ENIGE GEWICHTSANALYTISCHE METHODEN TER BEPALING VAN HET VETGEHALTE VAN MELK EN MELKPRODUKTEN

P. WALSTRA

NN08201.315

ENIGE GEWICHTSANALYTISCHE METHODEN TER BEPALING VAN HET VETGEHALTE VAN MELK EN MELKPRODUKTEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD
VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS, IR. W. F. EIJSVOOGEL,
HOOGLERAAR IN DE HYDRAULICA, DE BEVLOEIING,
DE WEG- EN WATERBOUWKUNDE EN DE
BOSBOUWARCHITECTUUR
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT
VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN
OP VRIJDAG 3 NOVEMBER 1961 TE 16 UUR

DOOR

P. WALSTRA

H. VEENMAN EN ZONEN N.V. – WAGENINGEN – 1961

STELLINGEN

I

Het heeft geen zin te spreken van het gehalte aan in vloeibare melkprodukten voorkomend „vrij vet".

H. LAGONI & K. H. PETERS, Kieler Milchw. Forschungsb. **11**, 291, 1959 en **12**, 119, 1960.

II

Ook al mocht tijdens het karnen kristallisatie van emulgerende stoffen plaats vinden, dan is dit verschijnsel toch niet van belang ter verklaring van het karnproces.

W. MOHR & E. MOHR, Milchwiss. **10**, 117, 1955
R. VON KONOW, Milchwiss. **13**, 110, 1958.

III

De in de „Code of Principles Concerning Milk and Milk Products" gegeven definitie van boter is te ruim gesteld.

Code of Principles, 1e ed., F.A.O. Rome, 1960

IV

Het bereiden van Goudse en Edammer kaas van de beste kwaliteit is meestal slechts mogelijk door rauwe melk te verkazen, maar anderzijds geeft dit al te vaak mislukkingen. Met het oog op het toepassen van deze werkwijze in de fabriek is het daarom gewenst, dat onder meer de invloed van enkele methoden van voorbehandeling van de melk wordt onderzocht, zoals:

a. „supercentrifugering"
b. spontaan laten opromen van de melk, gevolgd door pasteuriseren van de scheproom.

V

De huidige bepaling, gebruikt bij de indeling van boerderijmelk in kwaliteitsklassen, houdt voor direct na de winning diep gekoelde melk eigenlijk een ander beoordelingscriterium in, dan voor melk die op de thans meer gebruikelijke wijzen is behandeld.

VI

De remmende werking van de lacteninen L_3 uit melk op bepaalde stammen van *Sc. lactis* en *Sc. cremoris* mag waarschijnlijk niet alleen worden toegeschreven aan agglutinatie en het vervolgens met de vetbolletjes mee opromen van de betreffende bacteriën.

R. C. WRIGHT & J. TRAMER, J. Dairy Res. **24**, 174, 1957
A. PORTMANN & J. AUCLAIR, Ann. Inst. Past. **97**, 598, 1959

VII

Tot nu toe is niet aangetoond, dat bacteriën van het genus *Lactobacillus* geen invloed kunnen hebben op de eiwitafbraak in Goudse en Edammer kaas.

J. STADHOUDERS, Ned. Melk & Zuivelt. **14**, 83, 1960

Ir. P. WALSTRA
Wageningen, nov. 1961

VIII

Het tussen gekruiste nicols oplichten van de rand van de vetbolletjes in boter, moet toegeschreven worden aan anisotropie, en kan niet worden verklaard door veranderingen in polarisatie tengevolge van reflectie aan het grensvlak van de bolletjes.

E. KNOOP, Kieler Milchw. Forschungsber. **11**, 237, 1959

IX

De theoretische beschouwingen van HAUGAARD & PETTINATI betreffende de lichtverstrooiing door melkvetbolletjes zijn voor een belangrijk deel onjuist, ondanks de schijnbare overeenstemming tussen deze theorieën en hun proefuitkomsten.

G. HAUGAARD & J. D. PETTINATI, J. Dairy Sci. **42**, 1255, 1959

X

Het verkleinen van de oliedruppeltjes van een olie-in-water-emulsie in een klassieke homogenisator (plunjerpomp met homogeniseerklep) moet waarschijnlijk in hoofdzaak worden toegeschreven aan op de druppeltjes uitgeoefende schuifkrachten.

XI

Bij het bepalen van de warmtedoorgangscoëfficient van een vertikale-pijpverdamper, dient men het verschil tussen de temperatuur van de condenserende stoom en de gemiddelde vloeistoftemperatuur als uitgangspunt voor de berekening te nemen.

J. VELDSTRA, Proefschrift, Wageningen 1960

XII

Analytische balansen met ongelijkarmig juk en berustend op het principe van substitutieweging, zijn in bepaalde gevallen minder geschikt dan eenvoudiger typen.

L. BIÉTRY, Chimia **11**, 92, 1957

Overdruk 637.127.1

MEDEDELINGEN VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN, NEDERLAND **61** (8), 1-69 (1961)

ENIGE GEWICHTSANALYTISCHE METHODEN TER BEPALING VAN HET VETGEHALTE VAN MELK EN MELKPRODUKTEN

(With English summary)

door

P. WALSTRA

Laboratorium voor Zuivelbereiding en Melkkunde van de Landbouwhogeschool, Wageningen

(Ontvangen/*Received* 17.5.61)

INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING 2

2. DE METHODE RÖSE-GOTTLIEB 4
2.1. Ontwikkeling 4
2.2. Praktische uitvoering 5
2.2.1. De hoeveelheden reagens 5
2.2.2. Het extraheren 7
2.2.3. Het verwijderen van de oplosmiddelen 7
2.2.4. Het wegen 9
2.2.5. De blanco waarden 9
2.2.6. Voorschrift 10
2.3. Vet en vetachtige stoffen 10
2.3.1. Botervet 10
2.3.2. Vrije vetzuren 10
2.3.3. Fosfatiden 12
2.4. De werking van de extractiemiddelen 14
2.4.1. Discussie 14
2.4.2. Consequenties 17
2.5. Extractie van niet vetachtige stoffen 18
2.5.1. Algemeen 18
2.5.2. De grootte van het monster; hypothesen 20
2.5.3. De grootte van het monster; experimenten 21
2.5.4. Voortgezette extractie 23
2.5.5. Discussie 24
2.6. Het toevoegen van zout 25
2.7. Toepassing op melkprodukten 28
2.8. Reproduceerbaarheid 29
2.8.1. De afwijkingen binnen een serie 29
2.8.2. De afwijkingen tussen series 32
2.8.3. Proeven met verschillend grote monsters 32
2.8.4. Fosfatidengehalten 33

3. METHODEN MET ZURE ONTSLUITING 34
3.1. Ontwikkeling 34
3.1.1. Literatuuroverzicht 34
3.1.2. Moeilijkheden bij de extractie *(ZAP)* 35

3.1.3. De oorzaak van de moeilijkheden bij de extractie bij *ZAP* 37
3.1.4. Enkele pogingen ter verbetering *(ZAP)* 38
3.1.5. Voorschriften *(SBR* en *ZAP)* 38
3.2. Vet en vetachtige stoffen *(ZAP* en *SBR)* 39
3.2.1. Inleiding 39
3.2.2. Vrije vetzuren 39
3.2.3. Fosfatiden 42
3.3. Extractie van niet vetachtige stoffen 43
3.3.1. *SBR* 43
3.3.2. *ZAP* 46
3.3.3. Vergelijking van *SBR* en *ZAP* 48
3.3.4. Pogingen de hoeveelheid niet-vet te verminderen 50
3.4. Vergelijking van *ZAP* met *RG* 51
3.5. Toepassing op enkele produkten 54
3.5.1. Melkprodukten 54
3.5.2. Kaas 55
3.6. De methode „WEIBULL" 57
3.6.1. Literatuuroverzicht 57
3.6.2. Eigen onderzoek 58
3.7. Reproduceerbaarheid 60

4. DISCUSSIE EN SAMENVATTING 62

SUMMARY 65

WOORD VAN DANK 68

LITERATUUR 68

1. INLEIDING

Gedurende de laatste honderd jaar, vooral aan het eind van de negentiende eeuw, zijn talloze methoden ter bepaling van het vetgehalte van melk en melkprodukten ontwikkeld. BAKALOR (1955) heeft een uitgebreid, hoewel nog geenszins volledig overzicht gegeven. De meeste van deze methoden zijn nu verlaten. De in de praktijk gebruikelijke werkwijze is thans de butyrometrische, b.v. de methode GERBER. Hierbij wordt van een volume melk e.d. het vet ontsloten en afgescheiden, waarna het volume van het vet wordt gemeten, maar uitgedrukt in gewichtsprocenten van het monster. Zo zijn betrekkelijk snel en eenvoudig, redelijk reproduceerbare uitkomsten te verkrijgen, maar zo'n methode heeft altijd een empirisch karakter en dient dus geijkt te worden op een basismethode. Als zodanig zijn enkele voorschriften in gebruik, waarbij van een gewogen monster melk e.d. het vet wordt ontsloten en vervolgens geëxtraheerd met organische oplosmiddelen, eventueel na een voorafgaande concentrering. Tenslotte wordt het extract drooggedampt en het residu gewogen. Deze procedure is lastiger uit te voeren, aanzienlijk langduriger en ook kostbaarder, maar geeft beter reproduceerbare uitkomsten.

Veelal wordt aangenomen dat de gevonden waarden ook juister zijn. Na bestuderen van de literatuur wordt evenwel niet geheel duidelijk waar deze mening op berust. Nadat bij de ontwikkeling van de basismethoden goed werk is verricht, werd er naderhand weinig onderzoek naar gedaan. Dit weinige bleef dan meestal nog beperkt tot vergelijking van uitkomsten verkregen met verschillende voorschriften, waarbij men soms aannam, dat de hoogste waarde de meest juiste was. Men vroeg zich dus niet af, welke stoffen nu werkelijk afgezonderd werden. Anderzijds bestond verschil van mening over wat onder vet

verstaan moet worden. Bovendien werd soms een methode, die voor een bepaald produkt ontworpen was, klakkeloos gebruikt voor een ander. Bepaalde voorschriften lijken dus op wankelijke basis te rusten, hoewel soms op laboratoria van controle-instellingen e.d. niet gepubliceerd onderzoek is gedaan.

Aanleiding tot het onderzoek waren vooral de voorbereidingen voor het opstellen van normen voor de methoden ter bepaling van het vetgehalte van zuivelprodukten. Door MULDER was er herhaaldelijk op gewezen, dat onze basiskennis betreffende de methoden eigenlijk onvoldoende is voor het opstellen van normen. RADEMA & MULDER (1948) begonnen toen een onderzoek over de bekende methoden. De genoemde onderzoekers wezen er op, dat de methode GERBER, die van ouds in ons land algemeen is toegepast en waarop eigenlijk de gehele prijsbepaling van de melk berustte, een empirisch karakter heeft, en dat deze methode dient te worden geijkt op een standaardmethode. Hiervoor kozen zij de methode RÖSE-GOTTLIEB, waarvoor zij, na het allernoodzakelijkste onderzoek daaromtrent, een voorschrift opstelden, dat aanleiding gaf tot de Nederlandse norm N 1308. Vervolgens ijkten de genoemde onderzoekers de methode GERBER op RÖSE-GOTTLIEB. Het bleek dat het toen geldende voorschrift (norm N 910) aanleiding gaf tot te hoge uitkomsten. RADEMA & MULDER (1951) adviseerden de hoeveelheid melk, die voor de analyse volgens GERBER wordt gebruikt, te verlagen van 11 tot 10,77 ml. Ondanks de grote consequenties hiervan, heeft de Nederlandse zuivelindustrie dit voorstel overgenomen. In het buitenland erkent men thans meer en meer de juistheid van deze wijziging, en gaat men dan ook veelal over tot het verkleinen van de inhoud van de voorgeschreven pipet.

Hiermee moge aangetoond zijn, van welk een groot belang het voor de zuivelindustrie is, om over betrouwbare analysemethoden te kunnen beschikken. Ook internationaal staat dit vraagstuk thans algemeen in de belangstelling. Gewezen kan worden op de normen van de „Internationale Zuivelbond" en van de „International Organization for Standardization" (I.S.O.). Ook de F.A.O. bemoeit zich hier intensief mee, vooral in verband met de z.g. „Code of Principles".

Intussen was het onderzoek van RADEMA & MULDER slechts een eerste begin. Het werd op dit laboratorium voortgezet, vooral met medewerking van studenten. Daar de onderzoekingen aanvankelijk een oriënterend karakter hadden, werd volstaan met slechts enkele voorlopige mededelingen over de resultaten (MULDER & MEYERS, 1953; MULDER & HOOGENDIJK, 1956; MULDER, HOOGENDIJK & WALSTRA, 1959). Het bleek echter steeds duidelijker, dat een uitvoerig onderzoek gewenst was.

