

Afdeling Sensoriek

1985-01-30

RAPPORT 85.5

Pr.nr. 505.6090

Onderwerp: Onderzoek naar enkele in amy-
alcohol voorkomende verontrei-
nigingen, die het bij de Gerber-
bepaling waargenomen vetgehalte
verhogen.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofden, afdeling Senso-
riek (4x), projekteleider (V.d. Veen), projektbeheer,
circulatie.

Projekt: Normalisatie en harmonisatie van onderzoekmethoden voor melk en zuivelprodukten.

Onderwerp: Onderzoek naar enkele in amyralcohol voorkomende verontreinigingen, die het bij de Gerber-bepaling waargenomen vetgehalte verhogen.

Doel:

Het formuleren van aanvullende eisen voor amyralcohol te gebruiken bij de Gerber-bepaling, ter voorkoming van het met dat gebruiksdoel in de handel raken van amyralcohol, die het waargenomen vetgehalte verhoogt. Tevens zal een analysemethode worden aangegeven om te controleren of aan deze eisen wordt voldaan.

Samenvatting:

De verontreinigingen 2-methylpyrazine, isoamylacetaat en di-isoamylether zijn aan goede amyralcohol toegevoegd. Alleen di-isoamylether bleek een duidelijke verhoging van het vetgehalte te geven. Monsters amyralcohol van verschillende herkomst met een vetgehalte verhogende werking zijn gaschromatografisch onderzocht op de aanwezigheid van deze verontreinigingen, waarbij de hierdoor veroorzaakte verhoging werd bepaald.


Conclusies:

- Bij alle monsters amyralcohol met een gehalte aan di-isoamylether van meer dan 0,1% werd een vetgehalteverhogende werking geconstateerd.
 - Een monster met een hoog percentage verontreinigingen gaf een zeer grote verhoging, die niet alleen aan de di-isoamylether kon worden toegeschreven.
 - Amyralcohol te gebruiken bij de vetbepaling volgens Gerber moet minimaal voor 99% uit isoamylalcohol bestaan en mag niet meer dan 0,1% di-isoamylether bevatten. Dit kan gaschromatografisch worden gecontroleerd.
-

Verantwoordelijk: ir H. Oortwijn

Medewerkers/samenstellers: H.J. Korbee, G.D. van Bruchem, A. van

Polanen, H.J. van der Kamp, ir H. Oortwijn

Projektleider: drs N.G. van der Veen 

1. Inleiding

Amylalcohol wordt bij de bepaling van het vetgehalte volgens Gerber gebruikt om de vetafscheiding te bevorderen. Aan deze amylalcohol zijn diverse eisen gesteld zoals vermeld in NEN 962 (1). Zo moet amylalcohol hoofdzakelijk bestaan uit een mengsel van 3-methyl-1-butanol en 2-methyl-1-butanol (isoamylicalcoholen). Eisses heeft de voorwaarden, waaraan een bruikbare amylalcohol moet voldoen uitvoerig belicht (2). In 1982 en 1983 werden door het RIKILT monsters amylalcohol ontvangen die een verhoging van het vetgehalte gaven. Ook het NIZO ontving een dergelijk monster, dat met behulp van gaschromatografie en massaspectrometrie werd onderzocht (3). Hiermee werden drie storende stoffen aangetoond: 2-methylpyrazine, isoamylacetaat en di-isoamylether. Van een andere verontreiniging, namelijk 1,1-diethoxyisopentaan kon de invloed niet worden onderzocht.

Om na te gaan of bij de door het RIKILT ontvangen verdachte amylicalcoholmonsters ook sprake was van dezelfde storende verontreinigingen zijn deze monsters geanalyseerd met behulp van vloeistof- en gaschromatografie. Ook is de vetgehalteverhogende werking van deze verontreinigingen nog eens nagegaan. Tenslotte is onderzocht of door destillatie deze stoffen te verwijderen zijn.

2. Methoden

2.1 Hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC)

Vloeistofchromatograaf: Waters 6000 A.

Kolom: 10 RP 18, lengte 25 cm, inwendige diameter 4,6 mm.

Detektie: UV Kratos Spectroflow 773, $\lambda = 220$ nm.

Injektievolume: 20 μ l.

Eluens: water-methanol 25:75.

Elutiesnelheid: 2,0 ml/min.

2.2 Gaschromatografie

Gaschromatograaf: Varian 3700.

Kolom: CP Wax 57 CB: lengte 25 m, inwendige diameter 0,22 mm.

Draaggas: He 1,1 atm.

Injektie gesplit: 1:100.

Detektie: FID.

Temperatuurprogramma: 1 min isotherm 50°C, daarna oplopend met 5°C/min tot 120°C.

2.3 Vetgehaltebepaling

Volgens NEN 962 (1).

3. Analyse

3.1 Invloed van toegevoegde onzuiverheden op het bepaalde vetgehalte

Aan amyralcohol, waarvan bekend was dat hiermee het juiste vetgehalte werd verkregen, zijn de door het NIZO als storend vastgestelde verontreinigingen di-isoamylether, 2-methylpyrazine en isoamylacetaat toegevoegd volgens onderstaand schema.

monster	toevoeging		
	di-isoamylether*	2-methylpyrazin	isoamylacetaat
1	0,1%	-	-
2	-	0,1%	-
3	-	-	0,1%
4	0,5%	-	-
5	-	0,5%	-
6	-	-	0,5%
7	1,0%	-	-
8	-	1,0%	-
9	-	-	1,0%
10	-	-	-
11	0,1%	0,1%	0,1%
12	0,5%	0,5%	0,5%
13	1,0%	1,0%	1,0%

* ook di-isopentylether genoemd

In tabel 1 zijn de resultaten weergegeven van het gas- en vloeistofchromatografisch onderzoek van deze monsters, alsmede de bepaalde vetgehalteverhogende werking van de toevoegingen. De vetgehalten zijn in drievoud bepaald.

