

Laboratorium voor Scheikundige Analyse der
Voedingswaren van Dierlijke Oorsprong
Rijksuniversiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde
Dir. : Prof. Dr. R. VERBEKE

BEPALEN VAN DE OORSPRONG VAN VETTEN DOOR GASCHROMATOGRAPHIE

Determination of the origin of fats by gaschromatography.

H.F. DE BRABANDER* en R. VERBEKE

1. INLEIDING.

De analysemogelijkheden van vetten zijn in de laatste jaren door de ontwikkeling van de moderne gaschromatografie enorm toegenomen. Vetten evenals sommige vetbegeleidingstoffen zijn eenvoudig om te vormen tot vluchtige verbindingen welke gaschromatografisch kunnen onderzocht worden. Door gebruik van capillaire kolommen - welke in de handel verkrijgbaar zijn - kan ook een niet gespecialiseerd laboratorium uitstekende scheidingen tussen de meeste componenten verwezenlijken.

In deze bijdrage worden enkele gaschromatografische methodes besproken welke aangewend worden tot het opsporen van het soort vet. Dierlijk vet wordt onderscheiden van plantevet door analyse van de sterolfraction. Door kwantitatieve analyse van de sterolfraction kunnen mengsels bestaande uit één plantevet naast dierlijke vetten geïdentificeerd en de percentische samenstelling van de componenten berekend worden. Deze sterolanalyses worden vooral uitgevoerd tot het opsporen van bottervervalsing en het aantonen van goedkoop dierlijk vet in plantevetten.

Het soort dierlijk vet kan bepaald worden door analyse van de totale vetzuursamenstelling en van de vetzuurverdeling binnen het triglyceride. De identiteit van verwerkte vleessoorten in verhitte vleeswaren kan slechts met behulp van een dergelijke vetanalyse bepaald worden. Het bepalen van de herkomst van vlees of vet heeft belang voor bevolkingsgroepen waarvoor het eten van bepaalde vleessoorten om godsdienstige of ethische redenen verboden zijn.

(*) Casinoplein 24 - B 9000 GENT

2. AANTONEN VAN MENGING VAN DIERLIJKE EN PLANTAARDIGE VETTEN.

Door de aanwezigheid van specifieke componenten kunnen bepaalde plantaardige vetten in mengsels aangetoond worden. Sesamolie kan opgespoord worden met de BAUDOUIN-VILLA-VECCHIA reactie (¹, ²). Door de aanwezigheid van een cyclopropeencarbonzuur kan tot 1 % katoenolie aangetoond worden door de HALPHENTest (³). Met de BELLIER-reactie (⁴) kunnen zaadoliën opgespoord worden. Dierlijke vetten kunnen van plantaardige onderscheiden worden door het arachidonzuur-gehalte. Dit viervoudig onverzadigd vetzuur komt in de meeste plantaardige vetten slechts voor in sporenhoeveelheden (< 0.04 %) terwijl het gehalte in dierlijk vet schommelt tussen 0.13 % en 0.6 %.

De meest elegante methode tot het onderscheiden van dierlijk en plantaardig vet bestaat in het isoleren van de sterolfractie.

Sterolen : aard en voorkomen

Sterolen zijn vetbegeleidingstoffen en vormen het grootste deel van de zogenaamde "onverzeepbare fractie". Naar hun voorkomen worden sterolen onderscheiden in zoösterolen (dierlijk vet), phytosterolen (plantaardig vet), mycosterolen (schimmel- en gistvet) en marinesterolen ("zeevruchten"). Bij dierlijk vet is cholesterol het hoofdbestanddeel van de sterolfractie. Plantaardige vetten bevatten hoofdzakelijk phytosterolen naast geringe hoeveelheden cholesterol. In plantevetten komen de sterolen in typische concentraties voor (tabel 1).