Het doel van het onderhavige werk was dus: meer te weten komen over wat precies gebeurt bij enkele bepalingsmethoden. Onderzocht werden voornamelijk de methoden RÖSE-GOTTLIEB *(RG)* en SCHMID-BONDZYŃSKI-RATZLAFF *(SBR)*. Hoewel het dus niet de bedoeling was een nieuw voorschrift te ontwikkelen, maar de merites en beperkingen van bestaande werkwijzen te leren kennen, worden wel enige suggesties gedaan ter wijziging. Als materiaal voor de bepalingen werd voornamelijk melk gebruikt. Waar andere melkprodukten werden genomen, was veelal de voornaamste reden hiervoor de proefomstandigheden te variëren, om zo de methoden te leren kennen. In de tweede plaats kwam dan pas de toepassing op het produkt.

Alvorens tot toepassing van de verkregen uitkomsten – in de vorm van wijzigingen in de bestaande voorschriften – kan worden overgegaan, zal in het algemeen nog een meer op de praktijk gericht onderzoek gewenst zijn. De varia-

biliteit van het uitgangsprodukt melk en o.m. het grote aantal te onderzoeken factoren, hebben tengevolge dat kwantitatief nauwkeurig bepaalde uitkomsten niet kunnen worden verkregen, zonder zeer veel monsters te onderzoeken. Dit laatste was bij het onderhavige werk doorgaans niet mogelijk.

2. DE METHODE RÖSE-GOTTLIEB

2.1. ONTWIKKELING

De grondgedachte van de methode is afkomstig van RÖSE (1888). Hij behandelde melk met ammonia, waarschijnlijk bij verhoogde temperatuur (de mededeling is daaromtrent niet geheel duidelijk). Hij spoelde het mengsel dan met water en alcohol over in een gecalibreerde buis, voegde een mengsel van ether en petroleumether toe, schudde en liet ontmengen. Van de vetoplossing nam hij een aliquoot deel, dat hij verder behandelde: destilleren, drogen en wegen.

GOTTLIEB (1892) ontwikkelde het voorschrift verder. Aan 10 ml melk werden achtereenvolgens toegevoegd: 1 ml sterke ammonia, 10 ml alcohol, 25 ml ether en 25 ml petroleumether. Na elke toevoeging werd geschud. Extraheren met alleen petroleumether, of met een mengsel hiervan met ether, gaf te lage uitkomsten. Werd de petroleumether weggelaten, dan vond GOTTLIEB ook 0,05... ... 0,08 % niet vetachtige stof in het vet. Bij de gewone procedure was in het vet geen in water oplosbare stof, geen as en geen stikstof (kjeldahl) aan te tonen. Eén extractie bleek voldoende. (RÖSE vond na 1 maal uitschudden nog 0,015 % vet in de waterfase). Werd te hard geschud, dan werden niet vetachtige vlokjes in het vet waargenomen, vooral bij het onderzoek van karnemelk. Verdunde melk gaf met onverdunde overeenstemmende resultaten. De reproduceerbaarheid was beter dan 0,1 % vet.

POPP (1904) stelde evenwel vast dat drie maal uitschudden noodzakelijk is. Dan wordt ook het werken met een aliquoot deel vermeden, ten gunste van de nauwkeurigheid. Met een derde extractie vond hij nog 0,2 % van het vet. Een ontmengduur van een half uur bleek voldoende. Variatie in de sterkte van de ammonia van 5 tot 25 % had geen invloed op de uitkomst. Hij beval aan de vetoplossing te filtreren.

RICHMOND (1908) maakte terecht bezwaar tegen dit laatste, zodat toen reeds de methode ongeveer de huidige vorm kreeg. Hij maakte ook voorschriften voor het onderzoek van melkpoeder en enkele andere produkten.

J. J. MOJONNIER ontwikkelde een complete apparatuur voor de methode en voerde o.m. de naar hem genoemde extractiebuis in. Een en ander werd vastgelegd in octrooischriften, maar is later ook behandeld in het boek van T. MOJONNIER & TROY (1925). Laatstgenoemden stelden ook voorschriften op voor tal van melkprodukten. Vooral het scheidingsniveau tussen de vloeistoffen bleek van belang: is dit te hoog of te laag, dan krijgt men licht te lage uitkomsten. Te weinig alcohol, evenals te weinig water bij geconcentreerde produkten, geeft emulsies bij het schudden. Te veel alcohol veroorzaakt te hoge uitkomsten. De sterkte van de ammonia is van minder belang. De methode van MOJONNIER is bedoeld als een praktijkmethode. Veel uit de voorschriften is evenwel overgenomen voor de basismethode, maar niet: het twee maal uitschudden en twee maal toevoegen van alcohol.

Een onderzoek van RADEMA & MULDER (1948) is de basis geworden voor het huidige Nederlandse voorschrift. Zij stelden vast:

a. Het is noodzakelijk de melk af te wegen in het extractievat, i.v.m. de gewenste nauwkeurigheid.
b. Het beste extractievat is de *mojonnierbuis*.
c. Drie extracties zijn noodzakelijk. (Hoewel het verdelingsquotiënt voor de te extraheren stoffen zeer gunstig is, is het niet oneindig groot.)
d. Filtreren van de vetoplossing is overbodig, en geeft bovendien fouten door bevriezen van het filter en achterblijven van vet.
e. Het gewicht van het lege vetkolfje moet achteraf worden vastgesteld, na uitspoelen van het vet met petroleumether. Er blijft dan n.l. steeds enig niet vetachtig residu achter.
f. De duploverschillen kunnen kleiner dan 0,01 % zijn.
g. Uitschudden met een mengsel van ether en petroleumether geeft te lage uitkomsten.

2.2. PRAKTISCHE UITVOERING

2.2.1. *De hoeveelheden reagens*

RADEMA & MULDER (1948) gaven in hun voorschrift aan: 10 ml melk, 2 ml ammonia, 10 ml alcohol, 25 ml ether en 25 ml petroleumether; bij de 2e en 3e extractie 15 ml van beide vetoplosmiddelen. Door ons is voor elke maal uitschudden 20 ml ether en petroleumether genomen. Dit is wat handiger met het oog op automatisch afmeten en de kans op vergissingen.

De mojonnierbuis is zo gemaakt, dat na het afgieten ruim 22 ml vloeistof achterblijft. Het scheidingsniveau van beide fasen is evenwel niet constant. Deze niveaus zijn enkele malen bepaald. De resultaten zijn samengevat in tabel 1. (Hierin zijn tevens uitkomsten bij andere proefomstandigheden gegeven ter vergelijking. In 3.1. komen deze weer ter sprake.)

TABEL 1. Het scheidingsniveau in de mojonnierbuis onder verschillende omstandigheden.

ml water	12		10		10		8	
ml ammonia 25%	–		2		–		–	
ml zoutzuur	–		–		2		6	
ml ethanol 96%	10		10		10		8	
Na schudden met 20 ml:	ether	ether + 20 ml petr. ether	ether	ether + 20 ml petr. ether	ether	ether + 20 ml petr. ether	ether	ether + 20 ml petr. ether
Volume onderste laag:								
in ml bij 1e extr.	17	20,5	16	19	25	22	28,5	24
in ml bij 2e extr.	16,5	17	15	16	21	19,5	27	23
in ml bij 3e extr.	15	15,5	14	14,5	18	17	25	21,5

Opm. Na elke extractie is het mengsel zo scherp mogelijk afgeheveld, alvorens voor de volgende maal ether werd toegevoegd.

Diëthylether is goed oplosbaar in sterke zuren, maar slecht in basen of zoutoplossingen. In zuur milieu gedraagt ether zich als een base (HERMANS, 1952):

$$(C_2H_5)_2O + HCl \rightleftarrows \{(C_2H_5)_2OH\}^+ + Cl^-.$$

Gezien dit feit en gezien de geringe mengbaarheid van water met een etherpetroleumether-mengsel, kunnen uit tabel 1 de volgende conclusies worden getrokken:

1° Bij afwezigheid van zuren of basen lost een deel van de alcohol in ether op; door toevoegen van petroleumether wordt dit slechts ten dele te niet gedaan.
2° Bij aanwezigheid van ammonia verdwijnt meer alcohol uit de waterfase.
3° Bij aanwezigheid van zuur lost ook alcohol in de etherfase op, maar bovendien veel ether in de waterfase; dit laatste is sterker bij grotere zuurconcentratie.

Alcohol is ook enigszins oplosbaar in petroleumether. Als 10 ml water + 2 ml ammonia + 10 ml alcohol uitgeschud wordt met 40 ml petroleumether, verdwijnt ongeveer 0,5 ml alcohol uit de waterfase. Is in plaats van ammonia sterk zoutzuur aanwezig, dan blijft het scheidingsniveau evenwel constant. Bovenstaande gegevens betreffende de verdeling van alcohol over de beide fasen lijken het gemakkelijkst verklaarbaar, als men aanneemt dat de alcohol in de waterfase zich onder deze omstandigheden als een base gedraagt.

Nemen wij even aan, dat bij *RG* na 1 maal uitschudden met ether en petroleumether al het vet in de etherfase is overgegaan, en verder dat de vetoplossing steeds tot een niveau van 22,5 ml wordt afgeschonken. Nu kan uit de gegevens van tabel 1 berekend worden, welk deel van het vet bij elke extractie verzameld wordt. In feite zal men vaak tot een wat lager niveau kunnen afschenken, maar daar staat tegenover dat vet in de waterfase achterblijft. Daarom is ook enkele malen bepaald hoeveel vet per extractie gewonnen wordt. De berekende en bepaalde waarden staan in tabel 2. Tevens werden de scheidingsniveaus bepaald indien 11 ml water + 2 ml ammonia + 11 ml alcohol 3 maal werd uitgeschud, waarbij voor de derde maal afschenken het niveau met water omhoog werd gebracht tot 21,5 ml. De hieruit berekende waarden staan ook in tabel 2.

TABEL 2. Het gedeelte van het vet, dat met *RG* bij elke afzonderlijke extractie wordt verkregen, in procenten van het totaal.

	Methode met 10 ml melk en 10 ml alcohol. Waarden berekend naar die van tabel 1	Zelfde methode. Gemiddelde waarden van 3 bepalingen op melk	Methode met 11 resp. 11 ml, waarbij vóór de 3e maal afschenken het niveau omhoog is gebracht. Berekende waarden
1e extractie	91,8	92,1	96,8
2e „	7,1	7,0	2,9
3e „	0,9	0,7	0,29
rest	0,2	0,2	0,01

Geconcludeerd kan worden, dat de eerste methode (10–2–10) zonder meer niet geheel voldoet: het gevonden vetgehalte kan tot 0,01 % te laag zijn, door achterblijven van vet in het restvolume van de etherfase. Bij de tweede methode (11–2–11 met water toevoegen) is niet te verwachten dat een weegbare hoeveelheid achterblijft. Daarom is deze procedure door ons steeds gevolgd.

SEUSS c.s. (1955) bepaalden dat het verschil in gevonden vetgehalte bij 3 versus 2 extracties 0,05 ± 0,006 % was. Gezien zij de methode „10–2–10" gebruikten, is deze uitkomst goed in overeenstemming met bovenstaande gegevens.

2.2.2. *Het extraheren*

In sommige voorschriften wordt aangegeven na het toevoegen van ammonia en alcohol te schudden. Ons bleek evenwel dat alleen mengen steeds voldoende is, zoals ook verwacht kan worden, gezien de mengbaarheid van de vloeistoffen. Maar ook bleek dat lang of krachtig schudden met de vetoplosmiddelen beslist onnodig en zelfs ongewenst is. Bij daartoe verrichte proeven werd geen verschil in vetgehalte gevonden indien 20 dan wel 60 seconden werd geschud. Enkele malen omkeren van de mojonnierbuis is zelfs voldoende. Bij krachtig schudden ontstaat bovendien gemakkelijk een emulsie, die lastig te „breken" is.

Indien niet te lang of te krachtig wordt geschud, is een ontmengduur van 5 minuten voldoende. Wij vonden geen verschil in vetgehalte als 30 inplaats van 5 minuten werd gewacht. Het verdient wel aanbeveling de mojonnierbuizen na het ontmengen te centrifugeren, om druppels waterfase van de glaswand te verwijderen.

Het is het beste, het gedroogde en gewogen vet achteraf met petroleumether uit de kolfjes te spoelen (RADEMA & MULDER, 1948). Men kan dan zien of eventueel wat van de waterfase mee is afgeschonken. (In zo'n geval moet de bepaling als mislukt worden beschouwd). Bovendien blijft steeds enig niet vetachtig residu in het kolfje achter, zij het zeer weinig: 0,1 of 0,2 mg. Indien bij het extraheren te hard of te lang werd geschud, is dit evenwel meer, b.v. 1 mg, zelfs indien een wat langere ontmengduur werd aangehouden.

KONING & MOOY (1916a) wezen er op, dat bij melk van oudmelkse koeien het eiwit onvolledig oplost bij de bepaling. Zij namen stellig aan dat de uitkomsten dan onbetrouwbaar zijn. Dit verschijnsel is tijdens ons onderzoek één maal voorgekomen. Mogelijk was het gevonden vetgehalte toen iets te laag.