Uit de resultaten blijkt dat alleen di-isoamylether een significante verhoging veroorzaakt in het waargenomen vetgehalte.

Met HPLC viel de piek van 2-methylpyrazine samen met de isoamylalcohol-piek (zie bijlage I). Met GC werd een goede scheiding verkregen: ook de lineariteit bleek goed te zijn (zie bijlage II). Het onderzoek werd in eerste instantie uitgevoerd met een CP Sil 88 capillair kolom. Na circa 50 analyses werden echter slechtere scheidingen verkregen. Daarom werd er overgegaan op de chemisch gebonden fase CP Wax 57 CB.

3.2 Onderzoek van ontvangen amylalcoholmonsters

Tien monsters, ontvangen van AID, firma Boom en de FNZ werden gaschromatografisch onderzocht op de aanwezigheid van isoamylacetaat, di-isoamylether en 2-methylpyrazine (zie bijlage III). Daarnaast werden alle monsters vergeleken met een standaard amylalcohol in hun uitwerking op de vetbepaling volgens Gerber. De bepalingen werden in drievoud uitgevoerd.

In tabel 2 zijn de resultaten weergegeven. Ook hier blijkt weer dat de aanwezigheid van di-isoamylether aanleiding geeft tot een verhoging van het waargenomen vetgehalte. Bovendien geeft monster 4 met een hoog gehalte aan verontreinigingen ($\sim 8\%$) een extra verhoging.

3.3 Destillatie van amylalcohol

In NEN 962 worden eisen gesteld aan het destillatiegedrag van de amylalcohol. Goede amylalcohol moet voor minstens 98% binnen het kooktraject van 128°C tot 132°C overdestilleren. De storende stof di-isoamylether kookt bij 172°C. Er bestaat dus de mogelijkheid deze stof door destillatie te scheiden.

Een monster werd gedestilleerd en in drie frakties gescheiden:

Fractie 1: opgevangen tot een kooktemperatuur van 128°C.

Fractie 2: opgevangen binnen het kooktraject 128°-131°C.

Fractie 3: restant in de destillatiekolf.

Deze frakties werden gaschromatografisch geanalyseerd. Het vetgehalte werd alleen met de tweede fractie in drievoud bepaald. De resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel 3. Hieruit blijkt dat de verontreinigingen niet uit de hoofdfrakties werden verwijderd. De veroorzaakte verhoging van het vetgehalte wordt door de destillatie dan ook nauwelijks veranderd.

Tabel 3

Fraktie	% isoamyl- alcohol	%di-iso- amylether	% isoamyl acetaat	% methyl- pyrazine	restant	verhoging vetgehalte
uitgangs- materiaal	99,01	0,53	0,07	0,11	0,28	0,04
< 128°C	98,92	0,36	0,08	0,09	0,55	
128°-132°C	99,06	0,53	0,07	0,12	0,22	0,03
>132°C	96,88	1,53	0,08	0,20	1,31	

4. Conclusies

Drie stoffen, waarvan de storende werking door het NIZO is vastgesteld, namelijk isoamylacetaat, 2-methylpyrazine en di-isoamylether zijn onderzocht op hun verhogende werking bij de vetbepaling volgens Gerber en op hun aanwezigheid in door het RIKILT ontvangen amylalcoholmonsters. In dit onderzoek bleek alleen een di-isoamylethertoevoeging aan goede amylalcohol het waargenomen vetgehalte te verhogen. Dit werd min of meer bevestigd in het onderzoek van de verdachte monsters. Een poging om deze stof door destillatie te verwijderen had geen succes. Daarnaast bleek dat gebruik van een monster met een hoog gehalte (8%, waarvan 0,5% di-isoamylether) aan verontreinigingen een zeer grote verhoging van het vetgehalte te veroorzaken. Hieruit blijkt dat nog andere stoffen de uitslag van de bepaling volgens Gerber beïnvloeden. Het probleem van de amylalcoholen die een onjuist vetgehalte geven bij de bepaling volgens Gerber is hiermee niet uitputtend behandeld. Niet alle voorkomende verontreinigingen zijn geïdentificeerd en daarmee hun invloed niet vastgesteld.

Voortvloeiend uit dit onderzoek moeten naast de bestaande eisen gesteld aan de amylalcohol de volgende worden toegevoegd:

- Het gehalte aan isoamylalcohol moet tenminste 99% zijn.
- Er mag niet meer dan 0,1% di-isoamylether in de amylalcohol voorkomen.

Bovenstaande eisen kunnen gaschromatografisch worden gecontroleerd. Onze bevindingen zijn gerapporteerd aan de Studiegroep Gerber Melk betreffende NEN 962.

Literatuur

1. NEN 962 - Voorschrift voor de bepaling van het vetgehalte van melk volgens de butyrometrische methode van Gerber (april 1964).
2. J. Eisses - Specification for amylalcohol for the Gerber test. Neth. Milk and Dairy J. 19 (1965) 165-190.
3. J. Koops, R. Neeter and H.T. Badings - De bepaling van het vetgehalte van melk volgens Gerber. Amylalcohol als mogelijke bron van fouten. NIZO-nieuws 1983 no. 4, Zuivelzicht 75 (1983) 651-653.

Tabel 1. Gevonden percentages van de afzonderlijke componenten na aftrek van het gevonden percentage in de zuivere isoamylalcohol (monster 10) voor HPLC en GC-analysen. Verschil in vetgehalte volgens Gerber, veroorzaakt door de toevoegingen.

