

Undersøgelse af fedtstoffers krystalformer

Røntgenpulverdiffraktion kan bruges som analyseværktøj til at bestemme fedtstoffers krystalformer. Strukturen af fedtstofferne er vigtig for kvaliteten af et fødevarerprodukt

Af Nina Lock,^a Markus Klinger,^a Jesper Munk Jakobsen,^b Bjarne Juul,^b Finn Krebs Larsen,^a Bo Brummerstedt Iversen^a

^aKemisk Institut, Aarhus Universitet, ^bAarhusKarlshamn

God chokolade skal smage godt og have den rigtige konsistens, så den smelter i munden og frister med sin glatte overflade. Chokoladens tekstur og smeltepunkt afhænger af fedtstoffernes krystalstruktur. Fedtstofferne kan antage forskellige strukturer, hvoraf især én er uønsket i fødevarer. Det er velkendt, at chokolade, der på en varm dag er smeltet og efterfølgende størknet, ofte får en kedelig grålig overflade. Det skyldes en ændring i fedtstoffets krystalform.

Chokoladeprodukter må indeholde op til 5% vegetabilsk fedtstof (der ikke er udvundet af kakaobønner) og stadig kaldes chokolade. Et produkt, der indeholder mere end 5%, betegnes vekao. Nogle vegetabiliske fedtstoffer kan påvirke chokoladens fysiske egenskaber i gunstig retning og samtidig være konkurrencedygtige på prisen. For fedtstofproducenterne er det derfor essentielt at kende fedtstoffers krystalformer. De kan undersøges vha. røntgenpulverdiffraktion og termisk analyse.

I det følgende beskrives resultater fra et 3. års studenteprojekt på Kemisk Institut, Aarhus Universitet, udført i samarbejde med AarhusKarlshamn (det tidligere Aarhus United A/S), der bl.a. producerer specialfedtstoffer til chokolade og konfekture.

Triglycerider

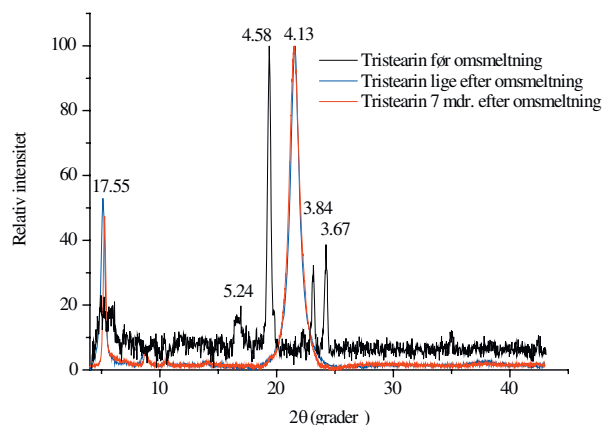
Langt størstedelen af de fedtstoffer, der indgår i vores fødevarer, er triglycerider, der er estere af glycerol og tre fedtsyrer. Fedtsyrerne er uforgrenede carboxylsyrer med et lige antal carbonatomer op til 24. Ofte er to eller alle tre carboxylsyrer i et triglycerid forskellige. Fedtsyrerne inddeles i mættede, monumættede og polyumættede afhængigt af antallet af dobbeltbindinger i carbonkæden. Naturlige umættede fedtsyrer forekommer hovedsageligt i cis-konformationen. Triglycerider er i sig selv farveløse og uden smag, og anvendelsesmulighederne af forskellige olier er afhængige af den kemiske sammensætning, der igen afhænger af råvarerne, olierne er udvundet af. De fleste råvarer, der oparbejdes i den danske olieindustri er af tropisk oprindelse og omfatter bl.a. kokosnødder,

palmekerner, sheanødder, jordnødder og sojabønner. Af danske råstoffer er det kun raps- og fiskeolie samt svine- og oksefedt, der anvendes i betydelige mængder. Olierne anvendes primært som spiseolier og i margarine- og chokoladeindustrien [1].

Teknisk betydning af de polymorfe former

De polymorfe former af triglycerider har forskellige fysiske egenskaber, hvoraf nogle kan være uønskede i fødevarer. Der skal derfor tages visse hensyn i produktionen af f.eks. margarine og chokolade for at fremstille et ensartet produkt, hvis kvalitet er stabil over en vis tid. Fra et teknisk synspunkt er det overgangen β' til β , der har størst betydning. Ved dannelse af β -fasen i margarine ændres fedtstoffets tekstur, og resultatet er en uønsket grynet fornemmelse i munden [2].