2.2.3. *Het verwijderen van de oplosmiddelen*

Het destilleren dient allicht voorzichtig te gebeuren, daar anders verliezen aan vet kunnen optreden. Hoewel het mengsel alcohol bevat, gaat deze vrijwel geheel mee over. Indien onvolledig wordt afgedampt is een explosie in de droogstoof tijdens het drogen niet denkbeeldig.

Toch dient men het afdampen niet te lang voort te zetten, tenminste wanneer kookplaten of electrische verwarmingsmantels e.d. worden gebruikt. Zodra nog vrijwel alleen vet over is, kan de temperatuur hiervan snel stijgen, b.v. tot 160 °C in 6 minuten. In zo'n geval worden onbetrouwbare gehalten gevonden. Bij een daartoe gedaan proefje, waarbij slechts 2 minuten te lang werd verhit, bleek het gevonden vetgehalte van melk 0,013 % lager te zijn. Een verlies van 0,008 % trad op door verdamping van bestanddelen; 0,005 % bleef achter in het kolfje, niet oplosbaar in petroleumether. In deze rest werd kwalitatief gereageerd op glycerol en op oxyvetzuren (reactie op acroleïne na verhitten met bisulfaat, resp. reactie met *sym*-diphenylcarbazide; FEIGL, 1956). Beide reacties waren positief. Het zuurgetal van het vet was 10,6 meq./100 g, dat van het niet oververhitte slechts 2,5. Er treedt dus splitsing en oxydatie op. Er zal gewichtsverlies zijn door verdampen van vetzuren en door achterblijven van glycerol, oxyvetzuren en mogelijk andere reactieprodukten. Hierbij verandert het vet van kleur. Zodra het een abnormaal donkere tint heeft, dient men de bepaling als mislukt te beschouwen.

Ook aan het drogen dient aandacht te worden besteed. Fig. 1. geeft het temperatuurverloop weer in de gebruikte droogstoof. Andere stoven bleken minder

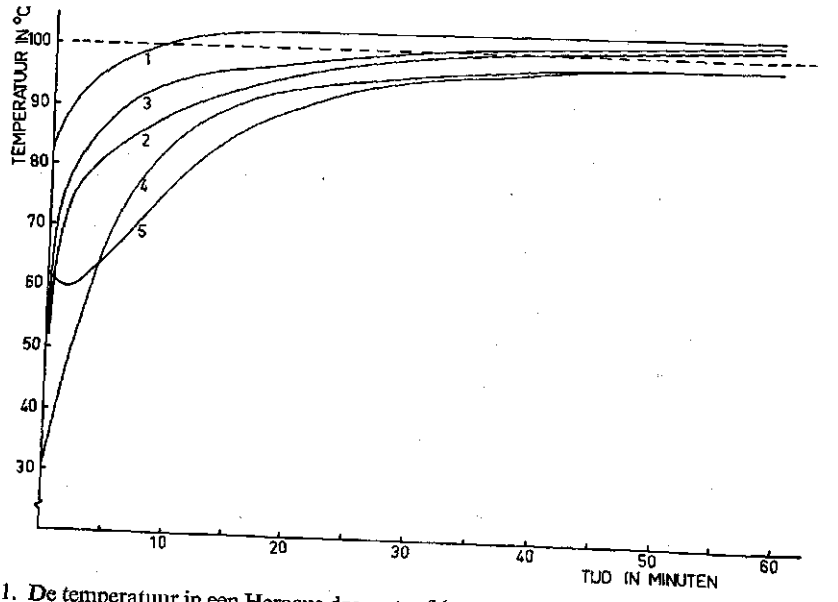


FIG. 1. De temperatuur in een Heraeus droogstoof (type RB 500), gemeten met thermokoppels.
1: Aanwijzing van de thermometer van de stoof.
2: Temperatuur ongeveer midden in de stoof.
3: Temperatuur hoger in de stoof.
4: Temperatuur in een liggend kolfje van 250 ml, juist naast 3.
5: Temperatuur van 0,4 g vet in dit kolfje.

goed te zijn en gaven een uur na het openen nog grote temperatuurverschillen te zien, b.v. wel 10 °C. Indien er echter een goede temperatuurverdeling in de droogstoof is, dan is 1 uur drogen van het vet steeds voldoende, mits ook de volgende voorwaarden vervuld zijn:

1° De oplosmiddelen moeten vooraf vrijwel volledig zijn afgedampt.
2° Er dient niet meer dan ongeveer $^3/_4$ g vet in een kolfje te zijn. Afneming van gewicht bij voortgezet drogen werd geconstateerd, indien meer dan 1 g vet aanwezig was.
3° De ventilatieopeningen van de droogstoof moeten open zijn.
4° De stoof moet vooraf op temperatuur zijn (102...105 °C) en mag na het vlug inzetten van de kolfjes niet meer tussentijds geopend worden.
5° De kolfjes dienen horizontaal gelegd te worden. Het is dan beslist onnodig ze uit te blazen, zoals o.m. in de Duitse voorschriften nog steeds wordt aangegeven. Het uitblazen is zelfs ongewenst, omdat het inblazen van stof niet denkbeeldig is, en omdat de stoof er voor geopend moet worden.
6° Er mag niets van de waterfase in het kolfje zijn gekomen. Indien slechts een klein druppeltje water aanwezig is, is dat meestal slechts na vele uren drogen geheel te verdampen. GOTTLIEB (1892) heeft hier al op gewezen.

Verscheidene malen werd gecontroleerd of een uur drogen voldoende is; nooit werd afnemen van gewicht gevonden bij langer drogen. Tevens werd nagegaan of vervluchtigen van bestanddelen optreedt, indien slechts een kleine hoeveelheid vet aanwezig is, zoals bij het onderzoek van centrifugemelk. Het toevoegen van een gewogen hoeveelheid gedroogd botervet, bleek evenwel niet tot hogere uitkomsten te leiden.

Het is denkbaar dat toenemen van het gewicht optreedt door oxydatie van het vet. TERRIER (1949) deelde mede dat een toeneming tot 1 % van het gewicht van het vet kan optreden, als de gebruikte ether peroxyden bevat. (Overigens kan dit ook veroorzaakt zijn door achterblijven van de etherperoxyden zelf). Indien de ether na destilleren in het donker wordt bewaard, zijn geen moeilijkheden te verwachten. Enkele malen werd het peroxydegetal van het vet bepaald (methode van SABALITSCHKA, 1941). Het variëerde van 0,02 tot 0,05 mg O/g vet. Hoewel meer zuurstof opgenomen kan zijn, dan die aantoonbaar als peroxyde, is het toch onwaarschijnlijk dat een weegbare toeneming optreedt.

2.2.4. *Het wegen*

Het lastigste deel van de bepaling is waarschijnlijk het nauwkeurig bepalen van het gewicht van het vet. Men verkeert n.l. in de ongunstige omstandigheid een kleine hoeveelheid stof (ong. 400 mg) te moeten wegen in een relatief grote kolf (gewicht ong. 100 g). Kleine verschillen in temperatuur en luchtvochtigheid hebben een grote invloed op het resultaat. Men dient daarom steeds als tegenwicht een kolfje te nemen van de zelfde vorm en grootte, dat dezelfde verwarmings- en afkoelingsweg heeft doorlopen. Na het drogen dient men tenminste een uur te laten afkoelen. Acclimatiseren van de kolfjes in de balanskast zou ideaal zijn. Daar dit doorgaans niet mogelijk is, dient het dan zo dicht mogelijk bij de balans te gebeuren. De balanskast dient vóór het wegen ook geruime tijd open te staan; hierbij verdient het aanbeveling dat er enige luchtcirculatie in het vertrek is. Zelfs dan kunnen nog merkbare afwijkingen voorkomen bij het wegen van meerdere kolfjes direct na elkaar, n.l. indien de temperatuur in het weegvertrek meer dan enkele tiende °C per uur variëert, of wanneer de analyst te lang achter de balans zit (langer dan b.v. een kwartier), waardoor de laatste in temperatuur stijgt t.g.v. de lichaamswarmte van de eerste.

Uit het bovenstaande zal duidelijk zijn, dat het laten afkoelen van de kolfjes in een glazen exsiccator geheel verkeerd is.

Bij lage luchtvochtigheid kan men de glazen kolfjes licht electrostatisch opladen door wrijving. Hierdoor kunnen wel weegfouten ontstaan van een paar mg, soms zelfs tot 100 mg toe. Het is mogelijk dat de aluminium mojonnierschaaltjes, voor wat betreft moeilijkheden met het wegen, voordeel bieden boven glazen kolfjes.

2.2.5. *De blanco waarden*

De gebruikte ether, petroleumether en alcohol dienen voor gebruik gedestilleerd te worden. Laat men dit na, dan blijkt het vaak onmogelijk het vet tot constant gewicht te drogen. Er kunnen stoffen in aanwezig zijn, die enigszins door het vet worden vastgehouden. Vandaar dat het bovengenoemde destilleren dient te geschieden over vet of paraffine. Tevens dient men steeds een flinke hoeveelheid vloeistof in de destilleerkolf te laten.

Bij het uitvoeren van blanco bepalingen dient dus ook steeds een gewogen hoeveelheid zuiver vet in het kolfje aanwezig te zijn. Indien de oplosmiddelen op de juiste wijze zijn gezuiverd, is de blanco waarde steeds te verwaarlozen. Deze werd geregeld bepaald: de gevonden gewichtsvermeerdering van het vet variëerde van $-0{,}1$ tot $+0{,}2$ mg.

2.2.6. *Voorschrift*

Tenzij anders is vermeld, is in het navolgende steeds gebruik gemaakt van het voorschrift vastgelegd in de norm NEN 1308 (1960), met de volgende afwijkingen of preciseringen:

1° In plaats van 10 werden 11 ml melk en alcohol gebruikt.
2° Er werd uitgeschud met 20 ml ether en 20 ml petroleumether.
3° Bij het extraheren werd gedurende 20...30 seconden niet te krachtig geschud.
4° Na 5...10 minuten ontmengen werd gedurende enkele minuten gecentrifugeerd bij ong. 500 t.p.m.

2.3. VET EN VETACHTIGE STOFFEN

2.3.1. *Botervet*

Wanneer gesproken wordt over het vetgehalte van melk e.d., verstaat men thans in het algemeen onder „vet": vet + vetachtige stoffen. Dit zijn dan voornamelijk: botervet (tri-vetzure esters van glycerol), vrije vetzuren, fosfatiden en sterolen (al of niet veresterd). Carotenen, xanthofyl e.d. zijn kwantitatief te verwaarlozen. Ook het gehalte aan sterolen van melk is zeer laag: 0,010... ...0,015% (MULDER & ZUIDHOF, 1958). Volgens MULDER (1942) worden sterolen bij *RG* mee geëxtraheerd, wat bevestigd kon worden. Een eventueel in geringe mate achterblijven er van zou bovendien geen duidelijke invloed op het gevonden vetgehalte hebben.

Botervet in water wordt veelal gebruikt als „blanco" ter controle van de oplosmiddelen. Het is dus waarschijnlijk dat het geheel wordt geëxtraheerd, wat bevestigd kon worden. Ook wanneer het werd toegevoegd aan ondermelk bleek dit het geval te zijn. Men dient echter het vet vooraf te drogen, daar het doorgaans ong. 0,2% water bevat. Een zestal malen werd ong. 400 mg uitgesmolten, gedroogd botervet aan 11 ml ondermelk toegevoegd en het geheel onderzocht volgens *RG*. Het verlies bedroeg 0,2....1,2 mg. Het botervet had een zuurgetal van ong. 1 meq./100 g vet. In verband hiermee was een verlies van 0,6....0,7 mg te verwachten (zie 2.3.2.). Er kan dus worden geconcludeerd, dat onder deze omstandigheden geen verlies van vet optreedt. Het is niet geheel zeker dat dit voor melk opgaat, gezien de andere wijze van voorkomen van het vet. Na 3 maal extraheren kon evenwel in de waterfase vrijwel geen vet meer worden aangetoond (zie 2.5.4.).

2.3.2. *Vrije vetzuren*

Over de extractie van vrije vetzuren bij de methode van MOJONNIER is al vrij veel bekend. BIRD & BREAZEALE (1931) constateerden dat het zo gevonden vetgehalte van ranzige boter te laag is, en wel in een mate, ongeveer evenredig aan het zuurgetal van het vet. HOLLAND (1938) nam waar dat het vetgehalte van rauwe melk, bepaald met de methode van MOJONNIER, bij bewaring afnam, b.v. 0,3% in 14 dagen. Gepasteuriseerde melk vertoonde dit verschijnsel niet. GOULD (1941) onderzocht dit verder. Hij liet in melk vetsplitsing optreden door deze rauw te homogeniseren, en bepaalde dan op verschillende tijdstippen het vetgehalte en het zuurgetal van het vet. Dit laatste werd bepaald in door karnen verkregen vet. Als men aanneemt dat in dit vet ongeveer 65 mol-% van de totale hoeveelheid vetzuur terecht komt (TARASSUK & FRANKEL, 1954) en men het

gemiddeld equivalentgewicht van de zuren op 240 stelt, kan men uit de gegevens van GOULD berekenen, dat 60....90% van de gevormde vrije vetzuren bij de bepaling verloren ging.

