

Eke 3

FISKERIDIREKTORATET
BIBLIOTEKET

FISKERIDIREKTORATETS KJEMISK-TEKNISKE
FORSKNINGSINSTITUTT

Ny rutinemetode for bestemmelse av
totalfett i marine og vegetabiliske mel.

Ved Lars Aure.

Ny rutinemetode for bestemmelse av
totalfett i marine og vegetabiliske mel.

I.

De anvendte metoder til bestemmelse av totalfett, særlig i sterkt oksyderte mel, er mangelfulle og gir høyst forskjellig fettinnhold i melet, alt etter den metode som anvendes. Disse uoverensstemmelser er i vesentlig grad forårsaket av at mer eller mindre av det sterkt oksyderte melfett er uoppløselig i de vanlig anvendte oppløsningsmidler. En får således varierende og for lave verdier for fettinnholdet avhengig av den type oppløsningsmiddel som anvendes. I ekstra gammelt sildemel kan en eksempelvis ved anvendelse av den offisielle Soxhlet-metode (ekstraksjon med etyleter) finne bare ca. 30 % av den virkelige (opprinnelige) fettmengde i melet. (M.E. Stansby (1)).

Saltsyrehydrolyse av melet med etterfølgende kullstofftetra-klorid-ekstraksjon etter Campen & Geerlings metode (2) gir også, ifølge våre resultater, alt for lavt fettinnhold i lagret sildemel.

Fettbestemmelse etter AOAC's standardmetode (1 og 3), hvor melet først ekstraheres med aceton i Soxhlet-apparat i 16 timer, deretter hydrolyse av melresiduet med saltsyre, og så fornyet ekstraksjon med aceton i 16 timer, gir meget høyere fettverdier for lagret sildemel enn Soxhlet- (etyleter) og Campen & Geerlings metode.

Det fettinnhold en finner med AOAC's metode er mer i overensstemmelse med de verdier en finner etter den her beskrevne nye metode, men aceton utløser varierende mengder vannløselige stoffer fra melet (4), ca. 1-2 % av melvekten, alt etter den meltype en har med å gjøre. Trekket mengden av vannløselige stoffer fra bruttoverdiene etter AOAC's metode, finner en også her alt for lavt fettinnhold i lagret sildemel. Dette skal en komme tilbake til senere.

Kombinerte oppløsningsmidler med større løsningssevne for harskt melfett har vært forsøkt, men enten har de ikke vært gode nok, eller analyseteknikken er blitt for komplisert og tidkrevende for rutine-analyse (1).

I den metode som beskrives nedenfor benyttes en oppløsningsmiddel-blanding bestående av 1 del etylalkohol (96 %) + 1 del kloroform. Denne blanding fantes å være særlig egnet for utløsning av selv meget harskt melfett (fett i 5 år gammelt sildemel).

En har også forsøkt metylalkohol/kloroform (1:1) som oppløsningsmiddel. Denne blanding viste imidlertid meget større tendens til emulsjonsdannelse ved utvaskingen av de vannløselige stoffer fra fettoppløsningen, og syntes dessuten å være litt mindre effektiv som oppløsningsmiddel for harskt melfett.

1. M.E. Stansby: Commercial Fisheries Review 10, no 10, okt. 1948.
2. Campen & Geerling: Chem. Week bl. 50, 385 (1954).
3. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC): Official and tentative methods of analysis. 8 Ed. Washington 1955.
4. Luijpen, Hooghiemstra-Basser og Hindriks: Fette, Seifen Anstreichmittel. Die Ernährungswiss. 60, 951-53 (1958).

II.

a) Metodens prinsipp.

20 g mel elueres med ialt 125 ml av oppløsningsmiddel-blandingen etylalkohol (96 %)/kloroform (1:1) i passende glassrør med bunnkrane. Eluatet (ca. 100 ml) vaskes fri for vannløselige stoffer ved passasje gjennom tårn (passende glassrør) fyllt med glassperler og en spesiell vaskevæske. Den vaskete fettoppløsning nedtappes i en 100 ml målekolbe som fylles til merket med oppløsningsmiddel. Alikvoter av denne oppløsning avdampes, og fettene veies.

b) Detaljert beskrivelse av metoden.

I bunnen av et elueringsrør med glasshane (lengde 20 cm, indre diam. = 2,0 cm, se figur 1) neddyttes ren bomull med glassstav (ca. 1,5 cm høyt bomullsskikt). Av en pålitelig gjennomsnittsprøve avveis 20 g mel som ifylles elueringsrøret gjennom passende, tørr glasstrakt. På toppen av melet anbringes litt bomull med f. eks. en større glassperle oppå (diam. ca. 1 cm) for å hindre at bomull og mel flyter opp under elueringen.