Tilsvarende kendes det uønskede fænomen *bloom*, når chokoladen får en mat og grålig glansløs overflade. Det skyldes lysspredning fra store fedtkrystaller på overfladen eller fra små sprækker, der indeholder luft. For at mindske risikoen for dannelsen af *bloom* er det nødvendigt at forkrystallisere produktet under produktionen, hvilket gøres ved at behandle chokoladen med en temperaturprofil. Tempereringen starter med afkøling af fedtstoffet, indtil krystalli-



Figur 1. Røntgenpulverdiagrammer af tristearin i β - og α -formen.

Diffraktion

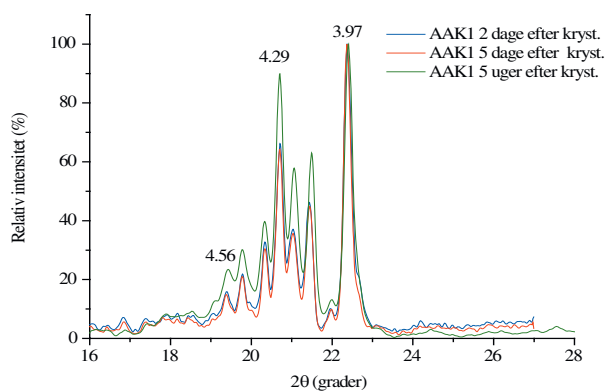
Hvis et stof har langtrækkende orden kaldes det krystallinsk, og der er en enhed i strukturen, enhedscellen, som ved translation i tre dimensioner opbygger det krystallinske stof. Derimod har et amorf stof kun korttrækkende orden. Røntgenkrystallografi kan give information om enhedscellens opbygning. Røntgenpulverdiffraktion er en meget anvendt og forholdsvis simpel teknik til karakterisering og identificering af krystallinske materialer. Ligeledes kan det kvantitative forhold mellem forskellige faser af et materiale ofte bestemmes.

Et optisk gitter består af mange fuldstændigt parallelle transparente linjer med en afstand, der er større end lyskildens bølgelængde. Sendes lyset ind i det optiske gitter, virker alle linjerne som sekundære lyskilder, der ifølge Huygens princip udsender lys i alle retninger. I nogle retninger er lyset fra de forskellige linjer i fase, og der opstår konstruktiv interferens. Der ses kun lys i de retninger, hvor der er konstruktiv interferens.

En krystal er et regulært, tredimensionelt arrangement af atomer, der danner forskellige planer. På samme måde som linjerne i det optiske gitter kan planerne diffraktere lys med en bølgelængde, der er sammenlignelig med afstanden mellem atomerne, hvilket typisk er omkring 1-3 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$). Afstanden mellem to identiske krystalplaner kaldes d -værdien. Interferensbetingelsen udtrykkes ved Braggs lov, hvor λ er bølgelængden, og θ_{hkl} er spredningsvinklen for krystalplanen:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl}, \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

Et pulverdiagram viser intensiteten af det diffrakterede lys som funktion af 2θ . Linjernes positioner i pulverdiagrammet bestemmes af enhedscellens størrelse og form, mens intensiteten bestemmes af atomtyperne og deres positioner i enhedscellen. Et pulverdiagram for et krystallinsk materiale har skarpe reflekser, hvorimod et pulverdiagram for et amorf stof ikke giver veldefinerede reflekser pga. den manglende langtrækkende orden. Ved brug af Braggs lov kan man ud fra refleksernes 2θ -værdier opnå information om de karakteristiske d -værdier for det krystallinske stof.



Figur 2. Pulverdiagram af AAK1 i β' -formen som funktion af tiden.

sationen starter. Derefter varmes der op til en temperatur, hvor krystallitterne i de ustabile lavsmeltende polymorfe former smelter, så kun den ønskede polymorfe form forbliver krystalliseret. Variationer i fedtsyrernes indbyrdes længde i et triglycerid kan nedsætte hastigheden af β' til β -overgangen [4].