STARR & HERRINGTON (1941) extraheerden mengsels van vetzuren in aanwezigheid van vet en bepaalden zo hoeveel ervan teruggevonden werd bij de methode van MOJONNIER. Dit bleek 20....30% te zijn. Tevens werden enkele zuren afzonderlijk onderzocht. De teruggevonden hoeveelheid variëerde van nihil voor boterzuur, tot 27,5% voor oliezuur. Bij extractie van vetzuren in water met organische oplosmiddelen, stijgt de opbrengst met het molecuulgewicht. Volgens ARCHIBALD (1932) neemt de logaritme van het verdelingsquotiënt evenredig toe met het aantal C-atomen van het vetzuur (verzadigd, onvertakt).

STARR & HERRINGTON (1941) gingen tevens na in hoeverre verdampen van vetzuren tijdens het drogen bijdraagt tot het verlies. Bij deze proeven werd weer vet toegevoegd. Vooral de lagere vetzuren bleken voor een groot deel te verdampen, boterzuur zelfs geheel. Door ons werd dit eveneens nagegaan; de uitkomsten zijn samengevat in tabel 9. STARR & HERRINGTON vonden wat grotere verliezen, maar afdampen en drogen geschieden bij de methode van MOJONNIER wat anders, dan bij *RG* gebruikelijk is. Bovendien gebruikten zij vrij grote hoeveelheden van de vetzuren, n.l. 40....400 mg per bepaling. (Bij onze proeven werd met 1....2 mg vetzuur of met 10....15 mg mengsel van vetzuren gewerkt). Zo vonden zij ook een grote invloed van wel resp. niet aanwezig zijn van ong. 500 mg vet, b.v. bij palmitinezuur een verlies van 8 resp. 42%.

Er werden nog enkele experimenten gedaan met een botervethydrolysaat. Met *RG* bleek 32....35% van de toegevoegde vetzuren te worden bepaald, dus wat meer dan STARR & HERRINGTON vonden. Het verschil is waarschijnlijk veroorzaakt door het 2 versus 3 maal extraheren en door de verschillende omstandigheden bij het drogen. Uitkomsten van SCHWARZ & WOERNER (1960) zijn goed in overeenstemming met de onze. Zij vonden van toegevoegd palmitine- en oliezuur globaal 40% terug met *RG*.

Bij enkele droogproeven bleek nog, dat van ongeveer 15 mg aan vet toegevoegd mengsel van vetzuren 0,5 mg minder verdampte, dan wanneer geen vet werd toegevoegd.

Concluderend kan dus worden gezegd, dat ongeveer $^2/_3$ van het gewicht aan vrije vetzuren verloren gaat. Dit houdt in dat bij verse melk, waarvan het zuurgetal van het vet 1....2 meq./100 g vet is, het gevonden vetgehalte 0,005.... ..0,012% „te laag" is. Bij volvette kaas met een zuurgetal in het vet van 10, kan dit b.v. 0,5% „te laag" zijn, of ongeveer 0,8% in de droge stof.

STARR & HERRINGTON (1941) veronderstelden dat de extractie van vetzuren onvolledig is door de geringe dissociatie van de NH_4-zouten bij hoge p_H. (De p_H van de waterfase bij *RG* is ong. 10,5; de meting in sterk alcoholisch milieu is echter niet erg betrouwbaar). Het is echter zeer waarschijnlijk, dat de vetzure zouten bij hoge p_H juist goed gedissociëerd zijn.

Bij vloeistof–vloeistof-extractie is de delingscoëfficiënt K_D, d.w.z. de verdeling van een stof in één bepaalde vorm over de organische fase *(o)* en de waterfase *(w)*, in het algemeen zeer weinig afhankelijk van milieu-omstandigheden (MORRISON & FREISER, 1957). Maar men is doorgaans meer geïnteresseerd in het totale verdelingsquotiënt Q, waarin alle wijzen van voorkomen van de stof zijn betrokken. Nemen wij als voorbeeld een organisch zuur HAc, dat in water ten dele dissociëert:

$$HAc \rightleftarrows H^+ + Ac^-.$$

De ionisatieconstante is:

$$K_i = \frac{[H^+] \,.\, [Ac^-]}{[HAc]}.$$

Als we nu associatie en dissociatie in het organisch oplosmiddel verwaarlozen dan is:

$$Q = \frac{[HAc]_O}{[HAc]_W + [Ac^-]_W} = \frac{K_D}{1 + K_i/[H^+]}, \text{ gezien:}$$

$$K_D = [HAc]_O/[HAc]_W.$$

Boterzuur b.v. heeft $K_i = 1{,}5 \times 10^{-5}$, (waarschijnlijk is K_i voor andere vetzuren ongeveer gelijk: MARKLEY, 1947). Nu is b.v. bij $p_H = 10$, $Q = 0{,}67K_D \times \times 10^{-5}$ en bij $p_H = 4$, $Q = 0{,}87K_D$. Bij zeer lage p_H (b.v. bij de methode *SBR*, $p_H < 2$) is Q ongeveer van de orde van grootte 10. Het is dus duidelijk dat bij *RG* vrijwel geen vetzuren als ongedissociëerd zuur worden geëxtraheerd.

Associatie van vetzuren onderling is onwaarschijnlijk, gezien de zeer geringe concentratie. Bovendien schijnt associatie bij vetzuren weinig op te treden onder deze omstandigheden, daar het verdelingsquotiënt bij vloeistof–vloeistof-extractie zeer weinig afhankelijk is van de concentratie (ARCHIBALD, 1932).

De vetzuren zullen dus voornamelijk geëxtraheerd worden als ammoniumzepen of als ionen. Maar de dissociatie in het organisch oplosmiddel is waarschijnlijk zeer klein. (Bovendien zullen bij het extraheren van anionen tevens kationen moeten overgaan). In de literatuur werden geen gegevens gevonden over de oplosbaarheden van ammoniumzepen, wel van vele andere zepen (zie o.m. JACOBSON & HOLMES, 1916). In het algemeen zijn zepen van alkalimetalen goed oplosbaar in water, slecht in organische vloeistoffen. In dit verband is het interessant, dat STARR & HERRINGTON (1941) vonden, dat in het geheel geen vetzuren worden geëxtraheerd, als LiOH i.pl.v. ammonia als base wordt gebruikt bij de methode van MOJONNIER. Verder werd door ons gevonden, dat toevoegen van 100 mg NaCl aan de waterfase, behalve de gebruikelijke 2 ml 25% ammonia, niet ten gevolge heeft dat een geringere hoeveelheid vetzuren wordt uitgeschud.

Dit alles onderstreept het feit, dat de zuren als NH_4-zepen worden geëxtraheerd, niet als ionen, en niet geassocieerd. (Tijdens het drogen in de stoof verdampt weer NH_3, zodat dit daarna niet meer in het vet kan worden aangetoond).

2.3.3. *Fosfatiden*

Het is algemeen gebruikelijk het fosfatidengehalte van melk e.d. te bepalen, door het fosforgehalte in het volgens *RG* verkregen vet te bepalen. Hierbij neemt men dus aan, dat alle fosfatiden geëxtraheerd worden, en in 't geheel geen andere P bevattende stoffen. (Zie b.v. HORRALL, 1935). Dat het vet geen meetbare hoeveelheid anorganisch gebonden P bevat, kon bevestigd worden.

De P-bepalingen werden verricht volgens het voorschrift van MULDER c.s. (1957). Het laatste deel van deze methode (kleurontwikkeling met molybdaat) is gebaseerd op die van SCHEEL (1936). Hierbij is de concentratie aan zwavelzuur in de oplossing van groot belang. Om een grotere hoeveelheid van het destruaat te kunnen nemen, werd nagegaan of een extra hoeveelheid zwavelzuur onscha-

delijk gemaakt kon worden door neutralisatie met natronloog. Inderdaad bleek dat zo volkomen juiste uitkomsten verkregen worden, met het voordeel van een veel grotere nauwkeurigheid bij lage P-gehalten in het vet. Als fosfatidengehalte werd genomen P-gehalte $\times$ 26.

RG-bepalingen op fosfatiden geven soms moeilijkheden, doordat het „vet" een enkele maal niet geheel in petroleumether oplost. Deze „vlokjes" komen soms ook voor bij het onderzoek van karnemelk. De nauwkeurigheid lijdt eronder. De oorzaak van dit verschijnsel is vrij duister, aangezien soms van twee duplo's die op precies dezelfde wijze zijn uitgevoerd, de één wel, de ander geen moeilijkheden geeft.

VAN DUIN (1957) vond, dat wanneer *RG* werd uitgevoerd op waterige suspensies van fosfatiden, de extractie zeer onvolledig was. Slechts ongeveer de helft van het aanwezige P kwam in het extract. De opbrengst kon sterk verbeterd worden door toevoegen van zouten aan de suspensies, of door i.pl.v. ammonia een buffer van onverschillig welke p_H te gebruiken. Waarschijnlijk speelt hier dus de concentratie aan electrolyten een rol. De bovenstaande ervaringen konden worden bevestigd, zodat bij proeven met fosfatidenpreparaten steeds keukenzout werd toegevoegd. 0,5% NaCl in de suspensie bleek nog onvoldoende; steeds werd 1....2% zout gebruikt.

De eerste proeven werden met eifosfatiden gedaan. Het gebruikte preparaat bevatte overwegend lecithine en verder waarschijnlijk nogal wat sfyngomyeline. Het was vrijwel vrij van vet en niet verder te zuiveren door neerslaan met aceton. De molaire N/P-verhouding was 1,13. Een bepaling volgens *RG* op een suspensie in zoutoplossing bleek b.v. een „vetgehalte" van 87% te geven. Van het aanwezige P werd evenwel slechts 71% geëxtraheerd. Het leek dus niet onwaarschijnlijk, dat de fosfatiden aangetast worden. Daarom werd nagegaan of de gevonden gehalten verminderen, als de tijdsduur gedurende welke ammonia kan inwerken, langer wordt genomen. Gevonden werd b.v. bij snel uitvoeren van de bepaling: 97% „vet", na 18 uur inwerken: 85%. De gehalten voor geëxtraheerd P waren 80 resp. 52%. Bij een ander experiment nam het gevonden vetgehalte in 22 uur af van 90 tot 73%, het geëxtraheerde P van 71 tot 37%. Het is dus duidelijk dat afbraak van fosfatiden optreedt.

Aangezien dit misschien gevolgen kan hebben voor het gevonden vetgehalte van fosfatidenrijke produkten, werd enig onderzoek gedaan met karnemelk (van zoete room). Hierbij werd dus het vetgehalte bepaald, enerzijds zo snel mogelijk werkend, anderzijds na lange tijd inwerken van de ammonia. Soms werd een duidelijke afneming gevonden, n.l. éénmaal 0,058% na 18 uur en éénmaal 0,021% na 20 uur, soms was er nauwelijks een significant verschil. Éénmaal werd het fosfatidengehalte bepaald, dat in 7 uur met 0,030% afnam. Het fosfatidengehalte is evenwel P-gehalte $\times$ 26. Gezien de proeven met eifosfatiden zou dit op een veel geringere afneming in vetgehalte neerkomen, b.v. 0,01%. Hoewel dus geen duidelijke uitspraak kan worden gedaan, lijkt het toch bij bepalingen volgens *RG* aan te raden, niet te lang te wachten met extraheren na het toevoegen van de ammonia.

Bij de bovenvermelde proeven bleek tevens, dat het geen verschil maakt of alleen ammonia, dan wel tevens alcohol inwerkt, voor wat betreft de gevonden afneming. Volgens DESNUELLE (1952) is nog weinig bekend over de hydrolyse van fosfatiden in basisch milieu. Het meest waarschijnlijk acht hij het afsplitsen van vetzuren. Inderdaad konden in het *RG*-extract van eifosfatiden na aanzuren vrije vetzuren worden aangetoond (reactie met rodamine-B en uranylacetaat;

FEIGL 1956). Dit alleen kan evenwel de uitkomsten niet geheel verklaren, gezien de grote discrepantie in afneming van gewichtshoeveelheid en van P, en gezien de geringe extraheerbaarheid van vetzuren bij *RG*.

CHAPMAN (1928) voegde 0,1....0,25% „eilecithine" aan karnemelk toe en vond hiervan in het vet, verkregen met de methode van MOJONNIER, 52....93, gemiddeld 76% terug. FALKENHAHN (1957) voegde eifosfatiden aan karnemelkpoeder toe en vond na *RG*-extractie gemiddeld 80% terug. Deze uitkomsten zijn dus wat lager dan de onze.