Vasketårnet består av et glassrør med indre diam. = ca. 2,3 cm og med en effektiv vaskehøyde på 75 cm (se figur 1). Det er fyllt med mindre glassperler, diam. = ca. 0,6 cm. Vasketårnet er øverst påsatt en ca. 125 ml's og i bunnen en ca. 75 ml's glassbeholder for oppsamling av vasket eluat. Fra bunnen av sistnevnte beholder kan en ved hjelp av toveis-hane først tappe den vaskete fettoppløsning i en 100 ml målekolbe og deretter vaskevæsken over i større skilletrakt.

I en fordypning på toppen av de mindre glasskuler i vasketårnet er det hensiktsmessig å plasere en større glassperle (diam. = ca. 1 cm) til fordeling av fettoppløsningen fra elueringsrøret.

Vasketårnet ifylles en spesiell vaskevæske, bestående av en blanding av 1000 ml vann + 300 ml etylalkohol (96 %) + 50 ml conc. HCl, til ca. 1 cm over glasskulene.

Elueringsrøret med det innveiete mel innsettes så i vasketårnet slik at dets utløpsspiss nesten berører toppen (midten) av den nevnte større glassperle.

En skilletrakt (ca. 125 ml, med vid boring i avløpshane) plasseres over elueringsrøret slik at dens spiss står ca. 2-2,5 cm over bomullen. Skilletrakten påfylles ca. 125 ml oppløsningsmiddel (etylalkohol (96 %)/kloroform 1:1).

Oppløsningsmidlet i skilletrakten tilføres nå elueringsrøret (med åpen glasshane) så pass fort at dets nivå stiger til 2 a 2,5 cm over bomullen. Da settes tett glasspropp i skilletrakten. Ved stilling av elueringsrørets hane kan da tilførselshastigheten av oppløsningsmidlet reguleres.

Eventuelle luftblærer på toppen av melskiktet i elueringsrøret fjernes forsiktig ved innsetting av tynn, spiss streng mellom bomullen og rørveggen.

Når ca. 30 ml eluat er oppsamlet i bunnen av vasketårnet (det aller meste av melfettet er da eluert) stenges hanen i elueringsrøret som så står natten over (8 a 10 timer) for fullstendig oppløsning av melfettet.

Etter nevnte henstand elueres med resten av oppløsningsmidlet fra skilletrakten som foran beskrevet. Det vaskete eluat i beholderen under vasketårnet vil da utgjøre ca. 60 ml.

Tårnet vaskes så etter med 2 x 5 ml oppløsningsmiddel og det vaskete eluat nedtappes i 100 ml målekolbe.

Vaskevæsken samt to spylinger av tårnet med 30-50 ml vaskevæske tappes over i ca. 500 ml skilletrakt. Denne tilsettes ca. 15 ml kloroform og rystes forsiktig. Etter 10-15 min. henstand overføres den utskilte kloroform-fett-oppløsning i målekolben med det vaskete eluat.

Som regel kan målekolben nå fylles til merket med oppløsningsmiddel. Er eluatet meget uklart eller vaskevæske har skilt seg ut i synbar mengde på toppen av eluatet, tilsettes målekolben passende mengde 100 % etylalkohol til eluatet klarner opp, for så å etterfylle til merket med oppløsningsmiddel.

Etter god omrysting av målekolbens innhold uttas nøyaktig 20 ml eluat for fettbestemmelse.

Ved ekstra finmalt mel vil elueringen gå alt for langsomt. En må da arrangere en tett proppforbindelse mellom elueringsrøret og toppen av vasketårnet, med et glassrør gjennom proppen for sug (vannstrålepumpe). Suget eller elueringshastigheten reguleres med elueringsrørets glasshane.

III. Eksperimentelt grunnlag for metoden.

a) Elueringstid.

Endel av fettene i lagret sildemel er tungt løselig selv i et så effektivt oppløsningsmiddel som (1:1) etylalkohol/kloroform og en fullstendig oppløsning av fettene krever en viss tid. Det beste resultat oppnås når det meste av fettene fjernes ved eluering før oppløsnings-henstand. Om det vesentlige av fettene ikke fjernes før henstand fås ca. 0,5 g fett/100 g mel lavere resultat.