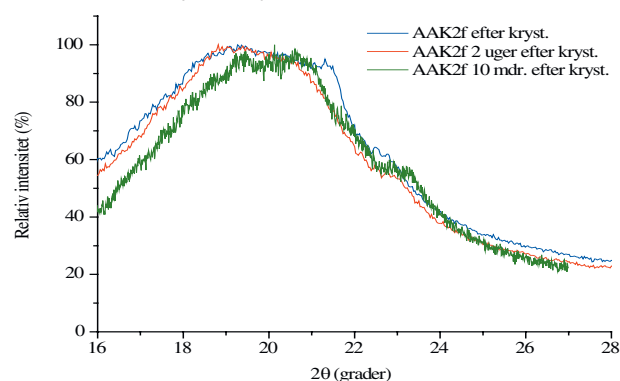
Fedtstofanalyser foretaget ved Kemisk Institut, Aarhus Universitet
Røntgenpulverdata er blevet optaget på et STOE pulverdiffraktometer ved anvendelse af Cu $K\alpha$ -stråling. Fire fedtstoffer er undersøgt over en periode på 10 måneder: tristearin, AAK1, AAK2f og AAK2m. De tre sidstnævnte fedtstoffer er produkter fra firmaet AarhusKarlshamn. Fedtstofferne blev behandlet i temperaturintervallet -10° til 60°C , hvilket svarer til det område fedtstofferne i praksis udsættes for i forbindelse med produktion og salg. Prøverne til pulverdiffraktionsanalyserne blev fremstillet ved smeltning af fedtstofferne ved 60°C (Tristearin-prøverne blev smeltet ved 90°C), hvorefter en dråbe fedtstof blev placeret på en prøveholder. Der

blev fremstillet to identiske prøver, som dernæst blev afkølet i hhv. køleskab (5°C) og fryser (-10°C) i 30 min. Prøverne blev efterfølgende udelukkende opbevaret ved stuetemperatur (svarende til de betingelser chokolade udsættes for i butikken og hos forbrugeren). For at følge korttids- og langtidsudviklingen blev der optaget pulverdiagrammer af prøverne for de enkelte fedtstoffer. Ved undersøgelse af fedtstoffers krystalformer kan pulverdiffraktion kombineres med differential scanning calorimetry, DSC, hvor faseovergange, herunder prøvens smeltepunkt, kan bestemmes. Desværre sletter DSC-målinger pga. smeltning den »termiske forhistorie« af en prøve. Derimod kan der måles adskillige pulverdiagrammer på en prøve, så fedtstoffets langtidsudvikling kan følges. DSC-målingerne er udført på et PL Thermal Sciences termisk analyseudstyr.

Prøver

Tristearin

Triglyceridet tristearin består af glycerol forestret til tre stearinsyre-molekyler ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$). Den fra AarhusKarlshamn



Figur 3. AAK2f er amorf.

PAT- Proces Analytisk Teknologi



Nordens ledende leverandør

- Erfaring og stor installeret base
- Speciale i Sampling
- Kurser og uddannelse
- PAT - startpakker

Alt i FT•NIR on-line Spektroskopi

Hvilken forskel kan vi gøre for dig?

