruik van capillaire kolommen en uitgerust zijn met een splitter.

De temperatuur van de injektor moet minimaal 330°C zijn.

4.1.2 Oven:

De oven moet de kolommen tot ten minste 360°C kunnen verwarmen en de gekozen temperatuur op 1°C nauwkeurig kunnen aanhouden.

Temperatuurprogrammering van de oven is noodzakelijk.

4.1.3 Capillaire kolom:

4.1.3.1 Kolom:

Kolom moet van glas of fused silica zijn. De lengte van de kolom moet 10 tot 15 m zijn, de binnenmiddellijn 0,2 tot 0,5 mm.

4.1.3.2 Stationaire fase:

Apolaire fase (methyilsilicone gum rubber) zoals b.v. Se 30 of equivalenten zoals CP Sil 5).

De filmdikte moet minimaal 0,1 µm zijn.

De chemisch gebonden fasen op fused silica kolommen zijn te prefereren.

4.1.3.3 Conditionering

Conditioneer de kolom ca. 12 uur op de maximaal toegestane temperatuur onder een stroom van inert gas (1 ml/min).

4.1.4 Detektor:

De vlamionisatiedetektor moet op 350°C gebracht worden.

4.2 Injektiespuit van max. 10 µl.

4.3 Recorder.

4.4 Rekenapparatuur b.v. een integrator.

5. Monsterneming en voorbehandeling van het monster

Smelt het gehele monster op en homogeniseer. Los 100 µl monster op in 5 ml hexaan.

6. Werkwijze

6.1 Instellen van de gaschromatograaf.

6.1.1 Vaststellen van de optimale werkomstandigheden.

De monstergrootte dient zo te worden gekozen dat de respons in het lineaire gebied valt.

Verder moet rekening gehouden worden met het volgende:

- a. Temperatuur van injector en detector moet hoog ($> 330^{\circ}\text{C}$) zijn om condensatie van de hogere triglyceriden te voorkomen.
- b. Debiet van het draaggas. Voor helium geldt een optimale doorstroomsnelheid van ca. 30 cm/sec, voor stikstof van 16-18 cm/sec.
- c. Het make-up gasdebiet dient 30 ml/min, het waterstofdebiet 30 ml/min en het luchtdebiet > 300 ml/min te zijn.
- d. Stel de splitverhouding in op 1:50.

6.2 Analyse

6.2.1 Injekter 0,5 tot 2 μl van de hexaanoplossing (5).

6.2.2 Het monster moet afhankelijk van het te verwachten triglyceridepatroon geïnjecteerd worden bij een temperatuur van b.v. 260°C voor botervet, cocosvet en bij 320°C voor monsters met triglyceriden met 42 t/m 54 C-atomen, gevolgd door een temperatuurprogrammering naar 350°C met ca. $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

7. Interpretatie

7.1 Kwalitatief.

Bepaal uit een analyse van een standaardmengsel die onder dezelfde omstandigheden als voor het onderzoek van het monster is uitgevoerd de retentietijden voor de samenstellende triglyceridegroepen.

Opgemerkt dient te worden dat de triglyceriden in groepen worden opgedeeld die bepaald worden door het aantal koolstofatomen van de samenstellende vetzuren in het triglyceride.

Wel kunnen in deze groepen triglyceriden (b.v. C 54 opgebouwd uit glycerol met 3 stearinevetzuren) subgroepen aangegeven worden die bepaald worden door de onverzadigdheid en verschillende ketenlengte van de vetzuren in het triglyceride, doch ook elke subgroep is opgebouwd uit verschillende T.G.

De opsplitsing van de hoofdgroepen in subgroepen wordt vooral bepaald door het type kolom en de gaschromatografische condities.

7.2 Kwantifikatie.

Gebruik de methode van "interne normalisatie" waarbij wordt aangenomen dat alle in het monster aanwezige componenten elueren.

De absolute triglyceridesamenstelling is slechts semi-kwantitatief te bepalen doordat:

- a. een vet al gauw bestaat uit een honderdtal verschillende triglyceriden die niet of slechts ten dele van elkaar gescheiden worden;
- b. de korrektiefactoren alleen bij benadering bepaald kunnen worden, omdat niet alle standaardtriglyceriden verkrijgbaar zijn en de samenstelling van het monster niet bekend is.

Monsters kunnen het best met elkaar vergeleken worden aan de hand van een referentiemonster. Door een referentiemonster te nemen, wordt tevens inzicht verkregen in de interne reproduceerbaarheid.

Testen van het absolute niveau van het referentiemonster kan bij benadering gebeuren met standaardtriglyceriden.

Korrektiefactoren dienen daarbij grafisch uitgezet te worden waarbij tussenliggende waarden gelden voor ontbrekende standaardtriglyceriden.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Samensteller : H.J. van der Kamp

INVESTIGATION OF THE

REASON FOR THE

REASON FOR THE

REASON FOR THE

REASON FOR THE

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT 71 D 128

1e oplage (1983-07-08)

BOTERVET - AANTONEN VAN GEFRAKTIONEERD BOTERVET (HARDE FRAKTIE)

Verzendlijst: Normalisatie/harmonisatie, sektorhoofd, Bibliotheek (5x),
afdeling Koolhydraat- Vetchemie (5x).