Den tid det tar å oppløse alt fettene i lagret sildemel (nr. 4 i tabell 3) etter at det vesentlige av fettene er fjernet ved eluering på forhånd (ca. 30 ml vasket eluat), vil gå frem av følgende elueringsforsøk:

Lagret sildemel - Ekstraksjonsmiddel: Etylalkohol/kloroform (1:1).

<u>Tabell 1.</u>	<u>Oppløsningshenstand</u> <u>timer</u>	<u>Fett i tårnvasket eluat</u> <u>g fett/100 g mel</u>
	1	11,4
	2	11,65
	5	11,9
	10	12,0
	18	12,0

Av tabell 1 og figur 2 vil en se at en fullstendig utløsning av fett i lagret mel med det anvendte løsningsmiddel krever 8-10 timer. Det vil derfor være praktisk å sette analysen igang om ettermiddagen med oppløsningshenstand natten over.

b) Utvasking av vannløselige stoffer i eluatet.

Å fjerne vannløselige stoffer fra eluatet ved vanlig rysting med spesielle vaskevæsker i skilletrakt har ikke ført til brukbar resultater, på grunn av sterk emulsjonsdannelse selv ved meget forsiktig rysting. En forsøkte derfor forskjellige former for vask av eluatet gjennom tårn, og ble stående ved en metode hvor vasketårnet er et glassrør fylt med glassperler og en spesiell vaskevæske.

Utførte forsøk viste at en vaskevæske bestående av 1000 ml vann + 300 ml etylalkohol (96 %) + 50 ml conc. saltsyre var brukbar til dette formål.

Den mest hensiktsmessige diameter på glassperlene fantes å være ca. 6 mm.

Med disse glassperler og den ovenfor nevnte vaskevæske ble så en bestemt fettoppløsning utvasket i forskjellige tårnhøyder for å finne den minstehøyde av vasketårnet som måtte til for å fjerne de vannløselige stoffer kvantitativt fra eluatet. Vasketårnets indre diameter valgtes lik ca. 2,3 cm.

Resultatene fra disse forsøk er oppsatt i tabell 2.

Utvasking av vannløselige stoffer i eluat.

<u>Tabell 2.</u>	<u>Tårnhøyde</u> cm.	<u>Vaske eluat</u> g fett/100 g mel
	Uvasket eluat	13,8
	25	11,65
	50	11,0
	75	10,7
	100	10,65

Av tabell 2 og figur 3 går det frem at den effektive høyde av vasketårnet må være ca. 75 cm om de vannløselige stoffer i eluatet skal kunne utvaskes fullstendig.

Videre undersøktes hvorvidt et hurtig påløp av eluat til vasketårnet (75 cm) ville influere på vaskeeffektiviteten. Det viste seg da at om 100 ml eluat sendtes gjennom tårnet i løpet av 5, 10, 15 og 20 min. fikk en samme resultat.

c). Vannløselige stoffer i tårnvasket eluat.

Det tårnvaskete eluat ekstrahertes ved to gangers rysting i skilletrakt med 50 ml vaskevæske. Den fraskilte vaskevæske ekstrahertes så med kloroform for å fjerneeventuelt fett. Den for fett befriete vaskevæske ble så fortynnet til et bestemt volum og alikvoter tatt og inndampet for bestemmelse av vannløselige stoffer fra eluatet.

En fant på denne måte bare et ubetydelig innhold av vannløselige stoffer i det tårnvaskete eluat - gjennomsnittlig en mengde tilsvarende 0,1 g/100 g mel.

d) Fett igjen i tårnvaskevæsken.

Litt fettoppløsning vil normalt henge igjen mellom glassperlene i vasketårnet, særlig i dets øvre del. Denne restoppløsning rives med når vaskevæsken tappes ut og tårnet etterspyles to ganger med ca. 30-50 ml vaskevæske.

Ved forsiktig rysting av den avtappede vaske- og spylevæske med ca. 15 ml kloroform i skilletrakt vil kloroform-fettoppløsningen fraskilles i løpet av 10-15 min. Denne oppløsning, som under analysen tilsettes det vaskete eluat, inneholder gjennomsnittlig en fettmengde tilsvarende ca. 0,2 g fett/100 g mel.

e) "Restfett" i eluert mel fra analysen.

Etter eluering av melet med etylalkohol (96 %)/kloroform (1:1), som foreskrevet i analysemetoden, vil der være en liten uoppløselig "fettrest" igjen i den ekstraherte melprøven. Mengden av dette restfett varierer lite for de forskjellige meltyper som er analysert - som regel fra 0,1 til 0,35 g fett pr. 100 g mel (se tabell 3).