De structuurformule van enkele voorname sterolen is weergegeven in fig. 1. Sterolen kunnen afgeleid worden van cholesterol door substitutie van een ethyl- of methyl groep op de 24-plaats in combinatie met het voorkomen van een dubbele binding op de 22, 23-plaats.

Onderscheiden van phyto- en zoösterolen

Volgens BÖMER (⁷) en WINDHAUS (⁸) worden phyto- en zoösterolen onderscheiden door het smeltpunt van hun acetaten.

Cholesterolacetaat heeft een smeltpunt van 114.3°C - 114.8°C terwijl de phytosterolacetaten - naargelang de verbinding - smeltpunten vertonen welke variëren tussen 125.6°C en 137°C. Volgens deze methode zou 5 - 10% plantevet in dierlijk vet kunnen aangetoond worden. Door de smeltpuntsbepaling te combineren met het microscopisch onderzoek van de sterolkristallen werd de detectielimiet van plantaardig vet in dierlijk vet ver-

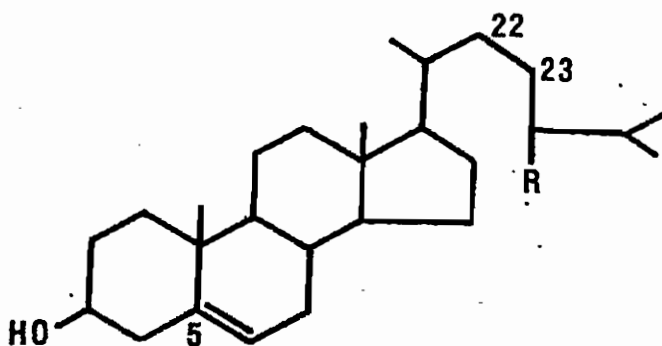


FIG. 1: Structuurformule der belangrijkste sterolen

(Structure formula of the most important sterols)

sterol	R	positie van dubbele binding (position/of double bound)
chole-	H	5
β -sito-	CH_2CH_3	5
campe-	CH_3	5
stigma-	CH_2CH_3	5, 22
brassica-	CH_3	5, 22

laagd (⁹, ¹⁰). Immers op deze wijze kan 5% phytosterol aangetoond worden in phytosterol-cholesterol mengsels. De detectielimiet van plantaardige vetten in dierlijke vetten (bv boter) hangt uiteraard samen met het totaal phytosterolgehalte van de plantevetten. Gezien het breed smeltpuntsinterval van de phytosterolacetaten is de smeltpuntsbepaling van sterolacetaten echter van weinig nut tot het aantonen van dierlijke vetten in plantevetten.

Door chromatografie kunnen de verschillende sterolen geïdentificeerd en kwantitatief bepaald worden. Hierdoor kunnen kleine hoeveelheden cholesterol naast grote hoeveelheden phytosterol en vice versa aangetoond worden.

Scheiding van sterolen door middel van papier- en dunnelaagchromatografie werd reeds een vijftiental jaren terug uitvoerig bestudeerd (¹¹, ¹², ¹³, ¹⁴, ¹⁵, ¹⁶). Door aanwending van MgO platen (¹⁷) of van AgNO_3 geïmpregneerde silicaplatten (¹⁸) kunnen de meeste plantsterolen op eenvoudige wijze gescheiden worden (¹⁹).

Kwantitatieve analyse van sterolen geschiedt nu vooral door gaschromatografie, zij het door analyse van de vrije sterolen (²⁰, ²¹, ²²) of door analyse van de sterolacetaten (²³, ²⁴).

