

INSTITUUT VOOR BIOLOGISCH EN SCHEIKUNDIG ONDERZOEK  
VAN LANDEBOUWGEWASSEN

Wageningen

Verslagen nr. 37, 1965

VOORSCHRIFT VOOR HET ONDERZOEK VAN LIPIDEN IN  
RUWVOEDER EN IN FAECES VAN RUNDEREN

dr. W.B. Deijls en H.J. Immink

I. De voorbereiding van het te onderzoeken materiaal

Het materiaal indien nodig drogen in een vacuümdroogstoof boven silicaagel bij 60°C. Daarna malen door een kruisslagmolen. In het aldus gedroogde en gemalen produkt het gehalte aan droge stof bepalen door droging bij 105°C tot constant gewicht.

II. De bepaling van het totale gehalte aan hogere vetzuren

2 gram van het luchtdroge gemalen materiaal gedurende 5 min. aan een opstijgende koeler koken met 40 ml aethanol (waarin 0,4 % amylalcohol). Daarna 10 ml 33 % KOH toevoegen en verzeppen (één uur koken aan een opstijgende koeler). Na afkoeling aanzuren met 17 ml HCl (25 %) en uitschudden met 50 ml petroleumaether (40-60°C). Een gedeelte van de petroleumaetherlaag (30 à 40 ml) in een waterbad afdampen. Het residu opnemen in 40 ml geneutraliseerde aethanol en titreren met butylalcoholische KOH (ca. 0,1 n). Indicator: thymolblauw. Voor nadere bijzonderheden: Zie Jaarboek I.B.S. 1965, 103-107.

### III. Schema voor de bepaling van verschillende fracties van het ruwe vet

a) Hogere vetzuren (totaal)

b) Ruw vet (extractie met  $\text{CCl}_4$ , na ontsluiting met  $\text{HCl}$ )

koude aceton → oplosbaar:

onoplosbaar:

(b-c) wassen + fosfatiden

c) was- en fosfatide-vrije lipiden

verzeppen

extractie met petr. aether

oplosbaar in petr. aether:

onverzeepbare lipiden

aanzuren

extractie met petr. aether:

d) glyceride-vetzuren <sup>x)</sup>

bromeren

titreren

e) J-getal v.d. glyceride-vetzuren

f) gem. aeq. gew. v.d. glyceride-vetzuren

g) me glyceride-vetzuren per kg ds

h) me  $\overline{\text{F}}$  per me glyceride-vetzuren

k) me  $\overline{\text{F}}$  (van glyceriden) per kg ds

<sup>x)</sup> De glyceriden van grassen en andere bladeren bestaan voornamelijk uit galactosyl-glyceriden.

Weenink, R.O. : Acetone soluble lipids of grasses and other forage plants, J. Sci. Food Agric. 12 (1961) 34-38.

Shorland, F.B.: J. Sci. Food Agric. 12 (1961) 39-43.

#### IV. De bepaling van de lipide-fracties

##### 1. Ruw vet

Uitgaan van tenminste 5 g luchtdroge stof. Bij de analyse van hooi of rundermest van 10 g luchtdroge stof. De bepaling wordt verricht volgens NEN 3148 van het Nederlands Normalisatie-instituut. Na ontsluiting door koken met HCl (3 n) wordt het ruwe vet uitgeschud in 100 ml tetrachloorkoolstof. Zoveel mogelijk van de gefiltreerde oplossing in  $\text{CCl}_4$  (b.v. 80 ml) afdampen in een waterbad. Het residu drogen in vacuüm bij kamertemp. tot constant gewicht.

Het koken met HCl (3 n), het afkoelen en het afdampen van  $\text{CCl}_4$  geschieden onder stikstof.

##### 2. De verwijdering van wassen en fosfatiden

Het gedroogde en gewogen ruwe vet (zie IV-1) oplossen in 50 ml aceton (koken aan opstijgende koeler onder stikstof). De oplossing wordt één uur geplaatst in een diepvriesruimte. Daarna de afgescheiden wassen en fosfatiden affiltreren door een filtreerpapiertje. Het filtraat opvangen in een gewogen kolfje met kooksteentje. Het neerslag 4 maal uitwassen met in totaal 35 ml koude aceton (uit diepvriesruimte). Onder stikstof de aceton afdampen, het residu drogen in vacuüm bij kamertemp. tot constant gewicht.

##### 3. De verwijdering van de onverzeepbare lipiden

De sub IV-2 geïsoleerde lipiden onder stikstof verzeppen (1 uur koken met 40 ml aethanol waarin 0,4 % amyalacohol) en 10 ml KOH (33%). Afkoelen onder stikstof en uitschudden met petroleumaether (40-60°C), eerst met 50 ml, vervolgens met telkens 25 ml totdat de petr. aetherlaag slechts weinig geel gekleurd is. De extracten in petr. aether worden niet verder onderzocht.