Botervet - Aantonen van gefractioneerd botervet (harde fraktie)

1. Toepassingsgebied

De methode is uitsluitend toepasbaar op botervet.

2. Beginsel

Gefractioneerd botervet (harde fraktie) kan aangetoond worden door kristallisatie van de hoogsmeltende triglyceriden in hexaan bij 12,5°C.

3. Reagentia

3.1 N-Hexaan (P.A.).

3.2 Diethylether.

3.3 Ethanol 96%.

3.4 Pentaan.

4. Apparatuur

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

4.1 Een waterbad dat gethermostatiseerd kan worden op $12,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

4.2 Magneetroerder.

5. Uitvoeringsvoorschrift

5.1 Kristalliseren.

Weeg 25 g botervet af in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg toe 50 ml hexaan. Plaats de oplossing in het waterbad van $12,5^{\circ}\text{C}$ waaronder een magneetroerder is geplaatst. Roer tot de eerste kristallen zichtbaar worden. Laat de erlenmeyer vervolgens nog een half uur staan bij $12,5^{\circ}\text{C}$.

5.2 Filtreren

Vouw in een büchnertrechter, met een diameter van 9 cm, de randen van een met water bevochtigd papieren filter (diameter 11 cm) omhoog. Droog het filter door dit te spoelen onder vacuüm met 25 ml ethanol en vervolgens 25 ml diethylether. Breng de inhoud van de erlenmeyer op het filter en zuig vervolgens af onder vacuüm (zie fig. 1). Breng de kristallen kwantitatief over m.b.v. het filtraat.

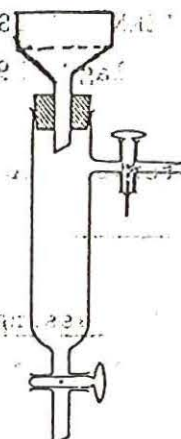


Fig. 1

5.3 Herkristalliseren

Kristalliseer om door het papierenfilter met de kristal massa over te brengen in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg toe 25 ml hexaan. Verwarm tot alle kristallen opgelost zijn. Verwijder het filter en extraheer het filter met 25 ml hexaan. Voeg deze fraktie toe aan de erlenmeyer. Laat deze oplossing nog eens kristalliseren op de in 5.1 beschreven wijze en verzamel de kristallen volgens 5.2. Was de kristallen met 25 ml hexaan van 4°C.

5.4 Kwantificeren

Extraheer het filter met de vetkristallen (5.3) met pentaan in een soxhlet met een tevoren gedroogde en gewogen kolf. Damp de pentaan af en droog de kolf gedurende 1 uur bij 102°C. Laat afkoelen en weeg.

6. Berekening

$$\% \text{ kristal massa} = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100$$

waarin M_0 = massa in grammen van het monster

M_1 = massa in grammen van de droge kolf

M_2 = massa in grammen van de kolf met geëxtraheerde kristal massa.

7. Interpretatie van het resultaat

Bij een kristal massa van meer dan 0,5% is sprake van aanwezigheid van gefractioneerd botervet.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Samensteller: H.J. v.d. Kamp