Analyseverloop

De sterolen worden, na verzeping van het vet door alcoholisch KOH, neergeslagen met digitonine. Digitonine (een glucosidisch saponine) slaat specifiek de sterolen neer. Het digitonide neerslag wordt gefiltreerd, gewassen, gedroogd en gewogen. Hierna worden de steroldigitoniden met azijnzuuranhydride omgezet in de (meer vluchtige) sterylacetaten, omgekristalliseerd met alcohol en opgelost in ether. De sterylacetaten worden gaschromatografisch gescheiden op een apolaire gepakte kolom (bv 5% SE-52, OV-17) of een capillar (bv 50 m SE-30, 0,5 mm I.D.) In fig. 2 is een chromatogram van een mengsel sterylacetaten weergegeven.

Toepassing van sterolanalyse in eetwarenanalyse

De aanwezigheid van plantaardig of dierlijk vet wordt bewezen door de aanwezigheid van de typische plantsterolen. Bij menging van één plantaardig vet met dierlijke vetten kan het plantevet veelal geïdentificeerd worden door het phytosterolspectrum (tabel 1).

TABEL 1: Sterolsamenstelling van enkele plantaardige vetten (5, 6)
(Sterol composition of some vegetable fats (5, 6))

plantaardig vet (vegetable fat)	totaal sterol % (total sterol %)	% van totaal sterol (% of total sterol)				
		chole-	brassica-	campe-	stigma-	β-sito-
cocosolie (coconut oil)	0.1	0.5	—	8	17	74
palmolie (palm oil)	0.04	7	—	19	10	64
arachideolie (arachis oil)	0.24	1	—	12	9	73
maïsolie (maize oil)	0.85	—	—	21	6	73
olijfolie (olive oil)	0.11	—	—	4	—	96
sojaolie (soya oil)	0.34	—	—	20	21	59
koolzaadolie (rapeseed oil)	0.62	0.5	10	32	—	57
lijnolie (linseed oil)	0.43	3	2	25	10	57