Monster nummer	GC			HPLC			Vetgehalte in %	Vn - V10
	% di-isoamylether	% iso-amylacetaat	% methyl-pyrazine	% di-isoamylether	% iso-amylacetaat	% methyl-pyrazine		
1	0,088 0,090			0,086			4,197	-0,001
2			0,091 0,90			0,095	4,193	-0,005
3		0,083 0,083			0,109		4,210	+0,012
4	0,431 0,443			0,495			4,218	+0,020*
5			0,487 0,478			0,474	4,197	-0,001
6		0,421 0,419			0,573		4,202	+0,004
7	0,864 0,861			1)			4,287	+0,089*
8			0,983 0,965			0,953	4,205	+0,007
9		0,865 0,838			0,998		4,195	-0,003
10	(0,001)	(0,199)	(0,022)				4,198	-
11	0,086 0,084	0,080 0,077	0,088 0,088	0,096	0,111	0,106	4,190	-0,008
12	0,437 0,435	0,420 0,423	0,470 0,470	0,443	0,533	0,544	4,207	+0,009
13	0,873 0,884	0,846 0,872	0,993 0,976	0,954	0,965	0,939	4,282	+0,084*

1) max. opp. overschreden

* verschil significant

Tabel 2 Resultaten onderzoek amylalcoholmonsters

Monster nummer	Gevonden met CGC (%)					Gerber bepaling**		RIKILT nummer	Datum ontvangst	Afkomstig van	Gegevens
	amyl-alcohol	di-iso amyl-ether	iso-amyl-acetaat	methyl-pyrazine	rest	vetgehalte (V _i)	V _i - V ₁₃				
1	99,1	0,54	0,07	-	0,25	4,29	+0,02	14735	1982-03-24	Boom	afgekeurd
2	99,1	0,53	0,07	0,01	0,26	4,31	+0,04	14736	1982-03-24	Boom	afgekeurd
3	99,4	-	0,19	-	0,42	4,27	0,00	-	-	-	oude amylalcohol RIKILT
4	92,0	0,52	0,03	0,61	6,90	4,53	+0,26	29163	1980-10-14	AID	
5	99,1	-	0,13	-	0,75	4,27	0,00	21791		Boom	
6	98,0	0,10	0,37	0,22	1,36	4,26	-0,01	31017	1980-11-06	Boom	
7	99,3	0,02	0,27	0,02	0,42	4,27	0,00		1981-01-28	AID	
8	98,4	0,47	0,25	0,45	0,43	4,28	+0,01	13335	1981-02-20	FNZ	
9	99,4	0,07	0,06	0,24	0,34	4,27	0,00	24571	1980-08-04	Boom	
10*						4,27	0,00	11711	1981-01-28	AID	
11*						4,27	0,00	11712	1981-01-28	AID	groene kleurstof aanwezig
12	96,7	1,08	1,13	0,90	0,16	4,30	+0,03				monster 13 uit tabel 1
13	99,6	-	0,23	-	0,17	4,27	-			Boom	nieuwe voorraad

* Niet gaschromatografisch onderzocht vanwege aanwezige kleurstof.