Besøg os på ScanLab 2006



interline
spectroscopic analytical solutions

Københavnsvej 261 :: 4000 Roskilde :: Denmark :: +45 4675 7046

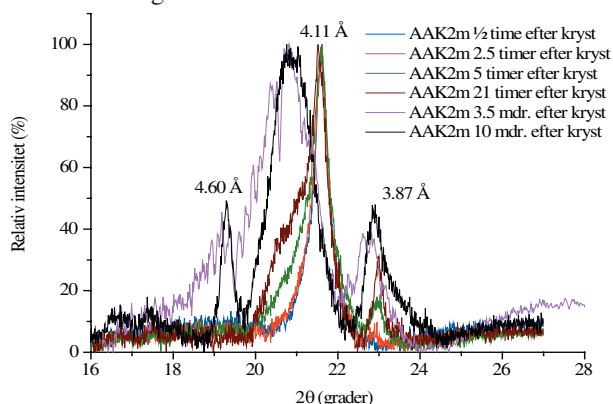
Besøg os på www.q-interline.com

Fedtstofkrystallografi

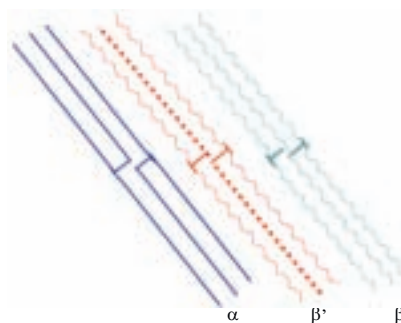
Orienteringen af en fedtsyres zigzagmønstrede carbonkæder i forhold til nabofedtsyrernes kæder betyder, at fedtstoffer findes i flere polymorfe former. Der er kun én termodynamisk stabil form af et givet triglycerid. Der kan være en stor energibarriere for omdannelsen mellem to faser, og reaktionshastigheden for omdannelsen fra en metastabil til den stabile fase kan derfor være meget lav. De metastabile faser kan altså være kinetisk stabile, så fedtstoffet ikke nødvendigvis omdannes inden for fødevarens holdbarhedsperiode. Kulbrintemolekyler med lange carbonkæder, herunder fedtsyrer, pakker i fast fase uafhængigt af funktionelle grupper. Pakningen af kæderne kan beskrives ved indførelse af en subcelle. Subcellen er den mindste repetitionsenhed inden for et kædelag. Den beskriver det tredimensionelle forhold mellem ækvivalente translationsrelaterede positioner inden for en eller to kulbrintekæder (afhængigt af krystalsystem) og kæderne ved siden af den/dem. Subcellen defineres ved akserne a , b og c , samt de tre vinkler mellem akserne. c er translationen mellem ækvivalente positioner i samme kulbrintekæde, mens a og b er translationer til siden. Der er defineret subceller, der tilhører det triklone, det monokline, det orthorhombiske og det hexagonale krystalsystem. En carbon-carbon-zigzagkædes plan er altid vinkelret på eller parallel med nabokæderne. Subcellepakningen beskrives ud fra subcellesymmetrien og ud fra, om nabokæder er indbyrdes parallelle eller vinkelrette. De forskellige subcellepakninger kan karakteriseres ved røntgenpulverdiffraktion, da hver pakning er karakteriseret ved et unikt sæt d -værdier mellem 3,5 og 5,5 Å. For de forskellige polymorfe former af fedt-krydstaller (figur 5 og 6) anvendes nomenklaturen defineret i tabel 1 [2,3]. Sædvanligvis opfattes fedtstoffer ikke som krystallinske stoffer som f.eks. køkkensalt og sukker, men der er langtrækkende orden i mange fedtstoffer [2]. Den termodynamisk mest stabile form er β -formen, og den mest ustabile er α -formen. For nogle fedtstoffer findes der flere β' -former, der nummereres efter aftagende smeltepunkt. Et højere smeltepunkt indikerer, at der skal relativt mere energi til at bryde pakningen af molekylerne. Den fuldstændige sekvens af faseovergange for triglycerider kan være givet som illustreret i figur 7. β -formen kan dannes direkte fra enten en smelte eller et solvent, så fedtstoffet ikke omlejrer med tiden. Da faserne gradvis opnår en lavere Gibbs-energi ved den polymorfe transformation, er faseomdannelsen irreversibel.

udleverede tristearinprøve blev ikke omsmeltet umiddelbart efter modtagelsen, og som det ses af tabel 1, antog prøven β -formen. En ny prøve blev dernæst forberedt ved omsmelting; den antog α -formen, som ikke ændredes over syv måneder (figur 1). Det vides ikke, hvilken termisk historie den udliveredede tristearin i β -formen havde. Tristearin skal ikke nødvendigvis tempereres for at få β -formen, men blot køles langsomt under krystalliseringen. Den krystalliserede α -form omlejrer ikke til andre krystalformer ved stuetemperatur og er derfor kinetisk stabil.

Ud over de i tabel 1 beskrevne karakteristiske d -værdier, observeres reflekser ved lave vinkler med d -værdier omkring 16-18 Å. Længden af en mættet carbonkæde på hhv. 16 og 18 carbonatomer er omtrent 19 Å og 21 Å. De observerede lavvinkelreflekser rela-



Figur 4. AAK2m krystalliserer i α -formen, men omdannelsen til β' -formen begynder allerede efter 2,5 time.



Figur 5. Triglycerider i forskellige krystalstrukturer. Fra venstre: α (rotationel uorden), β' (vinkelrette kæder) og β (parallelle kæder).

terer til kædelængden, idet vinklen mellem kædeaksen og krystalplanerne er forskellig fra 90°. d -værdierne kan beskrives som en lineær funktion af antallet af CH_2 -grupper i fedtsyren. Der kan ligeledes observeres lavvinkelreflekser for AAK1 og AAK2m.