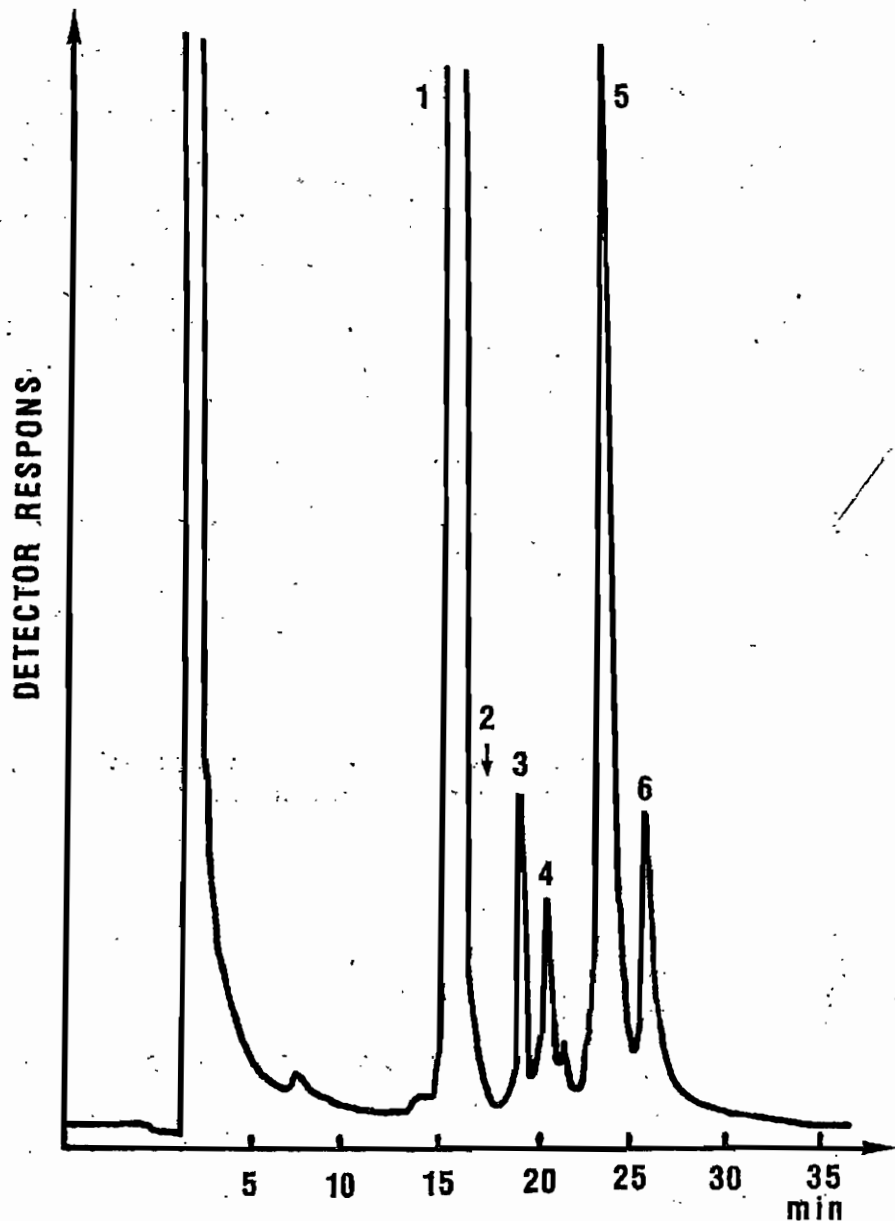


FIG. 2 : Gas-vloeistof chromatogram van een mengsel van sterol-acetaten op SE-30 capillair (50 m, 0.5 mm I.D.)

(Gas-liquid chromatogram of a mixture of sterolacetates on a SE-30 capillary column (50 m, 0.5 mm I.D.)

(1 : cholesterol ; 2 : brassicasterol ; 3 : campesterol ; 4 : stigmasterol ; 5 : β -sitosterol ; 6 : Δ^7 -stigmastenol).

Het gewichtspercent van bv β -sitosterol kan nu berekend worden op twee manieren: 1. door het gebruik van bv cholestaan als inwendige standaard ⁽²⁵⁾.
2. of uit de relatieve percentages sterol en het totaal gewicht digitonide.

Het percentage plantaardig vet in het mengsel kan dan berekend worden met volgende formule:

$$\% \text{ plantaardig vet} = \frac{\text{g } \beta\text{-sitosterol/100 g vet}}{A \times B} \times 10^4$$

A = totaal phytosterolgehalte plantaardig vet (tabel 1)

B = percent β -sitosterol in phytosterolen (tabel 1)

Het cholesterolgehalte van het dierlijk vet kan berekend worden uit het percentage dierlijk vet (100 - percentage plantaardig vet) en het totaal cholesterolgehalte. Hoge cholesterolgehalten wijzen over het algemeen op vetten van mindere kwaliteit.

Door gaschromatografische analyse van de sterolen kan de verwerking van eieren in sommige voedingswaren, zoals mayonaise, bevestigd worden. Gewoonlijk ⁽²⁶⁾ wordt het procent ei-egeel in mayonaise berekend uit het fosfaat en stikstofgehalte volgens:

$$\% \text{ ei-egeel} = 94.16 (\text{P}_2\text{O}_5\%) - 2.192 (\text{N}\%)$$

Het percentage ei-egeel in mayonaise dient in de Verenigde Staten hoger te zijn dan 7% ⁽²⁶⁾. Door het toevoegen van geschikte hoeveelheden fosphatiden (bv lecithine) kan een geschikte emulsie verkregen worden waarin geen eieren verwerkt werden. Daar ei-egeel een hoog cholesterolgehalte vertoont (1.75 g %) kan dergelijke vervalsing door sterolanalyse op ondubbelzinnige wijze opgespoord worden.

3. IDENTIFICATIE VAN DIERLIJKE VETTEN

Indien de sterolfraction van vet uitsluitend cholesterol bevat is het vet van dierlijke oorsprong. Identificatie van het soort dierlijk vet steunt dan meestal op het vetzuurspectrum. De triglyceride samenstelling en de verestering van de vetzuren binnen het glycerol is in sommige gevallen typisch voor de diersoort.