** In drievoud.

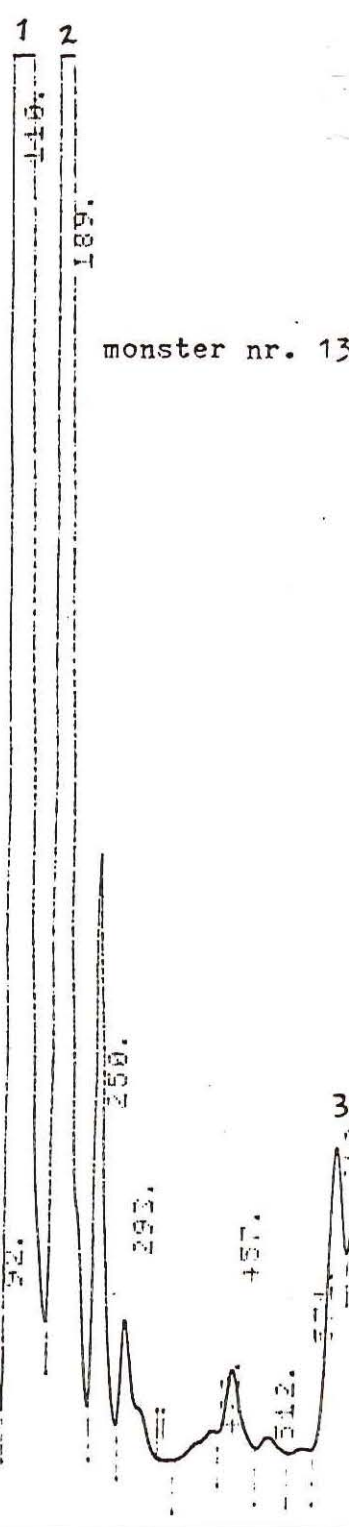
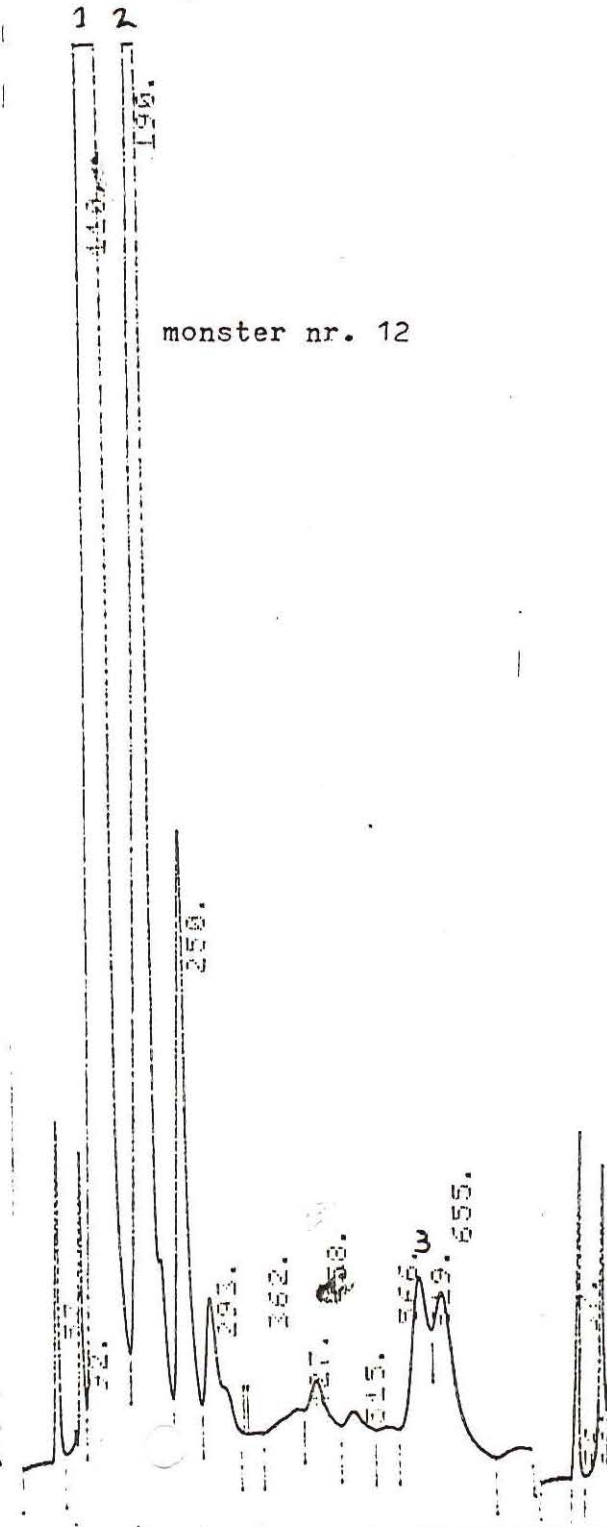
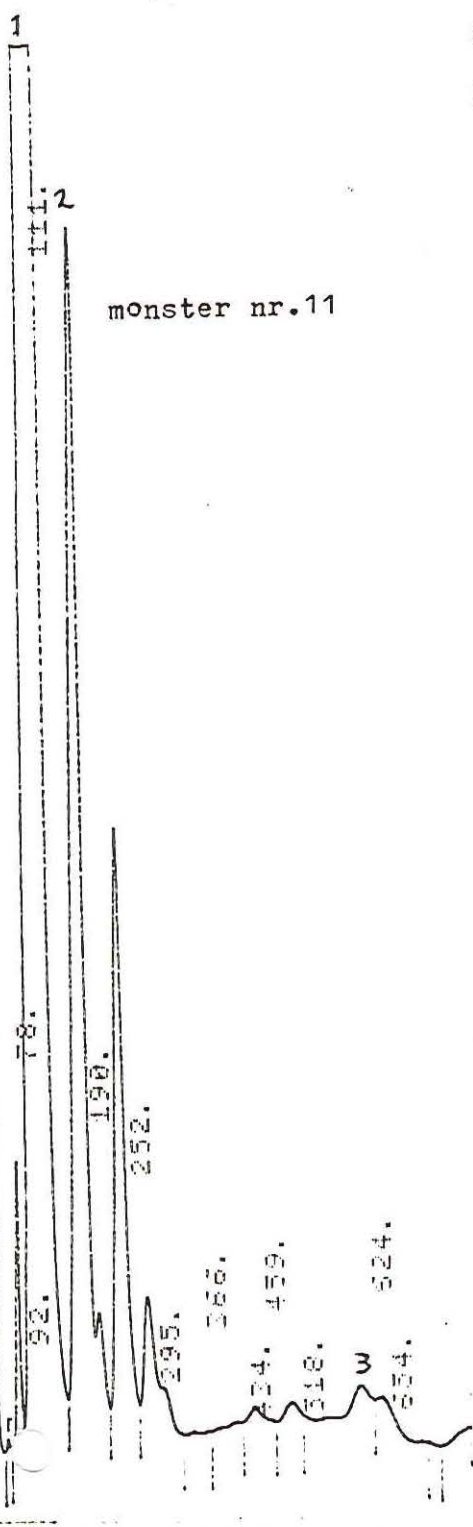
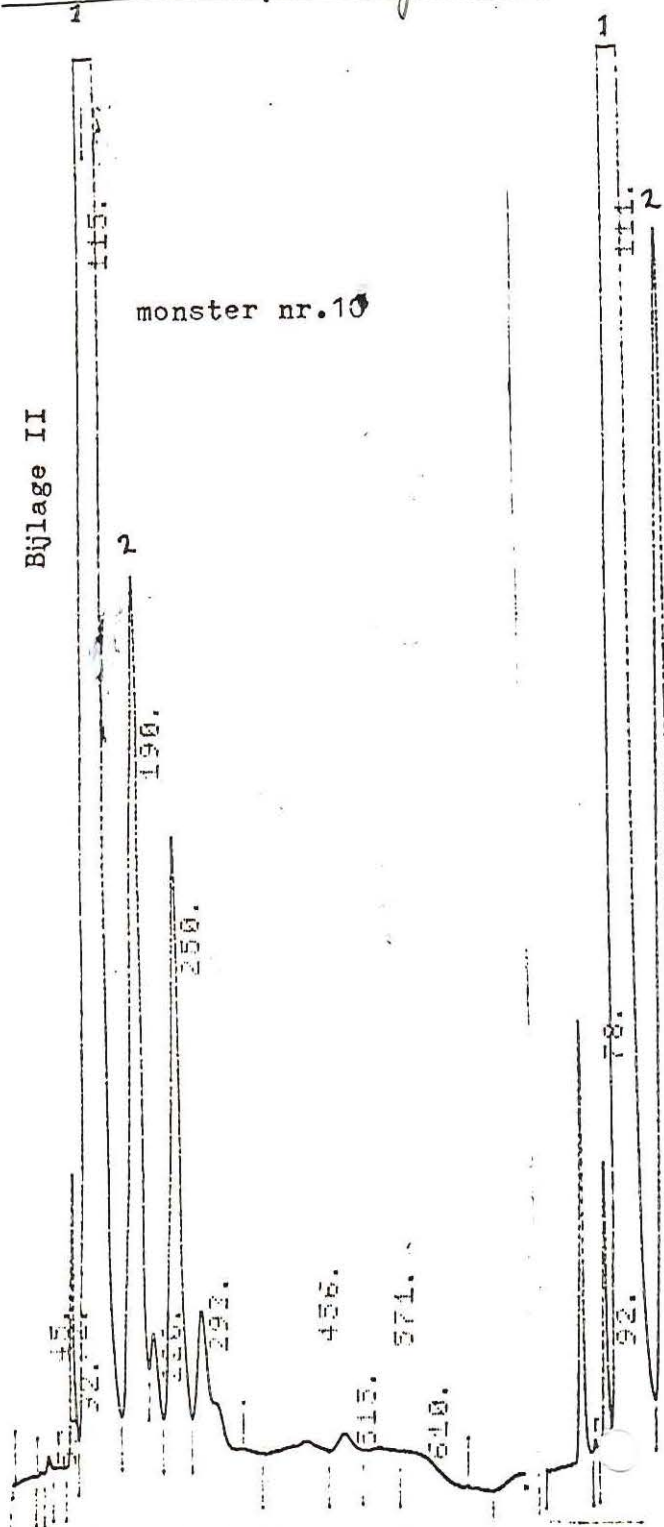
met 8, 12 en 13 nog eens het vetgehalte bepaald