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300

301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400

FIG.4a Hard

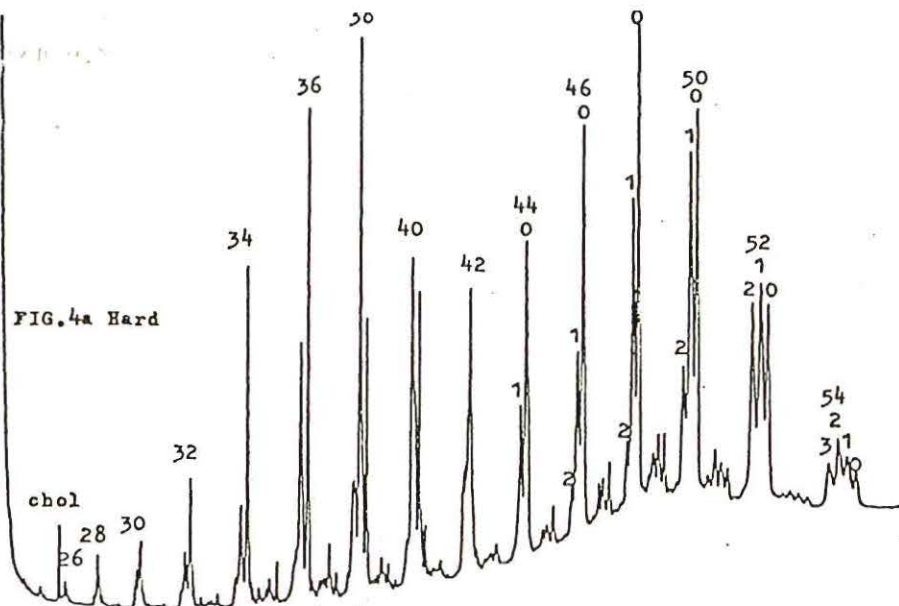


FIG.4b Original

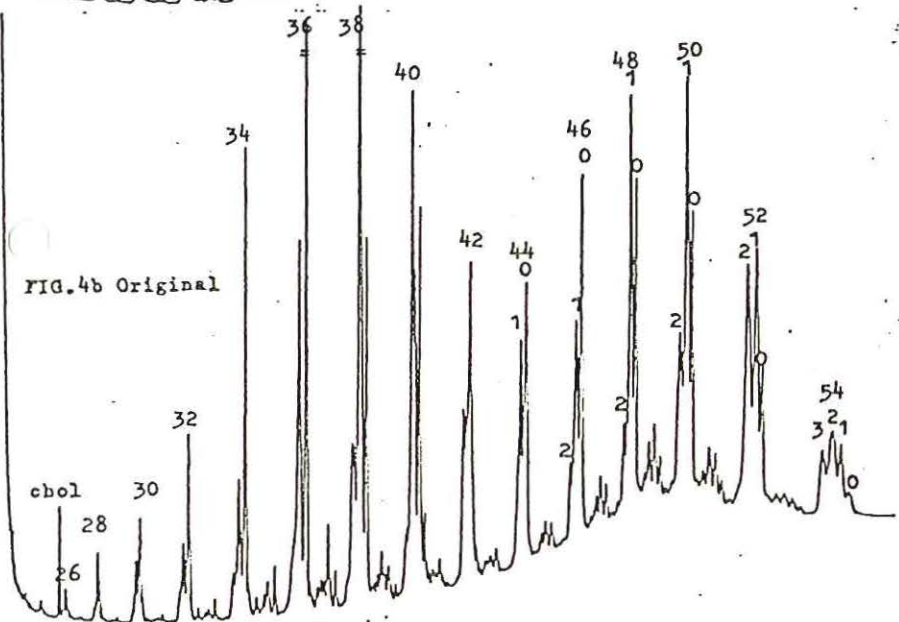
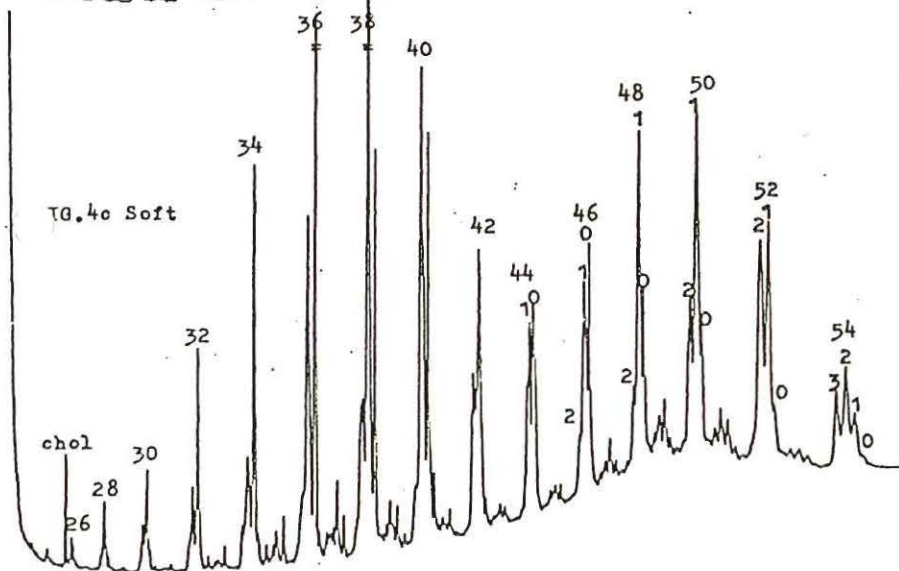


FIG.4c Soft



Chromatogrammen van de triglyceridesamenstelling van hard-, zacht- en niet-gefractioneerd botervet.

- 0 = verzadigd
- 1 = enkelvoudig onverzadigd
- 2 = tweevoudig onverzadigd
- 3 = drievoudig onverzadigd

1. Introduction

The purpose of this study is to investigate the effects of various factors on the performance of the system. The study is organized as follows: Section 2 describes the methodology, Section 3 presents the results, and Section 4 discusses the conclusions.

2. Methodology

The study was conducted using a series of experiments. The first experiment was designed to measure the effect of the input variable on the output variable. The results of this experiment are shown in Table 1.

The second experiment was designed to measure the effect of the input variable on the output variable. The results of this experiment are shown in Table 2.

The third experiment was designed to measure the effect of the input variable on the output variable. The results of this experiment are shown in Table 3.

3. Results

4. Conclusions

5. References

6. Appendix

Chromatogram van de triglyceridesamenstelling van de kristal massa verkregen uit hard gefractioneerd botervet.