Paardvet kan onderscheiden worden van andere dierlijke vetten door een hoog gehalte aan linoleenzuur (C18:3). Vooral de verhouding linoleenzuur tot stearinezuur is typisch voor deze diersoort. Hoge gehalten aan polyonverzadigde hogere vetzuren (>C22) wijzen op de aanwezigheid van visolieën. Op basis van vetzuursamenstelling zijn rund- en varkensvet echter moeilijk te onderscheiden. De totale vetzuursamenstelling van var-

kensvet kan immers sterk variëren onder invloed van de voedsamenstelling. Door het bepalen van de verdeling van de vetzuurmoleculen over de verschillende plaatsen van de triglyceride molecule (plaatsisomerie) kunnen rund- en varkensvetten wel gedifferentieerd worden.

Vetzuurverdeling over de 2- en 1, 3-plaats van de triglycerides van enkele diersoorten.

Bij vet afkomstig van gevogelte zijn de vetzuren verdeeld over de drie veresteringsplaatsen van glycerol volgens het toeval (percentage in elke positie = 33.3%). De verzadigde vetzuren worden echter iets minder en onverzadigde iets meer in 2-positie ingebouwd. De lengte van de vetzuurketting heeft, bij deze dieren, weinig belang voor de plaatsisomerie.

Bij vissen (met uitzondering van de forel) wordt myristinezuur (C14:O) en palmitinezuur (C16:O) meer op de 2- dan op de 1, 3-positie gevonden (40 - 50% in 2- positie). Het polyonverzadigd vetzuur (C22:6) wordt bij levertraan voor ca 70% in 2-positie ingebouwd.

Bij zoogdieren wordt myristinezuur (C14:O) hoofdzakelijk in 2-positie ingebouwd. Stearinezuur (C18:O) wordt daarentegen hoofdzakelijk gevonden in 1, 3-positie. Voor palmitinezuur (C16:O) wordt, alhoewel minder uitgesproken, een analoge verdeling zoals voor stearinezuur vastgesteld. Varkensvet vormt hierbij echter een uitzondering. Varkensvet wordt typisch gekenmerkt door een zeer hoog gehalte palmitinezuur op de 2-plaats (70 - 80%). Analoge hogere percentages van palmitinezuur worden op plaats 2 gevonden bij het wild varken en de pecari. Bij alle zoogdieren (behalve bij de suidae waar de 2-positie reeds door 16:O ingenomen is) wordt een hoger gehalte onverzadigde vetzuren aangetroffen op 2- dan op de 1, 3-plaats van glycerol.

In fig. 3 zijn de percentages van de voornaamste vetzuren in 2-positie (mole percent in triglyceride >3%) der meest voorkomende dierlijke vetten weergegeven (²⁷, ²⁸). Gezien de duidelijke verschillen van het vetzuurspectrum kunnen deze vetten eenvoudig van elkaar onderscheiden worden. Volgens literatuurgegevens (²⁹, ³⁰) zou het voedervet weinig invloed vertonen op het inbouwen van vetzuren op de 2-positie. Bij varkens, gevoerd met een hoog gehalte onverzadigd vet, daalt het palmitinezuurgehalte van 28 tot 13% terwijl het percentage in 2-positie nagenoeg ongewijzigd blijft (²⁹).