	<u>vetgehalte</u>	<u>t.o.v. standaard amylalcohol</u>
8	4,08	+0,04
12	4,11	+0,07
13	4,05	+0,01

Bijlagen

- I : Chromatogrammen van HPLC
- II : Chromatogrammen en grafieken van GC-analyse
- III: Chromatogrammen van GC-analyse

Bijlage II



iso-amylalcohol

2

10 →

isoamylalcohol +
+ 0,1% diisopentylether (1)
+ 0,1% isoamylacetate (2)
+ 0,1% methylpyrrolone (3)

2

Bijlage II:
GC-analyse

3

11 →

3

iso-amylalcohol +
0,5% (1) +
0,5% (2) +
0,5% (3)

2

12 →

isoamylalc.
+ 1% (1)
+ 1% (2)
+ 1% (3)

3

1

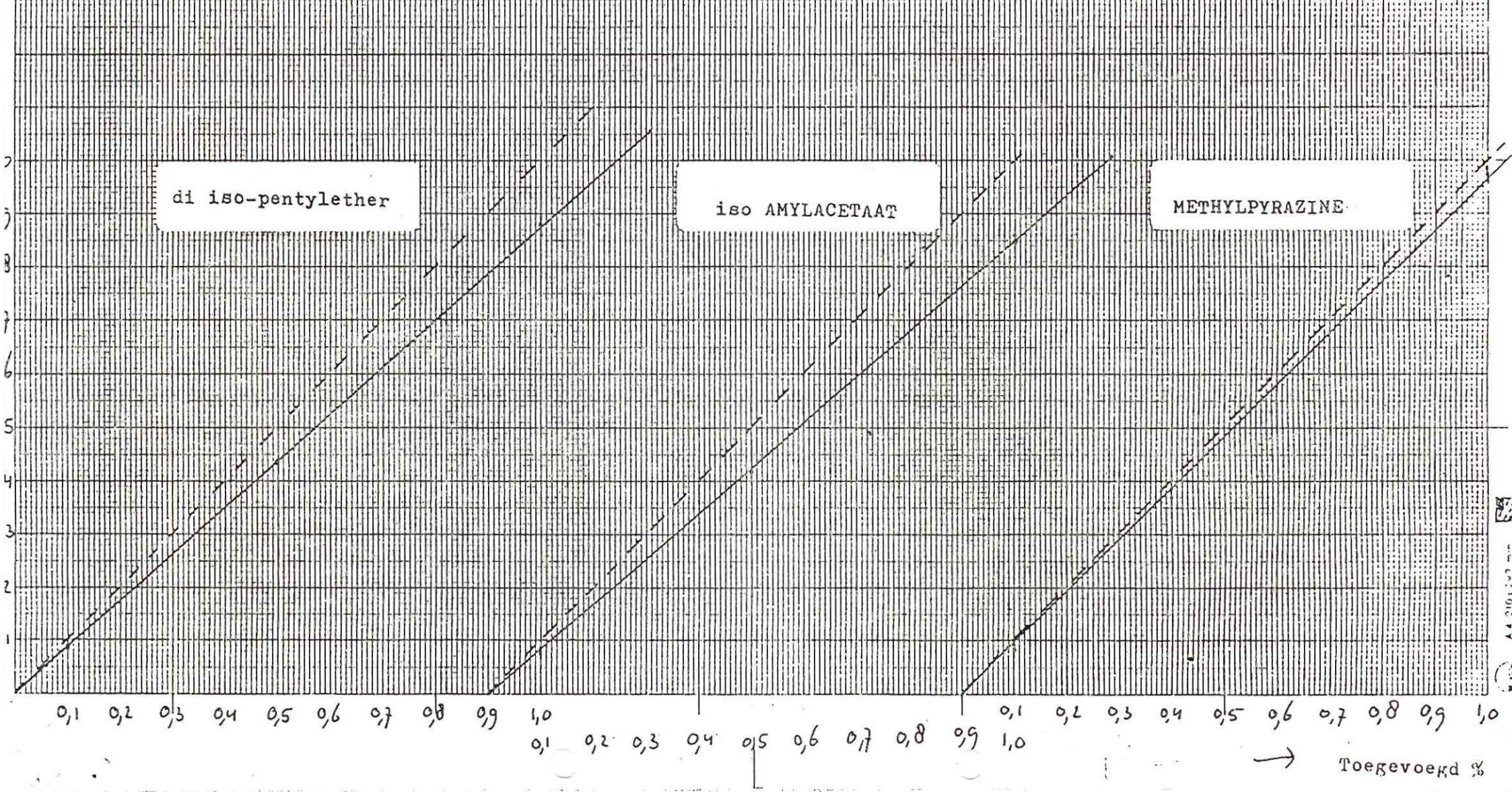
2

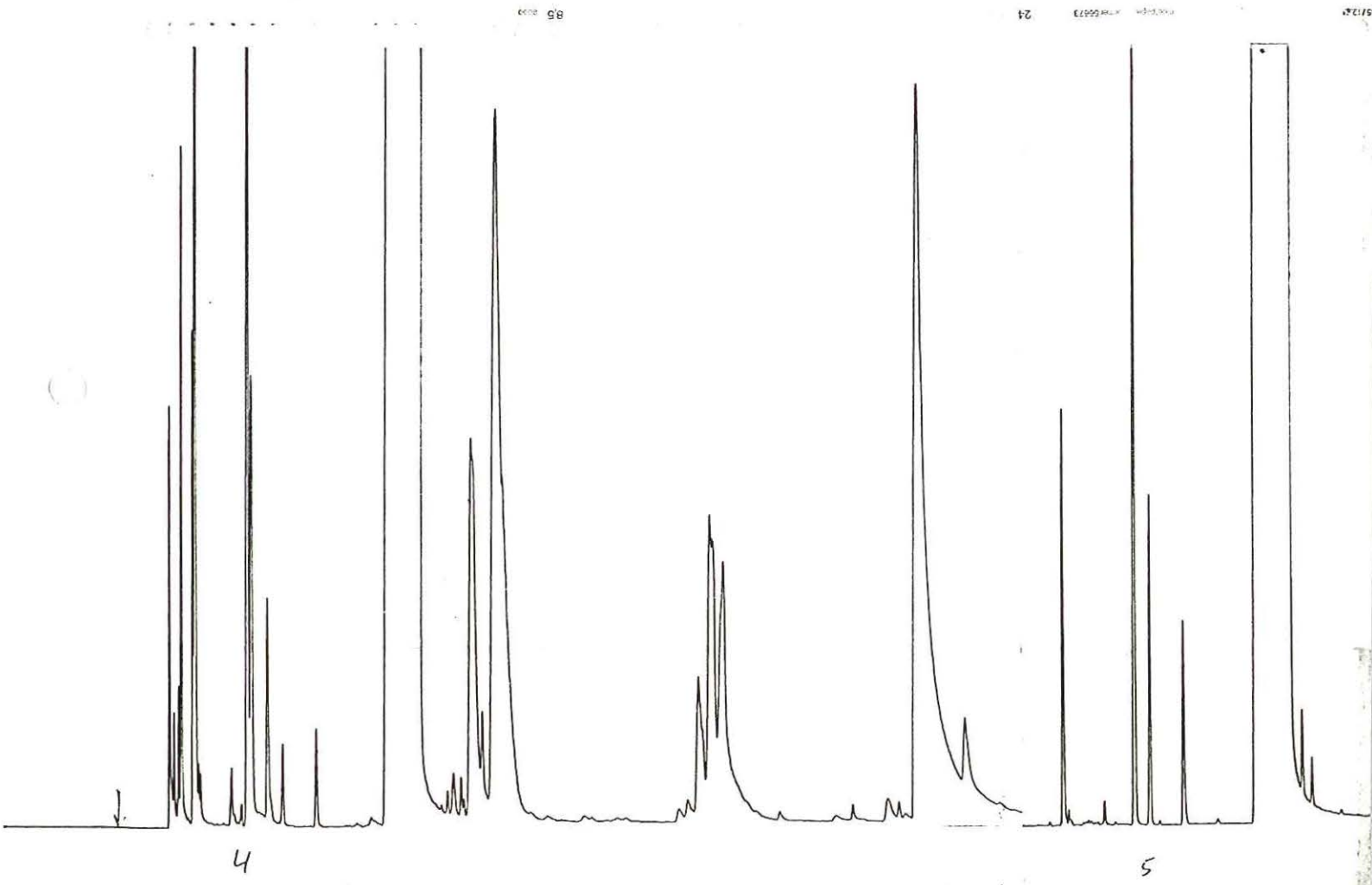
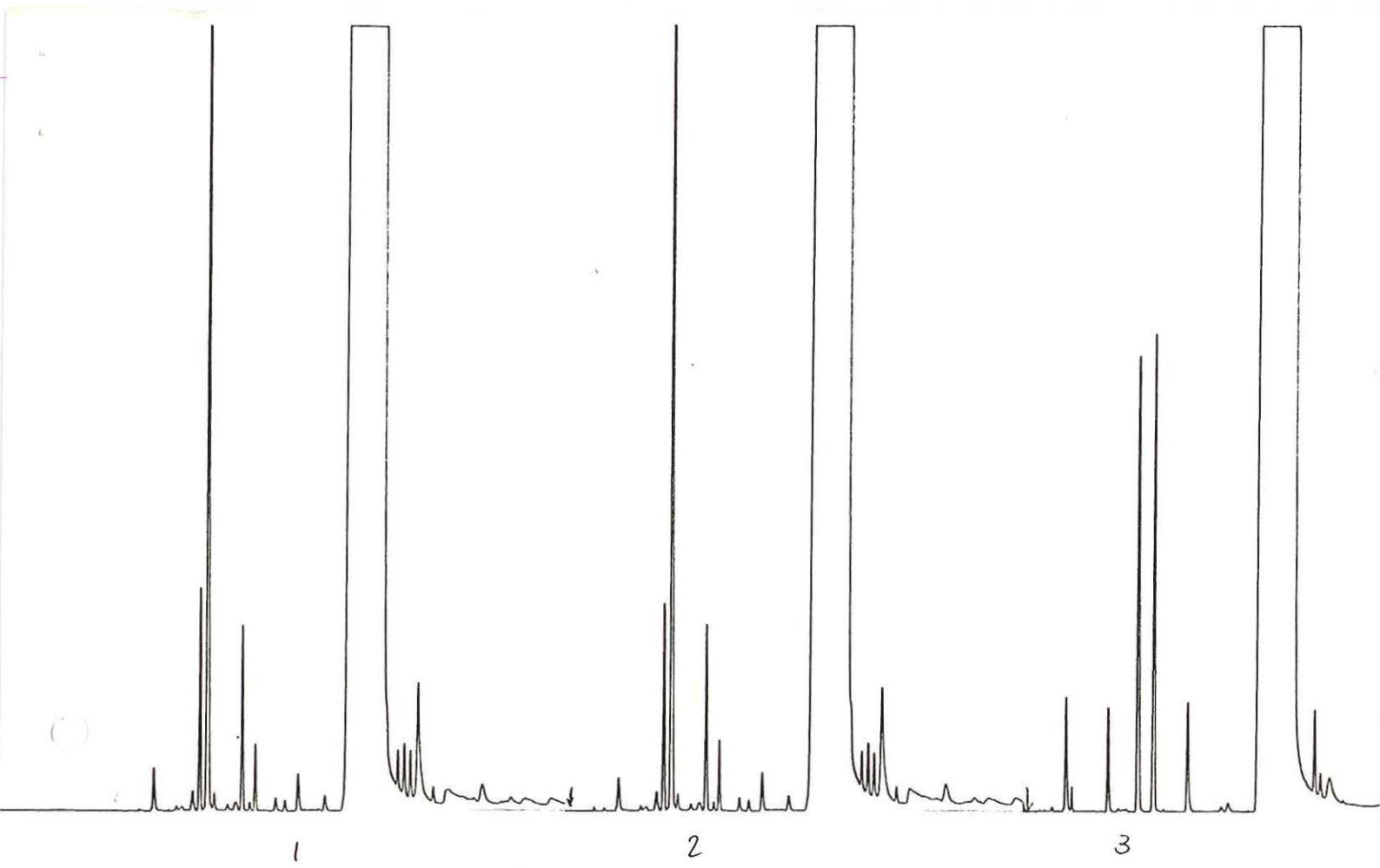
3