De nog alkalische water-laag aanzuren met 17 ml HCl (25 %). Na afkoelen gedurende 2 minuten schudden met 50 ml petr. aether (40-60°C) in een cilindrische scheitrechter met goed sluitende stop. Van de petr. aether-laag zoveel mogelijk (b.v. 40 ml) onder stikstof afdampen in een gewogen kolfje met kooksteentje. Het residu drogen in vacuüm bij kamertemp. tot constant gewicht.

#### 4. De bepaling van het jodiumgetal van de glyceride-vetzuren

De sub IV-3 geïsoleerde, droge vetzuren (bij voorkeur 50-120 mg) worden gebromeerd. Het kolfje met de goed over de wand verdeelde vetzuren wordt omgekeerd geplaatst op een open flesje met een weinig broom in een gesloten exsiccator. De duur van het bromeren bedraagt  $1\frac{1}{2}$  uur. Vervolgens wordt eerst bij kamertemp. en daarna in een bekerglas met water van  $80^{\circ}\text{C}$  de overmaat broom verwijderd met een luchtstroom (lucht doorzuigen). Na drogen bij kamertemp. in vacuüm de gebromeerde vetzuren wegen. (Enigszins gewijzigd voorschrift van M. Atmore en F. Hawke, Joernaal van die Zuid Afrikaanse Chemiese Instituut, III-2 (1950) 23-28.)

#### 5. Het gemiddelde aequivalentgewicht van de glyceride-vetzuren

De gebromeerde vetzuren (zie IV-4) oplossen in 40 ml geneutraliseerde acthanol. (Koken aan een terugvloeioker.) De oplossing nog warm titreren met butylalcoholische KOH (ca. 0,1 n). Indicator: thymolblauw.

N.B. Wegingen geschieden tot 0,1 mg nauwkeurig. Titraties met een micro-buret.

### V. Berekeningen

Ad II.

Uitgegaan van 2 g luchtdroge stof. Afgedampt: p ml van de 50 ml oplossing in petr. aether. Getitreerd met q ml 0,1 n loog. Milliaequivalenten hogere vetzuren (totaal) in 1 kg luchtdroge stof:

$$(q - z) 0,1 \times 1,04 \times \frac{50}{p} \times \frac{1000}{2}$$

z = blanco titratie :

1,04 = correctie-factor (zie Gorter en de Graaff, Klinische diagnostiek, 7<sup>e</sup> druk, deel II, Leiden 1956, 741-742.)

Bereken het gehalte in me in 1 kg ds. (a)

Ad IV-1

Uitgegaan van u gram luchtdroge stof. Van de 100 ml oplossing in  $\text{CCl}_4$  worden r ml drooggedampt. Gewicht van het residu: S mg.

$$\text{Ruw vet: } \frac{100}{r} \times S \times \frac{1}{10 u} \% \text{ in de luchtdroge stof.}$$

Bereken het gehalte aan ruw vet in % van de ds. (b)

Ad IV-2

Gevonden: t mg was- en fosfatide-vrije lipiden.

Gehalte:  $\frac{100}{r} \times t \times \frac{1}{10 u} \%$  in de luchtdroge stof.

Bereken het gehalte in % van de ds (c)

b-c = gehalte aan wasen en fosfatiden in % van de ds.

Ad IV-3

Van de 50 ml oplossing van het verzepingsprodukt der was- en fosfatide-vrije lipiden wordt  $\alpha$  ml afgedampt. Na droging is het gewicht van het residu v mg.

Gehalte v x 1.04 x  $\frac{50}{\alpha} \times \frac{100}{r} \times \frac{1}{10 u} \%$  glyceride-vetzuren in de luchtdroge stof.

Bereken het gehalte in % van de ds. (d)

Ad IV-4

De v mg, sub IV-3 geïsoleerde glyceride-vetzuren adderen  $\beta$  mg broom. Het jodiumgetal van de glyceride-vetzuren is dan:  $e = 158,8 \times \frac{\beta}{v}$ .

Ad IV-5

Benodigd voor de titratie van de gebromeerde v mg glyceride-vetzuren (zie IV-4):

w ml 0,1 n loog.

Gem. aeq. gew. van de glyceride vetzuren:  $f = \frac{v}{w \times 0,1}$ .

Verdere berekeningen:

1. m. aequivalenten glyceride-vetzuren per kg ds:

$$g = \frac{10.000 d}{f}.$$

2. m. aequivalenten dubbele bindingen per m. aequivalent glyceride-vetzuur:

$$h = \frac{f}{100} \times \frac{e}{126,9}.$$

3. m. aequivalenten dubbele bindingen (van glyceriden) per kg ds:

$$k = g \times h.$$