Proeven met eifosfatiden hebben evenwel weinig waarde voor het kwantitatieve aspect, daar het mengsel waar ze uit bestaan een geheel andere samenstelling heeft dan bij melkfosfatiden, en ze bovendien veel meer en sterker onverzadigde vetzuren bezitten (zie b.v. RHODES & LEA, 1958; KOOPS, 1958). Daarom werden enkele proeven gedaan met fosfatiden uit boterserum, geïsoleerd volgens de methode van KOOPS (1957). Het bezwaar is, dat zo'n preparaat nog enig vet bevat (ong. 10%) en dat dus geheel uitgegaan moet worden van het P-gehalte en de omrekenfactor. Het is wel mogelijk een geheel vetvrij preparaat te maken (KOOPS, 1958), maar dit bevat onvermijdelijk wat silicagel, zodat een zelfde bezwaar blijft gelden. Ook is het niet zeker dat de samenstelling van het preparaat geheel overeenkomt met de werkelijk in melk voorkomende fosfatiden, al springt het voordeel t.o.v. eifosfatiden in het oog.

4 verschillende preparaten[1]) werden onderzocht: De geëxtraheerde gewichtshoeveelheid bedroeg 97....100%, van het aanwezige P werd 95....99% teruggevonden. Dit geldt echter voor vers bereide fosfatiden. Van een twee weken oud preparaat werd 95% teruggevonden na extractie, van een 2 maanden oud slechts 91% en 88% van het P. Waarschijnlijk moet dit aan oxydatie van de fosfatiden worden toegeschreven. Het is bekend, dat geoxydeerde fosfatiden beter in b.v. aceton en slechter in b.v. petroleumether oplossen.

Drie maal werd een bekende hoeveelheid fosfatiden aan ondermelk toegevoegd. Teruggevonden werd 85, 77 en 86%, in het laatste geval 80% van het P. Hoewel dus uit een suspensie in b.v. 1,5% NaCl de melkfosfatiden vrijwel volledig worden geëxtraheerd, is dit niet het geval na toevoegen aan ondermelk. Dit is ook in overeenstemming met de volgende proeven, waarbij het P-gehalte in het vet van enkele melkprodukten werd onderzocht. Hierbij werd nagegaan de toeneming in P in het vet door toevoegen van 1....1,5% NaCl aan het monster. Bij room bleek dit 20 en 16% te zijn, bij karnemelk 16, 14 en 15%, bij melk 15 en 11%. De meest aannemelijke conclusie is dus, dat met *RG* de fosfatiden voor ong. 85...90% worden bepaald, tenzij wat zout aan het monster wordt toegevoegd, in welk geval vrijwel volledige extractie plaatsvindt.

2.4. DE WERKING VAN DE EXTRACTIEMIDDELEN

2.4.1. *Discussie*

Uit het in 2.2.1. behandelde is op te maken, dat het verdelingsevenwicht bij de extractie waarschijnlijk wordt bereikt. Bij enkele proeven bleek, dat na éénmaal uitschudden nog 0,007....0,010% vet in de waterfase aanwezig was, in ieder geval dus heel weinig. Uit 2.2.2. blijkt tevens, dat het evenwicht zeer snel bereikt wordt, daar kort en niet te krachtig schudden reeds voldoende is om het vet te winnen.

[1] Een van deze preparaten werd bereidwillig beschikbaar gesteld door Ir. J. KOOPS van het „Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek" te Ede.

In het algemeen komt men bij vloeistof–vloeistof-extractie snel tot de evenwichtstoestand, tenzij complicaties – zoals sterke emulsievorming – optreden (zie b.v. CRAIG & CRAIG, 1950). Nu zijn bij *RG* complicaties te verwachten. Na mengen van de melk met ammonia en alcohol, is het vet nog dispers aanwezig. Er treedt geen duidelijke coalescentie op, ook niet na b.v. een uur staan. De vetbolletjes hebben dus nog steeds een zekere stabiliteit, waarschijnlijk t.g.v. een grensvlaklaagje. Zodra echter een of twee slagen met ether wordt geschud, is de waterfase helder geworden, en is dus geen grof dispers vet meer aanwezig: het is in de ether opgelost. De grensvlaklaagjes blijken dus geen belemmering te zijn voor het snel doen oplossen van het vet in de ether.

Petroleumether is dus niet nodig als extractiemiddel. Maar de verkregen vetoplossing is nogal polair (ether en alcohol), zodat er ook nog vele niet vetachtige bestanddelen in oplossen (GOTTLIEB, 1892). Door het toevoegen van

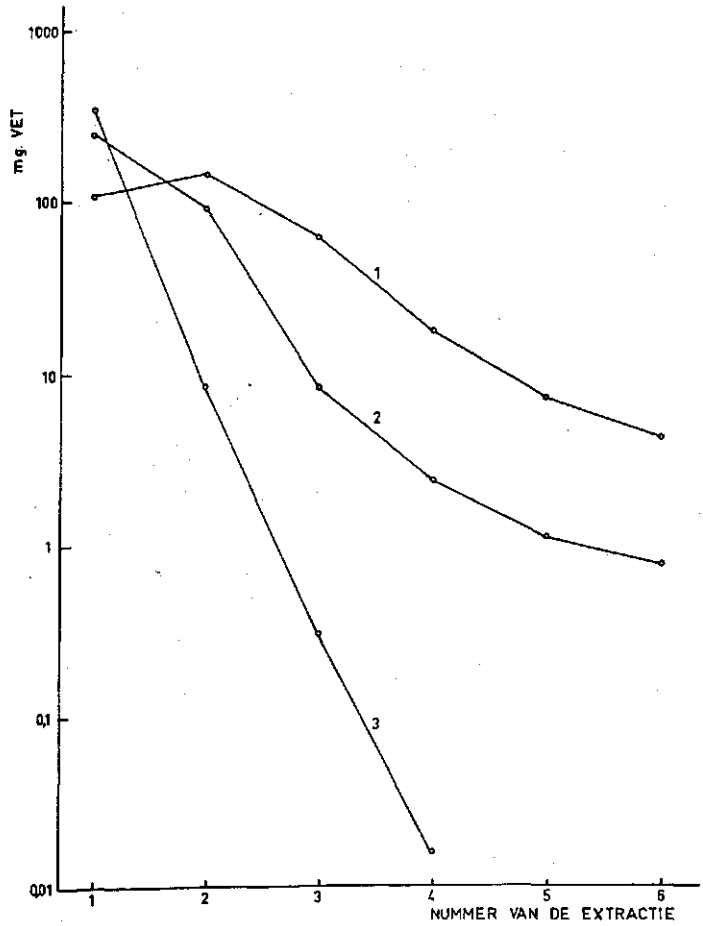


FIG. 2. *RG* zonder ether, toegepast op melk; de hoeveelheid vet per afzonderlijke extractie.
1: Schudden als bij *RG* gebruikelijk.
2: Wat langer schudden; bovendien is bij de 1e extractie twee maal geschud, met een tussenpoos van 5 minuten.
3: Ongeveer te verwachten, als verdelingsevenwicht bereikt zou worden.

petroleumether wordt dit laatste overwegend te niet gedaan. Ook bij deze „omgekeerde" extractie treedt snel evenwicht in.

Enkele malen werd nagegaan, hoeveel vet per extractie wordt uitgeschud als de ether wordt weggelaten, en dus alleen petroleumether als oplosmiddel wordt gebruikt (dubbele hoeveelheid, ter vervanging van de ether). Een voorbeeld van de uitkomsten is gegeven in figuur 2. Opvallend is hierbij het maximum in lijn 1. Dit effect is reproduceerbaar, mits men niet te lang schudt. Lijn 2 werd gevonden, indien bij de eerste extractie met een tussenpoos twee maal werd geschud, wat langer dan gewoonlijk. Ook nu vertoont de lijn nog een knik. Het is duidelijk dat het hier meer processen betreft dan een simpele vloeistof–vloeistof-extractie, en dat o.m. tijd nodig is.

Zoals gezegd, moet het oplosmiddel het vet door een grensvlaklaagje heen raken. Nu is dit vergemakkelijkt, doordat de aard van de oorspronkelijke oppervlaktelaagjes is veranderd door toevoegen van ammonia en alcohol, met als gevolg: oplossen van eiwit, verminderen van de grensvlakactiviteit van eiwit e.d. en eventuele splitsing van lipoproteïnecomplexen. Dit laatste is een bekend probleem bij de extractie van lipiden uit bloed, weefsels etc. (GURD, 1960). Tevens worden o.m. de fosfatiden ten dele gedehydrateerd, wat volgens sommigen voor een goede extractie ervan noodzakelijk is (HOLWERDA, 1936). In elk geval kunnen fosfatiden uit een „oplossing" in water niet zonder meer geëxtraheerd worden met een vetoplosmiddel, tenzij een alcohol wordt toegevoegd.

Volgens GURD (1960) speelt bij de extractie van vetachtige stoffen uit bloed een gezamenlijk en gecombineerd reactief inwerken van ether èn alcohol een rol. Tevens is de tijdsduur hierbij van belang. Het voornaamste punt is waarschijnlijk het splitsen van lipoproteïnecomplexen. Deze beweringen lijken wel enigszins toepasbaar op de *RG*-extractie, als men hierbij het oog heeft op het voorafgaand en gedeeltelijk oplossen van de oppervlaktelaagjes. Evenwel blijkt niets van een duidelijke invloed van de tijdsduur. Bovendien zou petroleumether dan in geringere mate dezelfde werking als ether kunnen hebben. Uit het volgende zal echter blijken, dat deze redeneringen geen steek houden.

SANDELIN (1941) stelde, dat men door *RG* zonder ether op ondermelk toe te passen, daarmee het gehalte aan vet exclusief fosfatiden zou vinden. In elk geval vindt men zo een lager vetgehalte, zoals hiervoor werd aangetoond. Bij ondermelk werd door ons b.v. met *RG* een vetgehalte van 0,044% gevonden, met de methode van SANDELIN 0,015%. Dit verschil is te groot om het geheel aan fosfatiden toe te kunnen schrijven. SANDELIN geeft ook onvoldoende bewijs voor zijn conclusie, dat het verschil hierin z'n oorzaak vindt. Daarom werd enkele malen nagegaan wat het fosfatidengehalte in *RG*-vet, resp. „SANDELIN-vet" was. De proeven werden uitgevoerd op melk. De volgende resultaten, uitgedrukt als procenten fosfatiden in de melk, werden verkregen:

RG	0,025	0,026	0,031%
„SANDELIN"	0,026	0,026	0,033%

Het is dus zeker niet zo, dat minder fosfatiden werden uitgeschud. (Bevestigd werd dat geen anorganisch gebonden fosfor werd geëxtraheerd). Verder zijn deze resultaten moeilijk in overeenstemming te brengen met de redenering, waarbij de ervaringen met de extractie van lipiden uit bloed, min of meer op *RG* werden toegepast. De voornaamste lipoproteïnecomplexen die mogelijk in melk aanwezig zijn, zullen waarschijnlijk fosfatiden bevatten. En voor de extractie hiervan, blijkt het nu juist geen verschil te maken of ether wordt gebruikt of niet.

Indien met een mengsel van ether en petroleumether wordt geëxtraheerd, wordt een te laag vetgehalte gevonden (GOTTLIEB, 1892; RADEMA & MULDER, 1948). Dit kon bevestigd worden: het vetgehalte van melk wordt dan b.v. 0,1....0,2% te laag gevonden. De extractie is dus vollediger dan bij afwezigheid van ether, maar nog steeds onvoldoende. Waarschijnlijk speelt dus de polariteit van het oplosmiddel een rol.

Het leek de moeite waard om te proberen of een geringe toevoeging van ether – voldoende om de waterfase er mee te verzadigen –, gevolgd door een extractie met petroleumether, een goed resultaat zou geven. Het bleek evenwel, dat bij toevoegen van tot 9 ml opklimmende hoeveelheden ether, geen scheiding in twee fasen optrad. Werd 10 ml toegevoegd, dan scheidde zich een bovenste laag van ong. 15 ml af. Hierin was echter niet het meeste vet aanwezig, hoewel coalescentie van vetbolletjes optrad. Zelfs na schudden met 15 ml ether was nog een soort roomlaagje tussen beide fasen waar te nemen. Bij toevoegen van 10 ml ether, gevolgd door 3 maal uitschudden met petroleumether, werd nog 0,02....0,05% vet te weinig gevonden. Het volume speelt dus ook een belangrijke rol. (Dit alles geldt slechts voor de eerste extractie, zoals hierna aangetoond zal worden).

Door het gebruik van ammonia wordt de extractie verbeterd. Zonder ammonia wordt b.v. slechts 90% van het vet gewonnen, zoals uit enige proefjes bleek. Volgens MOJONNIER & TROY (1925) kan dit evenwel soms vrijwel 100% zijn. De voornaamste rol van de ammonia is wellicht het oplossen van het eiwit en het verminderen van de grensvlakactiviteit ervan. Bij hogere p_H zullen de attracties tussen b.v. eiwitten en fosfatiden waarschijnlijk geringer zijn (PAYENS, 1959).