Analyse av restfett: Det ekstraherte mel overføres fra elueringsrøret til en 500 ml rundkolbe. Oppløsningsmidlet i melet avdestilleres i vakuum på vannbad. Melet tilsettes så 150 ml vann + 50 ml etanol (96 %) + 5 g kalilut og forsåper på kokende vannbad i ca. 2 timer. Forsåpningsmassen, som nå er ganske tynnflytende, overføres (uten utskilte bein) i større skilletrakt med 200 ml av blandingen (150 ml vann + 50 ml etanol (96 %) + 20 g kok-salt). Skilletraktens innhold syres med saltsyre (15 ml conc. HCl + 50 ml vann) og fettene ekstraheres ved forsiktig rysting med 100 ml kloroform. Etter en tids henstand (varmt) vil kloroformoppløsningen skille fra. Den overføres da i en mindre skilletrakt og vaskes en gang med 50 ml varmt (50°C) vann inneholdende 20 % etanol. Den utskilte kloroform avdampes i veiet rundkolbe for fettbestemmelse.

IV. Analyser av fett i mel.

Skal en oppnå en fullstendig ekstraksjon av det meget oksy-
derte fett i f.eks. lagret fiskemel, må en anvende sterkt polare
fettoppløsningsmidler, som imidlertid også vil utløse betydelige
og varierende mengder vannløselige stoffer fra melet sammen med
fettet. Forutsatt at det anvendte oppløsningsmiddel ekstraherer
alt melfettet, vil en således ikke få korrekte tall for melets
fettinnhold med mindre det vannløselige i fettoppløsningen fjernes
kvantitativt.

Ved den foran beskrevne analysemetode hvor oppløsningsmid-
let er etanol (96 %)/kloroform (1:1), vil en av tabell 3 se at der
ved ekstraksjonen utløses vannløselige stoffer i mengder fra 0,7
til 2,7 g pr. 100 g mel. Når aceton anvendes som fettoppløsnings-
middel, som i AOAC's metode (se tabell 3), utløses også vannløse-
lige stoffer fra melet som går over i fettoppløsningen - for sil-
demel nr. 1 og nr. 2, henholdsvis 1,25 og 1,95 % av melvekten.
Trekkes disse verdier fra de fettprosenten en får med AOAC's meto-
de, får en henholdsvis 8,4 og 9,4 % fett i disse melene, mot 10,35
og 10,7 % ifølge resultatene med vår metode, hvor eluatet helt er
befrikket for vannløselige stoffer. Differansen i prosent rent fett
er for disse to metoder størst (1,9 %) for det lengst lagrete mel
(mel nr. 1, 1955). Av dette tør det gå frem at aceton ikke evner
å løse alt fett i lagret sildemel.

Campen & Geerlings metode gir meget lavere verdier for fett-
innholdet i sildemelene nr. 1 og nr. 2 enn AOAC's og vår metode
(se tabell 3). Dette må skyldes at tetraklorkullstoff er et min-
dre godt oppløsningsmiddel for sterkt oksydert melfett, noe som
vi har konstatert i tidligere forsøk.

Det har lenge vært kjent at ekstraksjon av lagret marint
mel med etyleter i Soxhletapparat gir alt for lave verdier for
fettinnholdet. Dette går da også tydelig frem av tabell 3. I sær-
lig gammelt sildemel (nr. 1, 1955) og avfallsmel av torsk og sei
(nr. 7) finner en med Soxhlet-metoden bare henholdsvis 45,5 og 50
% av det virkelige fettinnhold i melene, mens en for sildemel til-
satt BHT (Butylert hydroksytoluol) og for blåvittingmel finner
ca. 74 %.

Vår elueringsmetode gir også litt høyere verdier for fett-
innholdet i vegetabiliske mel enn Soxhlet-metoden, men forskjellen
er her ikke så markert som for marine mel. Soxhletverdiene utgjør
her ca. 80-95 % av den fettmengde vi finner med vår metode (se nr.
8 til nr. 12, tabell 3).

Den "fettrest" som er igjen i melet etter elueringen (ana-
lysen) - vanlig 0,3 g/100 g mel - er av mindre analytisk interesse,
da den varierer ubetydelig fra mel til mel og er så liten at den
kommer innenfor feilgrensene ved prøvetakingen av melpartiene.

Overensstemmelsen mellom parallelle analyser av samme mel-
prøve er meget god og i det vesentlige bare avhengig av prøvetak-
ingen.

Bergen, desember 1961.

Tabell 3. Bestemmelse av totalfett i mel.