Bepaling van het percentage vetzuur in 2-positie van het triglyceride

Het onderscheid tussen de vetzuren veresterd op 2- en 1, 3-positie kan bepaald worden door behandeling van het vet met

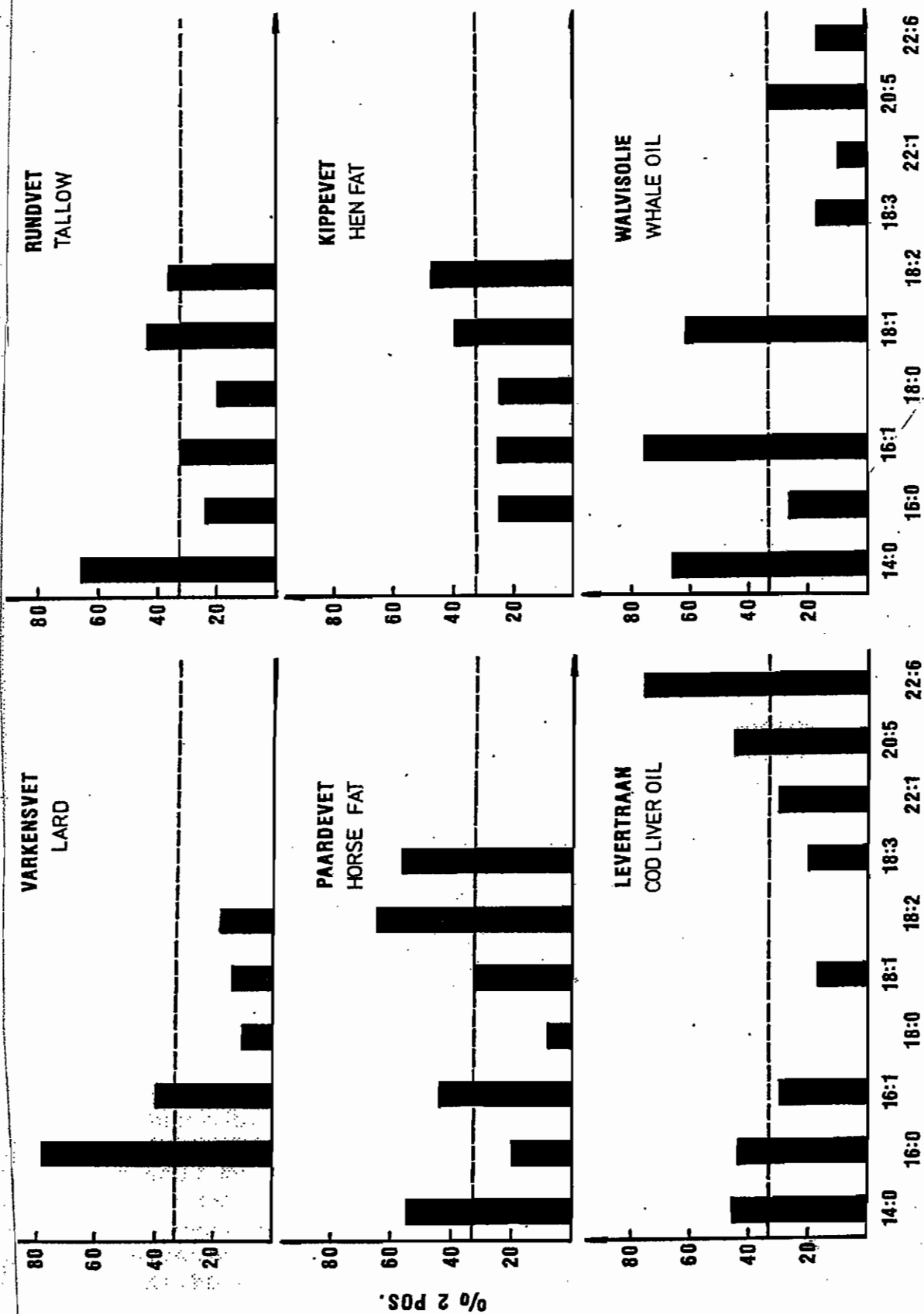


FIG. 3 : Percentage vetzuur in 2-positie bij enkele dierlijke vetten (stippellijn = 33.3%)
(Fatty acid percentage in 2-position of some animal fats (dotted line = 33.3%).)