Indien geen ammonia wordt toegevoegd, treedt bij het uitschudden een sterke emulsievorming op, die mogelijk een volledig extraheren in de weg staat. De emulgering kan zijn oorzaak vinden in een grotere grensvlakactiviteit van de eiwitten, maar mogelijk ook in de aanwezigheid van caseïnedeeltjes (CRAIG & CRAIG, 1950).

Over de werking van de alcohol werd reeds het een en ander gezegd. Maar het gebruik van alcohol bij *RG* is waarschijnlijk in de eerste plaats toegepast, om de zeer hardnekkige emulsies te voorkómen, die anders bij het uitschudden optreden. Dit maakt het bovendien vrijwel onmogelijk om experimenten te doen met het weglaten van alcohol. Zo is dus de rol ervan in het mechanisme van de extractie nog geenszins opgehelderd, evenmin trouwens het gedrag van de vetoplosmiddelen.

De kwestie betreffende de ionenconcentratie is al even genoemd onder 2.2.3. en er wordt in 2.6. nog uitgebreid op ingegaan.

2.4.2. *Consequenties*

In het licht van het bovenstaande lijkt het voor de hand te liggen, dat weinig veranderingen aan de extractie tevens verbeteringen kunnen zijn. Men dient echter te bedenken, dat het extractie-voorschrift alleen voor de eerste maal uitschudden zo nauw steekt. SEUSS c.s. (1955) vonden dat het geen invloed heeft op het vetgehalte, als bij de 2e en 3e extractie een mengsel van ether en petroleumether gebruikt wordt, i.pl.v. deze beide oplosmiddelen afzonderlijk.

Opgemerkt werd al, dat na 1 maal uitschudden, uit de waterfase nog slechts 0,007....0,010% vet kon worden geëxtraheerd. Verder werd bij een proef, na

1 extractie volgens voorschrift, de waterfase afgezonderd. Hieruit was met 2 maal extraheren volgens *RG* nog 0,0076 resp. 0,0072% vet te onttrekken; met 2 extracties met petroleumether nog 0,0072 resp. 0,0076%. Tevens werd enkele malen het vetgehalte van melk bepaald volgens *RG* en volgens de gewijzigde methode (2e en 3e extractie zonder ether). Het verschil in vetgehalte was −0,001; +0,001; −0,003 en 0,000%. De gewijzigde methode geeft dus waarschijnlijk betrouwbare uitkomsten, en heeft de volgende voordelen:

1° Het scheidingsniveau tussen de beide fasen blijft meer op constante hoogte.
2° Bij de derde maal uitschudden heeft men geen kans op emulsievorming, zoals anders vaak voorkomt.
3° Als de methode al iets lagere uitkomsten geeft dan *RG*, is dit verschil waarschijnlijk te wijten aan niet vetachtige stoffen (zie hiervoor 2.5.4.).

Overwogen kan nog worden, *RG* verder te wijzigen door de derde extractie weg te laten, en in plaats daarvan alleen na te spoelen met petroleumether. Het een en ander zou getoetst moeten worden met een grote serie vergelijkende analysen.

2.5. Extractie van niet vetachtige stoffen

2.5.1. *Algemeen*

Gottlieb (1892) kon in het gewonnen vet geen spoor as of stikstof aantonen. Aangezien toch fosfatiden worden gewonnen, kunnen de door hem gebruikte analysemethoden niet erg gevoelig zijn geweest. Volgens Pien & Maurice (1932) bevat het *RG*-vet van ondermelk veel niet-vet. Het merendeel hiervan is evenwel fosfatide. Verder toonden zij lactose, eiwit en chloriden aan, gezamenlijk ong. 0,01%. Dit kan wel vóórkomen, als de bepalingen niet geheel juist worden uitgevoerd. Er blijft na uitspoelen met petroleumether steeds enig residu in de vetkolfjes achter, maar dit is bij een correcte uitvoering slechts 0,001....0,002% (zie onder 2.2.2.). De opmerkingen van Hostettler c.s. (1946) over de extractie van niet-vet, zijn kennelijk alleen gebaseerd op de uitkomsten van Pien & Maurice.

Wat kan men nu verwachten aan geëxtraheerde niet vetachtige materie, gezien onze kennis van de samenstelling van melk? De bestanddelen die enigszins in ether, en dus mogelijk in het mengsel met petroleumether, oplosbaar zijn, zijn voornamelijk organische zuren. Het is echter vrijwel uitgesloten, dat uit het basische milieu meer dan sporen ervan worden uitgeschud (zie 2.3.2.).

Volgens Craig & Craig (1950) kunnen amfotere stoffen en organische basen veelal met organische oplosmiddelen uit een ammoniakale waterfase worden geëxtraheerd. Hankinson & Cole (1958) gebruikten een soort *RG*-procedure voor de extractie van aminen uit melk. Melk bevat evenwel slechts geringe hoeveelheden aminen, welke dan nog overwegend vluchtig zijn. Ook ureum is oplosbaar in ether. Bij enkele modelproefjes bleek dan ook, dat ong. 2% van het aanwezige ureum wordt uitgeschud. Gezien melk er slechts ong. 0,025% van bevat, kan ook dit verwaarloosd worden. Misschien worden evenwel eiwitachtige stoffen voor een gering deel uitgeschud.

Het is bekend, dat in aanwezigheid van fosfatiden allerlei polaire stoffen met apolaire oplosmiddelen kunnen worden geëxtraheerd (zie b.v. Hanahan, 1960). Dit betreft in het bijzonder suikers. Inderdaad kon suiker in het *RG*-vet worden aangetoond (reactie met anilineacetaat op furanaldehyden na verhitten met

fosforzuur; FEIGL, 1956). Sommige fosfatiden bevatten evenwel inositol. Gezien de gevoeligheid van de reactie is het echter waarschijnlijk, dat het hier een grotere hoeveelheid betrof, dan aan inositol kon worden verwacht, zij het toch nog minder dan b.v. 0,001 % van het monster.

In plaats van het onderzoeken van het gedrag van allerlei stoffen afzonderlijk, werd een vetvrije kunstmelk samengesteld, die vrijwel alle bekende, niet vetachtige bestanddelen uit melk bevatte, voor zover het gehalte ervan tenminste enkele duizendste procenten is. Om een min of meer stabiele melk te verkrijgen, werd de methode van MULDER & SCHIPPER (1959) gevolgd. Een moeilijkheid is hierbij om aan alle eiwitcomponenten te komen, en wel in een vetvrije vorm. Daarom werd gebruik gemaakt van z.g. HAMMARSTEN-caseïne en van eialbumine, welke werden ontvet met een soort *RG*-procedure. Wat de eiwitfractie betreft was de kunstmelk dus niet representatief. Het „vetgehalte" ervan bedroeg gemiddeld 0,002 %. Dit was waarschijnlijk voor een deel nog werkelijk vet, door „besmetting" in het monster gekomen.

Het is bekend dat een samenstellende fractie uit caseïne, de z.g. γ-caseïne, goed oplosbaar is in alcohol. HAMMARSTEN-caseïne zou nu juist deze fractie missen. Daarom werd nog gebruik gemaakt van caseïne, die na uitwassen met water, niet was gedroogd met alcohol en ether. Op beide preparaten werd een *RG*-bepaling uitgevoerd. Daar de caseïnes zeker nog ingesloten vet bevatten, werd het eerste extract weggeworpen. De 2e t.m. 4e extractie gaven geen weegbaar residu. Als een deel van de caseïne enigszins oplosbaar is in het ethermengsel, is het zeer onwaarschijnlijk dat dit deel in z'n geheel met één extractie onttrokken zou worden. Waarschijnlijk komt dus niets van de caseïne in het vet terecht.

Het heeft weinig zin het stikstofgehalte van het vet te onderzoeken, gezien bij de bepaling ammonia wordt gebruikt. Daarom werd eerst geprobeerd of in centrifugemelk hetzelfde vetgehalte werd gevonden, als i.pl.v. ammonia 0,35 n NaOH werd gebruikt (dit geeft ongeveer dezelfde p_H aan het mengsel als 25 % NH_3 doet). Bij twee bepalingen bleek het zo gevonden vetgehalte 0,001 resp. 0,002 % lager, dus een gering verschil. Op het zo verkregen vet werd een N-bepaling uitgevoerd (micro-kjeldahl). Het bevatte stikstof overeenkomende met 0,0037....0,0051 meq./10 g ondermelk. Nu is uit ureum en fosfatiden gemiddeld 0,0037 meq. N te verwachten. Het is dus niet waarschijnlijk dat veel meer dan 0,001 meq. N in andere vorm aanwezig was. Indien dit eiwitachtig gebonden zou zijn, kan het hoogstens met 0,001 % vet overeenkomen.

Bij enkele proeven werd het vetgehalte van centrifugemelk bepaald volgens *RG*. Tevens werd het *RG*-extract van dezelfde centrifugemelk afgeschonken in mojonnierbuizen. Hierin werd drooggedampt, waarna water, zoutzuur en alcohol werden toegevoegd. Vervolgens werd uitgeschud met petroleumether. Het was de bedoeling na te gaan, of een afneming in vetgehalte optrad, welke afneming dan te wijten zou zijn aan niet vetachtige stof. Er werd alcohol toegevoegd om het extraheren van de fosfatiden mogelijk te maken, en tevens om – in samenwerking met het zoutzuur – eventuele lipoproteïnecomplexen te splitsen. Het sterk zure milieu was eveneens nodig om een volledige extractie van eventueel aanwezige vrije vetzuren te waarborgen. Bij de uitvoering werd zo snel mogelijk gewerkt en niet verhit, om afbraak van fosfatiden te voorkomen. Dit experiment werd 7 maal gedaan. De afneming in vetgehalte variëerde van + 0,006 tot −0,001 % en was gemiddeld 0,002 %. Dit verschil is dus zeer gering, en mogelijk niet eens geheel reëel.

2.5.2. *De grootte van het monster; hypothesen*

STIGEN (1956) vond dat het volgens *RG* gevonden vetgehalte van melk toeneemt, naarmate het ingewogen monster kleiner is; de kleine monsters werden met water tot het normale volume aangevuld. De stijging in vetgehalte verloopt ongeveer hyperbolisch. Dit effect is wel algemener bekend, maar er is vrijwel niet over gepubliceerd. Het treedt ook op bij andere melkprodukten. Betreffende room verscheen een voorlopige publicatie van MULDER, HOOGENDIJK & WALSTRA (1959).

Ter verklaring van dit effect lijken een viertal veronderstellingen in aanmerking te komen:

ad. 1. Het effect is toe te schrijven aan een blanco waarde uit de reagentia of aan weegfouten. Gezien de geringe blanco (zie 2.2.4.) en het feit dat nooit het tegengestelde effect werd waargenomen, is dit onwaarschijnlijk.

ad. 2. Naarmate het monster meer verdund is, zou de extractie vollediger zijn, b.v. door gemakkelijker ontsluiten van het vet. Gezien het reeds behandelde over de extractie (zie 2.4.1.) en de in 2.6. vermelde resultaten, is dit onwaarschijnlijk. Bovendien zou men in dit geval zeker niet een hyperbolisch verloop verwachten.

ad. 3. Gesteld dat een stof (stoffen) in de waterfase aanwezig is in niet opgeloste vorm – of overwegend in niet opgeloste vorm –, b.v. micellair, welke stof enigszins in het ethermengsel oplost. Dan zal men steeds een even grote hoeveelheid ervan in het extract kunnen verwachten, ongeacht de concentratie in de waterfase, tenzij deze beneden een zeker minimum daalt. Noemen we nu de geëxtraheerde hoeveelheid x, de grootte van het monster m, en het gevonden vetgehalte v, dan geldt $v = w + 100x/m$, als w het voor „x" gecorrigeerde vetgehalte is. Als „x" een niet vetachtige stof is, dan is w het „ware" vetgehalte. De gevonden resultaten zijn goed in overeenstemming met deze hypothese.

ad. 4. Gesteld dat een stof (stoffen) y aanwezig is, waarvan het verdelingsquotiënt Q (org./water) toeneemt met afnemende concentratie. De met één extractie onttrokken hoeveelheid is dan een constante maal $\frac{m.Q.[y]}{Q+1}$ als $[y]$ de concentratie in het monster voorstelt. Nu is:

$$w = v - \text{const.} \times \frac{Q.[y]}{Q+1}.$$

Hoort bij m_1 een vetgehalte v_1 en een verdelingsquotiënt Q_1 etc., en stellen we $Q_1(Q_2+1)/Q_2(Q_1+1) = r$, dan is:

$$w = \frac{v_1.r - v_2}{r-1}, \text{ als } m_1 > m_2.$$

Nemen we nu aan dat Q klein is t.o.v. 1, dan is $r \cong Q_1/Q_2$ en gaat de formule voor w ook ongeveer op voor 3 extracties.