AAK1

Fedtstoffet AAK1 krystalliserer langsomt under dannelse af en β' -form (tabel 1). Formen er stabil, idet diffraktionsmønstret ikke ændrer sig med tiden (figur 2). Intensiteten af refleksken ved 3,97 Å falder med tiden relativt til de øvrige reflekser. Det kan skyldes forskelle i baggrundsintensiteterne ved de forskellige målinger, eller at en del af AAK1 krystalliserer på en måde, der ikke forklares ud fra den simple model i tabel 1. Sidstnævnte understøttes af, at der ses mere end to reflekser i pulverdiagrammet. Herunder ses en svag refleks ved 4,6 Å, der ikke er dominerende som i en β -form, og den relative intensitet af denne refleks vokser ikke betydeligt med tiden, som det ville være tilfældet ved en omlejring fra β' - til β -formen. Det er et eksempel på, at krystallisering af stoffer med lignende, men ikke identisk, molekylerstruktur og blanding af sådanne forbindelser ikke stringent følger tabel 1.

AAK2

AAK2 er et nyt vegetabilsk specialfedtstof, der vinder indpas i chokolade- og konfekturindustrien. AAK2 separeres under produktionen i flere fraktioner.

AAK2f er den lavtsmeltende fraktion af AAK2. Pulverdiagrammet viser både lige efter udkrystallisationen og efter 10 måneder en meget bred top, hvilket indikerer, at stoffet er amorf (figur 3).

AAK2m er en højere smeltende fraktion af AAK2. Det første pulverdiagram på figur 4 er målt en halv time efter krystallisationen. Det viser en enkelt dominerende top ved 4,11 Å, der indikerer en α -form. Allerede 2,5 time efter krystallisationen begynder der at dannes en skulder ved lidt højere d -værdier, samtidig med at der kommer en top ved 3,87 Å. Det tyder på en omdannelse mod en β' -form. Faseskiftet er indikeret endnu tydeligere efter et døgn, hvor der stadig er noget af α -formen til stede. Den kvantitative sammensætning kan ikke bestemmes ud fra pulverdiagrammerne

Krystalform	Karakteristika
α	Hexagonal kædepakning Én stærk refleks omkring $d=4.15$ Å.
β'	Orthorhombisk vinkelret pakning To stærke reflekser nær $d=3.80$ Å og $d=4.20$ Å
β	Triklin parallel subcelle Dominerende refleks ved $d=4.6$ Å og mange svage reflekser omkring $d=3.8$ Å og $d=5.4$ Å.

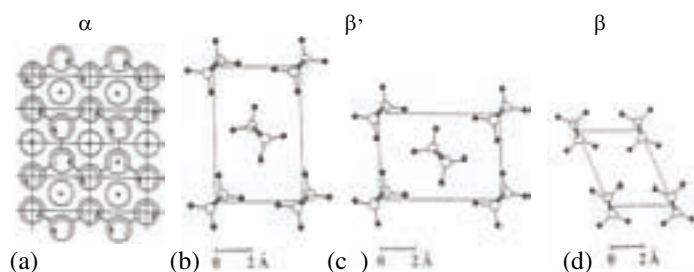
Tabel 1. Fedtstoffers krystalformer.

vacuubrand

Det bedste vakuumudstyr til laboratoriet – oliefrit, pladsbesparende, støjsvagt og pålideligt. Pumper og vakuumsystemer med den mest avancerede elektroniske styring. For hurtig og stabil evaporation, tørring, vakuumkoncentration, pumpning af aggressive gasser...