Meltype	Mel nr.	Prod. dato	Fettbestemmelse ved eluering m/etanol (96%)/kloroform (1:1)				Fettbestemmelse etter Soxhlet (etyleter)		Fettbestemm. etter Campen & Geerling (HCl-CCl ₄) g fett/100g mel	Fettbestemmelse etter AOAC's metode (Aceton-HCl-Aceton)		
			Eluat i tørrst. / 100g mel	Vannløsel. stoffer i eluat, g/100g mel	I vasket eluat, fett/100g mel	Restfett i ekstrah.mel g/100g mel	g/100g mel	% av verd. funnet ved eluering m/alk./klorof		Bruttoverdi i tørrst. / 100g mel	Vannløsel. stoffer g/100g mel	Nettoverdi i fett/100g mel
Sildemel	1	7/3-55	12,35	2,0	10,35	0,3	4,7	45,5	7,15	9,65	1,25	8,4
Sildemel u/BHT	2	5/3-60	13,1	2,4	10,7	0,3	6,6	61	7,5	11,35	1,95	9,4
Sildemel m/BHT	3	"	13,4	2,3	11,1	0,2	8,3	75				
Sildemel av frossen lagret presskake	4	17/5-61	14,8	2,7	12,1	0,3	7,5	62				
Sildemel av islandssild	5	19/10-1961	-	-	9,8	0,3	6,7	68,5				
Blåhvittingmel	6	sommer 1960	8,75	0,7	8,05	0,3	6,0	74,5				
Avfallsmel av torsk og sei	7	jan. 1961	4,9	0,9	4,0	0,1	2,0	50				
Vegetabiliske mel:												
Soyakakemel	8	-	7,1	0,7	6,4	0,35	5,2	81,5				
Linkakemel	9	-	8,1	0,7	7,4	0,35	6,2	84				
Jordnøttkakemel	10	-	7,0	0,8	6,2	0,5	5,2	84				
Kokuskakemel	11	-	8,9	1,5	7,4	0,3	7,0	95				
Havregrøp	12	-	7,8	2,2	5,6	0,5	5,2	93				
Bygggrøp	13	-	3,4	0,8	2,6	0,25	2,1	81				

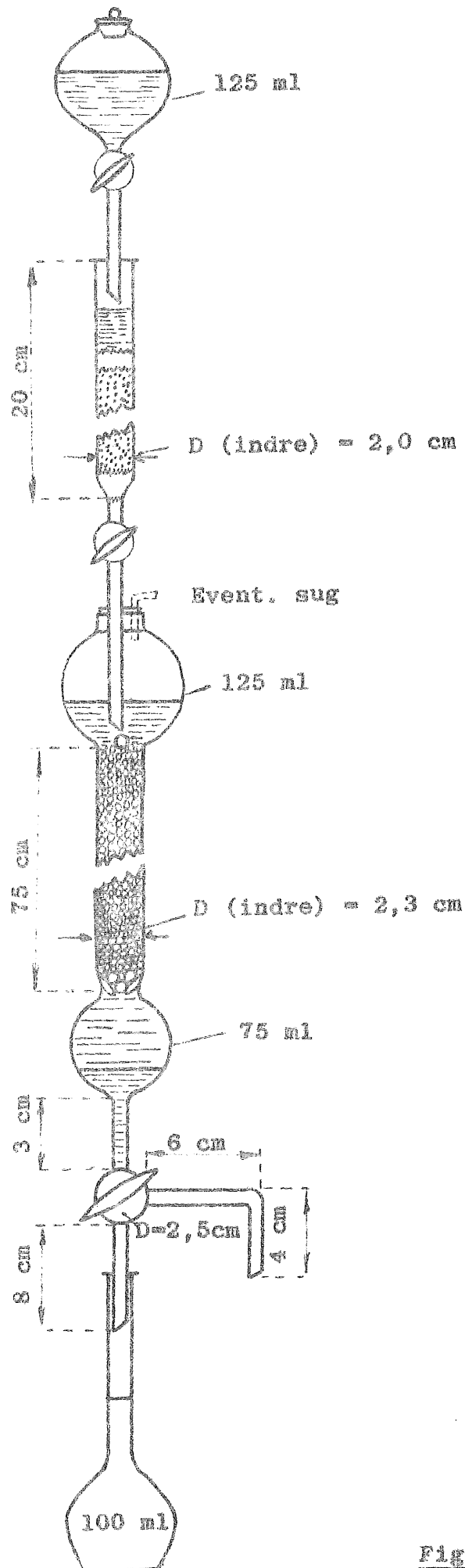


Fig. 1.