pancreaslipase. Dit enzyme hydrolyseert specifiek de vetzuren op 1- en 3-plaats (³¹, ³²). Volgens MATTSON et al (³³) wordt het vet gedurende 30 min. geëmulgeerd, bij 37°C en pH = 8, in een milieu bestaande uit water, hexaan, calciumionen en galzouten in aanwezigheid van pancreaslipase. Hierbij wordt een mengsel van resterende triglyceriden, 1-2 en 2-3 diglyceriden, 2-monoglyceriden en vrije vetzuren verkregen (fig. 4). Door toevoegen van 1N zwavelzuur wordt de enzymatische reactie beëindigd.

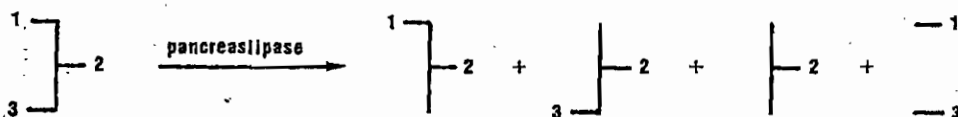


FIG. 4: Reactieproducten ontstaan door enzymatische hydrolyse van een triglyceride met pancreaslipase.

(Reaction products formed by enzymatic hydrolysis of a triglyceride with pancreaslipase)

Het mengsel wordt hierna geëxtraheerd met diëthylether. De 2-monoglyceridefractie wordt geïsoleerd door dunnelaagchromatografie op silicagel geïmpregneerd met boorzuur (³⁴). Na ontwikkelen van de plaat met n-hexaan-diëthylether (50:50, V/V) worden 4 banden verkregen. De 2-monoglycerideband wordt van de plaat afgekrabt en getransesterificeerd (³⁵).

Het percentage van elk vetzuur op de 2-plaats van glycerol wordt berekend uit de vetzuursamenstelling van de 2-monoglyceridefractie en de totale vetzuursamenstelling van het triglyceride volgens :

$$\% \text{ 2-plaats} = \frac{\text{mole \% in 2-monoglyceride}}{3 \times \text{mole \% in triglyceride}} \times 100$$

Een «ad random» verdeling van een vetzuur over de triglyceride molecule komt dus overeen met een percentage in 2-positie van 33.3%.

Toepassing in eetwarenanalyse

Naast het identificeren van zuivere vetten kan deze analyse-techniek aangewend worden tot het identificeren van sommige vleessoorten in bereide (verhitte) vleeswaren. Door hittebehandeling zijn de meeste vleeseiwitten gedenatureerd en kunnen niet langer electroforetisch aangetoond worden. Voor dergelijke analyse wordt het vet uit de vleeswaar geëxtraheerd met een chloroform-methanol mengsel (³⁶). Na opzuiveren (³⁷) en drogen van de vetfractie wordt het 2-positie spectrum bepaald. Door

vergelijking van het bekomen spectrum met dit in fig. 3 kan het soort vet ondubbelzinnig bepaald worden. Een aanzienlijke bijmenging van varkensvlees aan rundsvlees kan vastgesteld worden door stijging van het percentage palmitinezuur en daling van het percentage oleïnezuur op de 2-plaats.

4. SAMENVATTING

Dierlijke en plantaardige vetten kunnen onderscheiden worden door analyse van de sterolfraction. De oorsprong van plantevetten kan veelal afgeleid worden uit het typisch phytosterolspectrum. Dierlijke vetten kunnen geïdentificeerd worden door bepaling van de verhouding van de vetzuren op de 2-plaats tot deze van de triglyceridemolecule.

SUMMARY

Vegetable fats may be discriminated from animal fats through analysis of the sterol fraction. The origin of vegetable fats may be derived from their typical phytosterol pattern. Animal fats are identified by measuring the proportion of the fatty acids in the 2-position of the triglycerides.