Een rekenvoorbeeld met getallen zoals ongeveer gevonden werden, geeft het volgende: $m_1 = 2$ g; $v_1 = 30{,}06\%$; $m_2 = 0{,}2$ g; $v_2 = 30{,}60\%$. Volgens de veronderstelling *ad. 3* geeft dit:

$$w = (v_1m_1 - v_2m_2)/(m_1 - m_2) = 30{,}00\%.$$

Nemen we aan b.v. $r = 1{,}5$, dan geeft de onderhavige veronderstelling $w = 28{,}98\%$; $r = 2$ geeft $w = 29{,}52\%$. Gezien een verhouding $Q_2/Q_1 > 1{,}5$ als $m_1/m_2 = 10$ wel zeer onwaarschijnlijk is, zou dit dus inhouden dat $(v_1 - w)$ groter dan 1% vet zou zijn. Als dit waar was, dan was het allang gebleken uit verschillen in uitkomst met andere methoden voor vetgehaltebepaling. Nu werd

aangenomen dat Q klein zou zijn. Is dit niet het geval, dan wordt de berekening wat ingewikkelder, maar ook zou de gesignaleerde discrepantie tussen v en w nog groter worden en het geheel dus nog onwaarschijnlijker. Deze laatste veronderstelling kan dus ook verworpen worden.

De derde hypothese is dus wel het meest waarschijnlijk. In het volgende zal hier dan ook mee gewerkt worden. Het effect wordt uitgedrukt in de grootheid $x = 0{,}01(v-w)m$ in mg. Als meer dan 2 monstergrootten worden genomen, is het beter de lineaire regressie tussen $v.m$ en m te berekenen. Dit vergt evenwel veel meer rekenwerk. In 2.8.3. wordt een schatting van de onzekerheid in x gegeven.

2.5.3. *De grootte van het monster; experimenten*

Bij de bepaling van het vetgehalte van room wordt slechts een kleine hoeveelheid, b.v. 1 of 2 ml, als monster genomen, waarna met water wordt aangevuld tot 10 of 11 ml. Bij room is het verschijnsel dus van enig praktisch belang. De grootheid x werd hier 5 maal bepaald: $x = 0{,}9 \ldots 1{,}2$ mg. Hierbij maakte het geen verschil of het monster werd aangevuld met water, dan wel met een 1% zoutoplossing. Een voorbeeld van de uitkomsten is:

$$\left.\begin{array}{ll} \bar{m}_1 = 1{,}97 \text{ g} & \bar{v}_1 = 29{,}13\% \\ \bar{m}_2 = 0{,}26 \text{ g} & \bar{v}_2 = 29{,}53\% \end{array}\right\} \begin{array}{l} \therefore w = 29{,}07\% \\ \therefore x = 1{,}2 \text{ mg} \end{array}$$

Bij deze proeven werd meestal v_1 in 3-voud en v_2 in 5-voud bepaald. Om aan te tonen dat het vetgehalte hyperbolisch verloopt met de monstergrootte, is een serie van meer punten nodig, in het bijzonder punten voor zeer kleine monsters. Hierbij worden grote eisen aan de uitvoering van de proeven gesteld. In figuur 3 wordt een voorbeeld gegeven. De getrokken lijn werd verkregen door de lineaire regressie van $h\ (= m.v)$ als functie van m te bepalen. Hieruit volgde:

$$v = 24{,}974 \pm 0{,}016 + \frac{0{,}11 \pm 0{,}026}{m}\ \%.$$

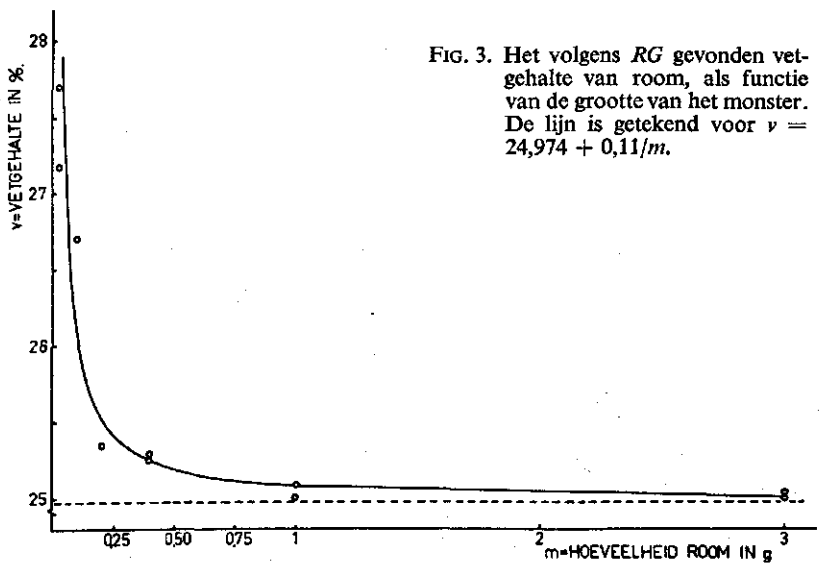


FIG. 3. Het volgens *RG* gevonden vetgehalte van room, als functie van de grootte van het monster. De lijn is getekend voor $v = 24{,}974 + 0{,}11/m$.

De correlatiecoëfficiënt tussen h en m was 0,99999877. De beide punten uit figuur 3 voor $m = 0{,}024$ zijn bij de berekening van de regressievergelijking buiten beschouwing gelaten. Hiervoor werd gevonden $v = 27{,}2$ resp. 27,7%, terwijl volgens de vergelijking $v = 29{,}6$ zou moeten zijn. Er werd al opgemerkt, dat voor zeer kleine m zeker afwijkingen van de formule moeten worden verwacht, daar een zekere minimum hoeveelheid van de stof x aanwezig moet zijn, wil de veronderstelling opgaan. Uit het feit dat de gevonden waarden sterk afwijken, is tevens op te maken, dat hier een blanco-effect geen rol van betekenis speelt (hypothese *ad. 1*).

Daar botervet volledig geëxtraheerd wordt (zie 2.3.1.) en niet verwacht kan worden dat bij kleine hoeveelheden botervet meer dan 100% wordt gewonnen, kan men bij modelproeven met verschillende hoeveelheden botervet in water geen x-effect verwachten. Inderdaad bleek $x = 0{,}0$ mg te zijn. Proeven met in ondermelk geëmulgeerd botervet mislukten, omdat het niet mogelijk was een voldoend homogeen produkt te krijgen.

Twee maal werd een serie bepalingen gedaan met „gewassen room" (4 maal met water „gewassen", daarna gehomogeniseerde room). De uitkomsten worden gegeven in figuur 4. In beide gevallen was $x = 0{,}6$ mg, dus wat kleiner dan bij de normale room. Waarschijnlijk is de stof x voornamelijk van de vetbolletjes afkomstig.

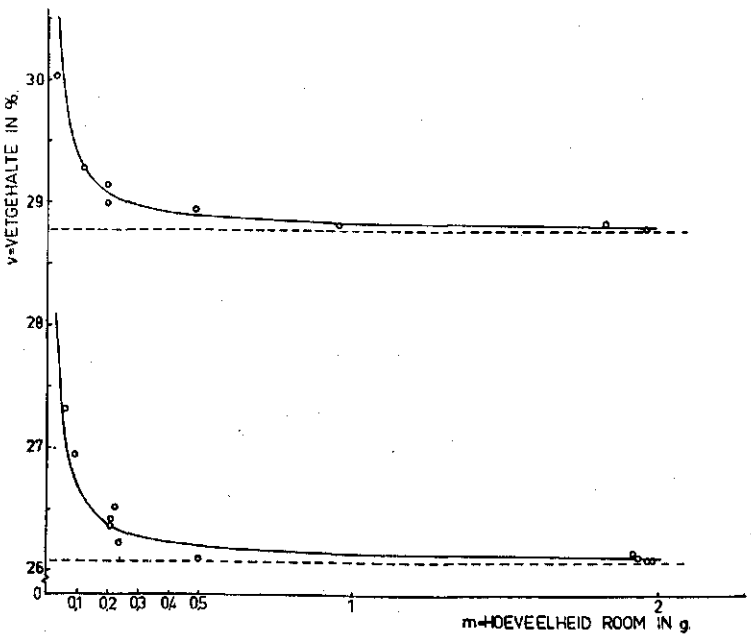


FIG. 4. Het volgens *RG* gevonden vetgehalte van „gewassen" room, als functie van de grootte van het monster. De lijnen zijn getekend voor $v = 28{,}77 + 0{,}061/m$ en voor $v = 26{,}08 + 0{,}060/m$.

Indien „x" in het plasma is gelocaliseerd, zal men geen invloed van de monstergrootte op het vetgehalte van room kunnen vinden, indien de room niet met water, maar met ondermelk wordt verdund; vanzelfsprekend dient men tevens het vetgehalte van de ondermelk te bepalen en er voor te corrigeren. Maar ook

indien de stof van de vetbolletjes afkomstig is, en in het weinige vet van ondermelk nog in voldoende hoeveelheid, zou het effect moeten verdwijnen. Gevonden werd bij een:

vetgeh. room = 36% en ondermelk = 0,10%: $x = 0{,}5$ mg;
„ „ = 49% „ „ = 0,12%: $x = 0{,}4$ mg;
„ „ = 42% „ „ = 0,33%: $x = 0{,}0$ mg.

Ook hieruit wordt dus waarschijnlijk, dat de stof niet overwegend uit het plasma komt.

Er is dus ook geen, of een zeer kleine x te verwachten bij centrifugemelk. De vetbolletjes ervan mogen dan al wat van de stof bevatten, in een sterk verdund monster zal dit te weinig zijn om het effect plaats te doen vinden. Gevonden werd:

$$\left.\begin{array}{ll} \bar{m}_1 = 11{,}3 \text{ g} & \bar{v}_1 = 0{,}048\% \\ \bar{m}_2 = 2{,}0 \text{ g} & \bar{v}_2 = 0{,}055\% \end{array}\right\} \begin{array}{l} x = 0{,}16 \text{ mg} \\ \cdots \\ w = 0{,}047\% \end{array}$$

Inderdaad is x klein, ondanks het relatief grote verschil tussen v_1 en v_2.

Bij melk kan echter wel een effect worden verwacht. Er werden 17 waarnemingen gedaan. Hierbij was steeds $m_1 \cong 11{,}3$ en $m_2 \cong 1$ g. Het vetgehalte was 2,1....4,4%. Gevonden werd: $\bar{x} = 0{,}5$ mg, met een spreiding $s_x = 0{,}36$ mg. Deze spreiding is nogal groot, wat groter dan uit de onnauwkeurigheid van de waarnemingen verwacht kon worden. Er was geen correlatie te constateren tussen x en vetgehalte, individuele koeien, stand van de lactatieperiode of datum van bemonstering.

Uit de gegevens van STIGEN (1956) is als waarde van x ong. 1 mg te berekenen; het betrof hier melk. Enkele proeven van EISSES (1956) met melkpoeder en gecondenseerde melk gaven een x van de zelfde orde van grootte.

2.5.4. *Voortgezette extractie*

Als de gebruikte hypothese aangaande de stof (stoffen) x juist is, dan is er dus in het algemeen een overmaat van aanwezig. Er zou dan na de gebruikelijke 3 extracties nog steeds iets van uitgeschud moeten kunnen worden. Globaal zou de met een 4e t/m 6e extractie verkregen hoeveelheid gelijk aan x moeten zijn, daar na 3 extracties al het vet + al de vetachtige stoffen uit de waterfase verdwenen zijn. Experimenten in deze richting hebben evenwel enige bezwaren:

1° Bij een vierde extractie wordt steeds een stabiele emulsie gevormd, doordat te weinig alcohol aanwezig is. Dit kan verhinderd worden door steeds de onttrokken alcohol weer aan te vullen, wat aanvankelijk dan ook gedaan werd. Dit bleek echter van duidelijke invloed op de geëxtraheerde hoeveelheid te zijn. Werd bij de 2e t/m 6e extractie steeds aangevuld met alcohol (ong. 3 ml), dan werd met de 4e t/m 6e extractie b.v. 0,0065% „vet" gevonden; indien alleen bij de 2e t/m 4e extractie alcohol werd gesuppleerd, dan gaf de 4e t/m 6e extractie 0,0038% „vet". Een grotere concentratie aan alcohol geeft dus meer geëxtraheerde stof, waarschijnlijk niet vetachtige stof.

Dit is ook interessant i.v.m. de vaak toegepaste modificatie van *RG* waarbij voor de 2e extractie 5 ml alcohol wordt toegevoegd. Deze werkwijze werd daarom enkele malen vergeleken met de normale procedure. Het vetgehalte van melk werd zo 0,007; 0,020; 0,007 en 0,009% hoger gevonden. Hoewel de tweede waarneming wat onwaarschijnlijk is, is er toch een duidelijk verschil.

De proeven met voortgezette extractie zijn dus zo uitgevoerd, dat bij de 2e

t/m 4e maal uitschudden alcohol is toegevoegd, zodat bij de 4e extractie weer met een „normale" alcoholconcentratie werd begonnen. Een bezwaar is nu nog, dat met de eerste 3 extracties mogelijk „te veel" stof is verwijderd.

2° De met voortgezette extractie gevonden stof is slechts gedeeltelijk enigszins in petroleumether oplosbaar, tenzij een overmaat vet aanwezig is. Ook treedt bij de geringe hoeveelheden stof gemakkelijk oververhitting op, en daardoor mogelijk ontleding.