13 →

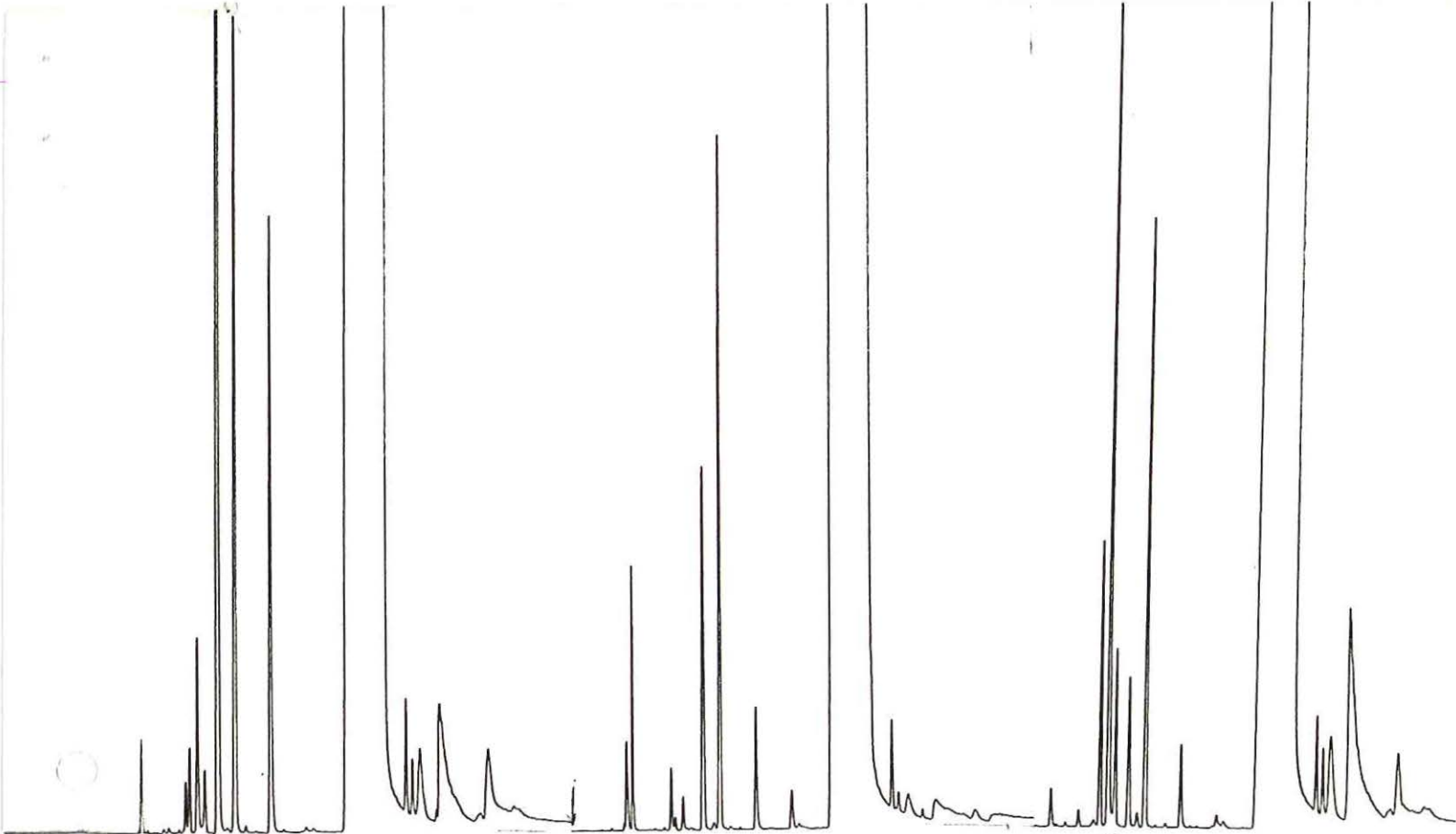
- - - - Theoretische lijn
 ———— Gevonden lijn
 Kolom: CP Wax 57 CB