Buch & Holm

Marielundvej 36 - 2730 Herlev
Tlf. 44 54 00 00 - Fax 44 92 31 00
www.buch-holm.dk

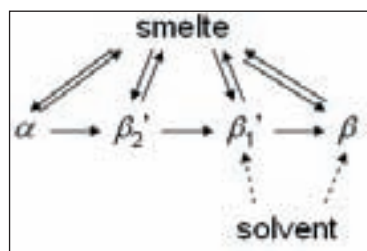


Figur 6. Subcellerne set langs kædeaksen [2]. (a) Hexagonal pakning (rotationel uorden), (b)-(c) To orthorhombiske subceller, (d) Triklin subcelle.

grundet sammenfaldet af toppen ved 4,2 Å for de to faser. DSC-målinger tyder på, at fedtet efter et døgn består af en blanding af α - og β' -fasen. Pulverdiagrammerne på figur 4 viser endvidere, at der over længere tid sker en fortsat omdannelse til β' -formen. På 10 måneders diagrammet observeres det, at der er opstået en linje ved 4,6 Å. Hvis denne refleks ikke er en del af β' -diagrammet, som det er tilfældet i AAK1, tyder det på, at der i det lange løb dannes en mindre mængde β -fase. Konklusionen er derfor, at hvis β -fasen opstår, sker det først adskillige måneder efter krystallisationen.

Konklusion

For tristearin er α - og β -krystalformerne eftervist. α -formen dannes ved krystallisation direkte fra en smelte ved afkøling i køleskab og fryser. β -formen er påvist for tristearin udleveret af AarhusKarlshamn.



Figur 7. Faseovergange mellem polymorfe former. Efter [2].

AAK2m omlejrer i løbet af få timer fra α - til β' -formen. Efter 10 måneder er β' -formen dominerende. Det kan ikke udelukkes, at der er opstået lidt af β -formen efter 10 måneder.

De undersøgte fedtstoffer har altså forskellige strukturer. Krystalliniteten har indflydelse på fedtstoffets fysiske egenskaber og anvendelsesmuligheder samt deres forarbejdning. Det er umiddelbart en stor fordel, at fedtstofferne efter få timer antager strukturer, der er forholdsvis stabile over 10 måneder. Det betyder, at der ikke sker en struktur- og derved teksturændring af fødevarer inden for det tidsinterval. Det amorf fedtstof AAK2f kan desuden anvendes uden temperering.

For alle de fire fedtstoffer gælder, at der i pulverdiagrammerne ikke er observeret forskelle mellem identiske prøver nedkølet i fryser og i køleskab. Det betyder, at nedkølingsraten i dette tilfælde er ubetydelig for krystalformen af de undersøgte fedtstoffer.

E-mail-adresse

Bo Brummerstedt Iversen: bo@chem.au.dk

Referencer

1. Brancheudvalgene med sekretariat i Industrifagene. Fagområde Procesindustrien: Oliekemi. 1986.
2. Garti, N., Sato, K. *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*, Marcel Dekker, 1988.
3. Small, D.M. *The Physical Chemistry of Lipids. From Alkanes to Phospholipids*, Plenum Press, New York, 1986.
4. van Malsen, K.; van Langevelde, A.; Peschar, R., Schenk, H. *Recent Res. Devel. Oil Chem.* **1999**, 3, 141.
5. Chapman, D. *The Structure of Lipids*, Methuen and Co Ltd., London, 1985.

BIOHIT
Innovating for Health

The Promise of Lighter Liquid Handling

Besøg vores stand på BioTech Forum 2006

mLINE®
Manuelle Enkelt- & Multikanal Pipetter

"Enjoy your work"
mLINE pipetter gør det muligt.

Egenskaber som: den pipette på markedet, hvor der skal anvendes færrest kræfter, letvægter med en unik "Opti-load" af spids påsætning, som gør mLINE pipetten til det bedste valg af en manuel pipette. Vigtigst er at mLINE pipetten er komfortabel at anvende time efter time, dag efter dag - uden at risikere en overbelastning.

Tilbuddet gælder 1. Sept. - 30 Nov. 2006

Vallensbækvej 22A
2605 Brøndby
Tlf. 4343 3057

DANDIAG
Pipetter ApS

www.dandiag.dk
dandiag@dandiag.dk
Fax 4343 3059

Særbud !
Køb 4 mLINE pipetter efter eget valg og få den billigste pipette, samt en karrusel stander GRATIS.

Cell Counting and Viability
Mix - Aspirate - Analyse

Measurement chamber
Immobilized nuclear dye
Mixing
Volume calibration
Sample aspiration

NucleoCounter®

- Analysis in 30 sec.
- High precision
- Easy to use
- Calibration free
- Maintenance free
- Portable

chemometec
ChemoMetec A/S
Phone +45 4813 1020
Fax +45 4813 1021
www.chemometec.com

Mød os på Biotech Forum & ScanLab
26.-28. september 2006 - Stand C4-053

Technology that counts