REFERENTIES

- 1 BAUDOUIN E. (1878) *Z. Chem. Grossgew.* p. 771.
- 2 VILLAVECCHIA V. en FABRIS G. (1893) *Z. Angew. Chem.* p. 505.
- 3 Official methods of analysis A.O.A.C. 12e ed p. 506.
- 4 BELLIER J. (1905) *Ann. Chem. Analyt.* 10, 52.
- 5 GUYOT A. (1969) *Bull. Rech. Agron., Gembloux* IV p. 484.
- 6 *Handbuch der Lebensmittelchemie* IV, Springer Verlag, Berlin p. 791.
- 7 BÖMER A. (1901) *Z. Untersuch. Nahrungs und Genussmittel* 4, 1070.
- 8 WINDHAUS A. (1906) *A. Chemiker Ztg.* 30, 1011.
- 9 International standard FIL-IDF (1965) 32.
- 10 DEN HERDER P.C. (1955) *Neth. Melk Dairy J.* 9, 261.
- 11 COPIUS PEEREBOOM J.W. (1965) *J. Chromatogr.* 17, 99.
- 12 WOLFMAN J. en SACHS B.A. (1964) *J. Lipid Res.* 5, 127.
- 13 CARGILL D.I. (1962) *Analyst (London)* 87, 865.
- 14 KAUFMANN H.P. en VISWANATHAN C.V. (1963) *Fette, Seife, Anstrichm.* 65, 839.
- 15 BERGMANN E.D., IKAN R., HAREL S. (1964) *J. Chromatogr.* 15, 204.
- 16 IKAN R., HERD S., KASHMAN J. en BERGMAN E.D. (1964) *J. Chromatogr.* 14, 504.
- 17 KARTNIG T. en MIKULA G. (1970) *J. Chromatogr.* 53, 537.
- 18 MORRIS L.J., (1963) *J. Lipid Res.* 4, 357.
- 19 IDLER D.R., SAFE L.M. (1972) *Steroids* 19, 315.
- 20 CLAUDE J.R. (1966) *J. Chromatogr.* 23, 267.
- 21 IKEKANA N., WATANUKI R., TSUDAK en SAKAI K. (1968) *Analyt. Chem.* 40, 1139.
- 22 GRUNWALD C. (1970) *Anal. Biochem.* 34, 16.
- 23 PATTERSON G.W. (1971) *Anal. Chem.* 43, 1165.

- 24 NORDBY H.E. en NAGY S. (1973) *J. Chromatogr.* 75, 187
- 25 Official methods of analysis A.O.A.C. 12e ed p. 504.
- 26 Federal Purchasing Specification for Mayonnaise and Salad Dressing EE-M-131d, March (1967).
- 27 BROCKERHOFF H., HOYLE R.J., WANG P.C. and LITCHFIELD C. (1968) *Lipids* 3, 1, 24.
- 28 BROCKERHOFF H., HOYLE R.J. and WOLMARK N. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* 116, 67.
- 29 MATTSON F.H., VOLPENHEIN R.A. and LUTTON E.S. (1964) *J. Lipid Research* 5, 363.
- 30 BROCKERHOFF H. (1966) *Comp. Biochem. Physiol.*, 19, 1.
- 31 DESNUELLE P. and SAVARY P. (1963) *J. Lipid Research* 4, 369.
- 32 MATTSON F.H. and VOLPENHEIN R.A. (1968) *J. Lipid Research* 9, 79.
- 33 MATTSON F.H. and VOLPENHEIN R.A. (1961) *J. Lipid Research* 2, 58.
- 34 CHRISTIE W.W. in « *Lipid Analyses* », Pergamon press, Oxford p. 268.
- 35 LOURY M. (1967) *Rev. Fr. Corps Gras* 14, 386.
- 36 BLIGH E.G. and DYER W.J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911.
- 37 FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 477.