gevonden %



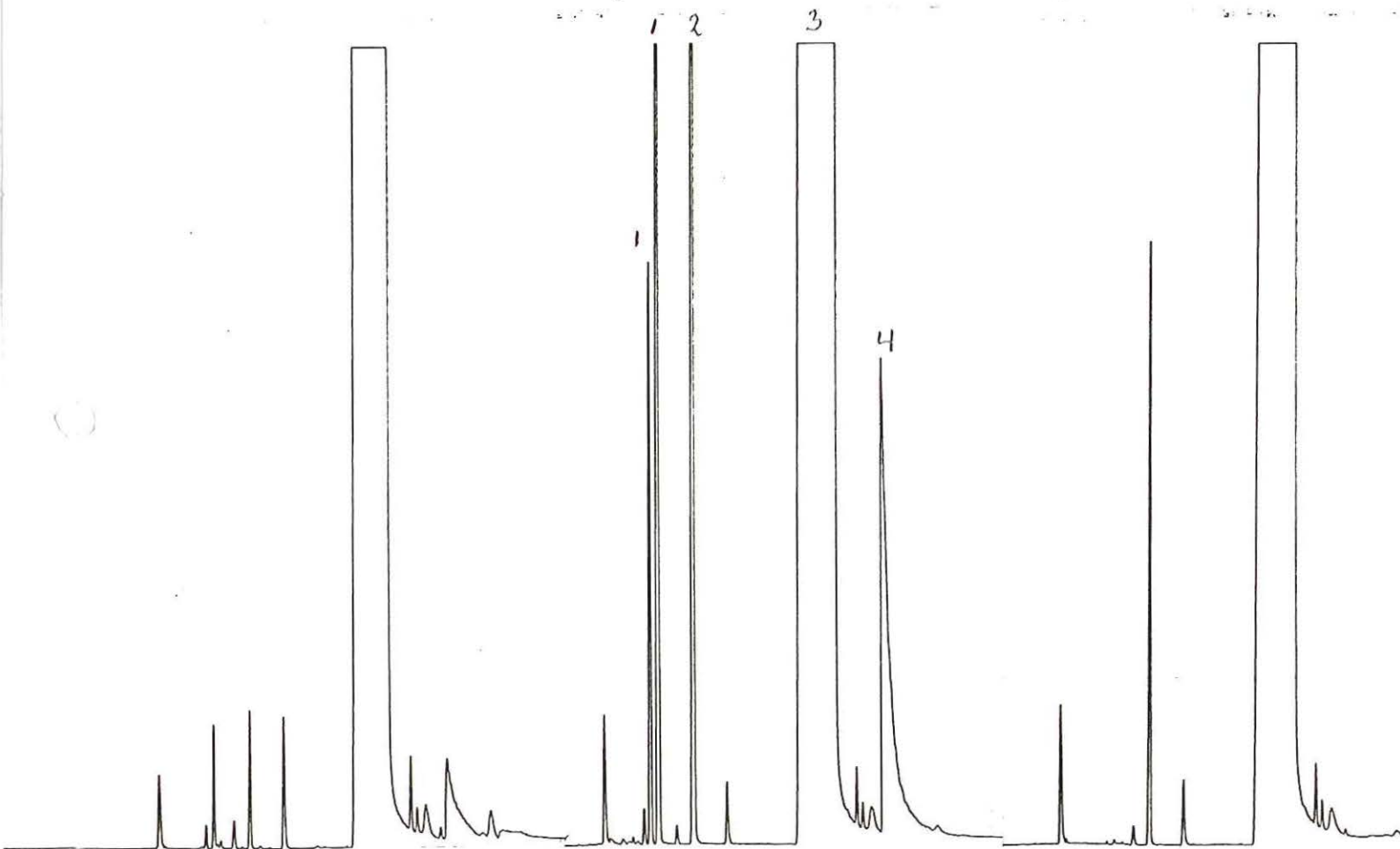


Bijlage III : Gaschromatogrammen van praktijk monsters



7

8



9

12

15

- 1 = di-isopentylether
- 2 = isoamylacetat
- 3 = isoamylalcohol
- 4 = methylpyrazine