De experimenten met voortgezette extractie zijn dus niet geheel onder dezelfde omstandigheden uit te voeren als de gewone bepaling. De proeven werden enkele malen toegepast op melk (11 ml) en de uit dezelfde melk verkregen centrifugemelk (11 ml; vetgehalte ong. 0,1%) en room (2 ml + 9 ml water; vetgehalte ong. 40%). Met de 4e t/m 6e extractie werd gemiddeld uitgeschud bij:

ondermelk	melk	room
0,1 mg	0,4 mg	0,8 mg
0,2 mg	0,5 mg	0,7 mg
0,0 mg	0,3 mg	0,7 mg

MULDER & HOOGENDIJK (1955) pasten ongeveer dezelfde methode toe op 10 ml gecentrifugeerde zoete karnemelk van zeer vette room, en vonden hierbij 1,2....3,0 mg.

Om wat van de stof te verzamelen voor onderzoek naar de samenstelling, werden enkele proeven gedaan met grote hoeveelheden melk; hierbij werd echter nog bij elke extractie alcohol toegevoegd. (De gewonnen hoeveelheden stof waren 1,1; 1,0; 1,3; 1,0 en 0,8 mg per 11 ml melk). Op de geëxtraheerde substantie werd enig kwalitatief onderzoek verricht. Er werd b.v. 30 mg van de stof gewonnen, hetwelk in drie fracties werd verdeeld:

a. 19 mg, oplosbaar in een overmaat kokende petroleumether; tevens oplosbaar in zwavelkoolstof en aceton.
b. 8 mg, oplosbaar in ethanol 96%.
c. 3 mg, alleen oplosbaar in loog.

Van fractie a. was maximaal 2 mg goed oplosbaar in petroleumether en dus waarschijnlijk zuiver vet + vetachtige stof. Tevens kon een spoortje vrije vetzuren worden aangetoond. Reacties op organisch P (met ammoniummolybdaat en benzidine na destructie), op organische N (met mangaannitraat, zilvernitraat en benzidine na destructie) en op vrije hogere vetzuren (met rodamine-B en uranylacetaat) (FEIGL, 1956) waren positief.

Fractie b. was positief op organische N en gaf de biureetreactie, evenals fractie c.

Eenmaal werden infraroodspectra opgenomen van de fracties a. en b., benevens van melkfosfatiden ter vergelijking.[1]) Hieruit bleek dat het spectrum van fractie a. overeenkomst vertoonde met dat van de fosfatiden, maar tevens de karakteristieken van eiwit had. Fractie b. was waarschijnlijk geheel eiwitachtig.

In fractie a. werd eenmaal het P-gehalte bepaald. Dit kwam overeen met 2,5 mg uitgedrukt als fosfatiden, wat dan 0,001% van de gebruikte hoeveelheid melk zou zijn.

2.5.5. *Discussie*

Uit de vermelde resultaten is duidelijk dat de stof (stoffen) *x* voornamelijk van de vetbolletjes afkomstig is, en dus uit de oppervlaktelaagjes, daar *in* het vet

[1] Dr. G. DIJKSTRA van het „Unilever Research Laboratorium" te Vlaardingen was zo vriendelijk de spectra op te nemen en te interpreteren.

geen stoffen aanwezig zijn die aanleiding kunnen geven tot de gevonden uitkomsten. Bij de proeven met verschillend grote monsters werd een afwijking van de formule gevonden bij zeer kleine monsters, evenals bij de proeven waarbij room werd verdund met ondermelk. Hieruit is af te leiden, dat de veronderstelling over x opgaat, als de geëxtraheerde hoeveelheid ervan minder dan globaal 2% van het aanwezige vet uitmaakt. Dit is van de orde van grootte van de hoeveelheid materie in de oppervlaktelaagjes.

De proeven met voortgezette extractie komen redelijk goed met de theorie aangaande x overeen, al blijkt dat toch wel wat meer uitgeschud wordt als meer oppervlaktelaagjesmaterie aanwezig is.

De betreffende stoffen zijn waarschijnlijk overwegend niet vetachtig. De materie bevat o.m. wat fosfatiden, maar dit is toch een gering deel. Deze fosfatiden zijn mogelijk van een iets andere samenstelling dan de meest bekende uit melk, gezien de oplosbaarheid ervan in aceton. Dat de stoffen ten dele een eiwitachtig karakter hebben, staat vast. Misschien betreft het fosfatide-eiwitcomplexen, mogelijk ook andere lipoproteïden.

Bij de extractie van de stoffen speelt de alcohol waarschijnlijk een rol van betekenis. Vooral bij de eerste extractie gaat vrij wat alcohol mee, waardoor het ethermengsel sterker polair wordt. De modificatie volgens welke bij de 2e extractie alcohol wordt toegevoegd, is dus minder juist.

Uit de discussie in 3.4. blijkt, dat de stoffen mogelijk nogal wat vetachtige bestanddelen hebben, omdat het naar aanleiding van de daar behandelde uitkomsten waarschijnlijk is, dat bij melk het vetgehalte volgens *RG* nog wat te laag wordt gevonden, dit in tegenstelling tot de uitkomsten bij ondermelk.

Concluderend kan worden gesteld, dat waarschijnlijk met *RG* zeer weinig niet-vet mee wordt bepaald en wel bij ondermelk 0,001 of 0,002%, bij melk ongeveer 0,004% en bij room b.v. 0,05%, of meer als een te klein monster wordt genomen, wat dus afgeraden moet worden. Daarnaast blijft dus wat vetachtige stof achter, maar dit kan niet gewonnen worden zonder tevens een overmaat niet vetachtige stof mee te bepalen.

2.6. Het toevoegen van zout

Het gebruik van zout werd al genoemd bij het toepassen van *RG* op suspensies van fosfatiden. Bij het onderzoek van room wordt doorgaans verdund met water. Stigen (1956) gebruikte evenwel een 0,9% NaCl-oplossing, al vermeldde hij geen consequenties hiervan. Gedurende ons onderzoek werd enkele malen de indruk gewekt, dat het volgens *RG* gevonden vetgehalte van room te laag was. Daarom werd een serie proeven opgezet, waarbij enerzijds de room met zoutoplossing, anderzijds met gedestilleerd water werd verdund. Het verschil tussen de gevonden vetgehalten Δ, bleek sterk te variëren. Bij 33 bepalingen liep Δ uiteen van −0,02 tot +0,63%; $\overline{\Delta}$ was 0,127%, de spreiding s_Δ 0,144%. Een histogram van de gevonden uitkomsten wordt gegeven in figuur 5. Alle proeven zijn niet onder precies dezelfde omstandigheden uitgevoerd. Meestal werd een monster van 2 ml genomen, soms 1 ml. Het vetgehalte van de onderzochte room was 27....47%, in 30 van de 33 gevallen 31....38%. Er bestond geen correlatie van Δ met vetgehalte; ook niet met jaargetijde, individuele koeien of stand van de lactatieperiode.

Uit de proeven blijkt dat de spreiding van de uitkomsten bij onderzoek van dezelfde room, groter was bij verdunning met water, dan bij verdunning met

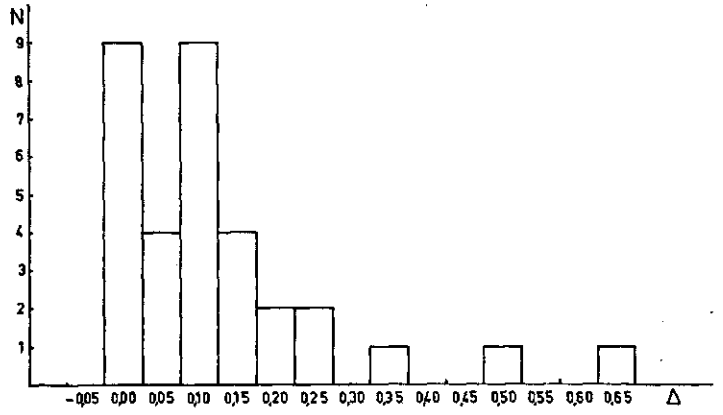


FIG. 5. Het volgens *RG* gevonden vetgehalte van room indien verdund met zoutoplossing, verminderd met dat gevonden bij verdunning met water. Het aantal malen (N) dat een bepaald verschil (Δ) werd gevonden. B.v. $\Delta = 0{,}15$ wil zeggen $0{,}13\% \leqslant \Delta \leqslant 0{,}17$.

zoutoplossing. Twee groepen van goed vergelijkbare experimenten werden uitgezocht. In de ene groep was de gemiddelde spreiding $\bar{s}_{water} = 0{,}0447\%$ (aantal vrijheidsgraden $\varphi = 19$) en $\bar{s}_{zout} = 0{,}0210\%$ ($\varphi = 20$); de F-toets geeft hier $F = 4{,}5$, d.w.z. dat de kans dat het verschil in s niet reëel is $< 0{,}001$ is. In de andere groep was $\bar{s}_{water} = 0{,}041\%$ ($\varphi = 8$) en $\bar{s}_{zout} = 0{,}018\%$ ($\varphi = 10$); dit geeft $F = 5{,}3$, d.w.z. dat de kans dat het verschil niet reëel is $< 0{,}01$ is.

Verder werd voor alle experimenten die in twee- of meervoud werden gedaan, de correlatie tussen s_{water} en Δ bepaald. De gevonden correlatie (r) zal in geen geval erg groot kunnen zijn, aangezien: 1° s_{water} een onnauwkeurige schatting van de werkelijke spreiding σ_{water} is, en 2° ook Δ niet nauwkeurig bepaald is, juist doordat σ_{water} zo groot is. Toch werd gevonden $r = 0{,}653$ ($\varphi = 24$) zodat de kans slechts 0,001 is dat er geen correlatie bestaat. Hoogstwaarschijnlijk is er dus een sterke samenhang tussen σ_{water} en Δ, wat ook met het hierna behandelde in overeenstemming is. Het maakt het doen van verdere proeven overigens niet gemakkelijk.

Bij 25 bepalingen waarbij een 1% NaCl-oplossing werd gebruikt was $\overline{\Delta} = 0{,}136\%$, bij 8 met 0,5% NaCl was $\overline{\Delta} = 0{,}101\%$. Dit verschil werd enkele malen bevestigd, door dezelfde room met verschillende concentraties zout te behandelen: b.v. 0,5% zout gaf $\Delta = 0{,}20\%$, 1% gaf $\Delta = 0{,}25\%$, 1,5% gaf $\Delta = 0{,}24\%$. Er is sprake van een „afnemende meeropbrengst".

Tabel 3 geeft de uitkomsten van twee proeven, waarbij het met elke extractie afzonderlijk gewonnen vet werd bepaald. Hierbij is na het afgieten, het extract steeds volledig verwijderd door herhaald naspoelen met petroleumether. De proeven geven dus een indruk van het totale verdelingsquotiënt („overall partition ratio"), dat bij toevoegen van zout groter blijkt te zijn. (Ook bij de met water verdunde room wordt het verdelingsevenwicht waarschijnlijk bereikt: het maakt tenminste geen verschil of kort dan wel langdurig wordt uitgeschud). Nu is bij deze proeven de extractie buiten aanwezigheid van zout waarschijnlijk nog vrijwel volledig geweest. Bij normale bepalingen speelt echter het steeds in de buis achterblijvende ethermengsel nog een rol (zie 2.2.1.), zodat dan onvolledig winnen van het vet verwacht kan worden. Dit verklaart tevens de grote s_{water}, de correlatie tussen s_{water} en Δ, en de scheve verdeling van figuur 5.

TABEL 3. *RG* toegepast op room, aangevuld met water, resp. 1% NaCl-oplossing. De bij elke extractie afzonderlijk gevonden vetpercentages

Volgnummer van de extractie	Verdund met 1% NaCl-oplossing	Verdund met water
1	35,16	34,93
2	0,104	0,248
3	0,016	0,032
1	32,94	32,74
2	0,177	0,299
3	0,019	0,019

Indien men zout aan melk toevoegt, resulteert ook dit meestal in een wat hoger vetgehalte volgens *RG*. Bij 4 proeven waarbij 0,5% NaCl werd toegevoegd bleek $\overline{\triangle} = 0{,}004\%$, bij 4 proeven met 1% NaCl bleek $\overline{\triangle} = 0{,}006\%$.

De toeneming in de geëxtraheerde hoeveelheid fosfatiden bij toevoegen van zout aan melk, karnemelk of room werd al behandeld (zie 2.3.3.). De gevonden $\triangle$ bij room is echter vaak veel groter, dan uit een verschil aan fosfatiden kan worden aangenomen, soms zelfs groter dan het fosfatidengehalte van de room. Enkele malen werd $\triangle$ van zoete karnemelk bepaald, benevens het verschil in fosfatidengehalte (= 26 × P-gehalte) $\triangle f$. Gevonden werd $\triangle = 0{,}025$ en $\triangle f = 0{,}015\%$; tevens $\triangle = 0{,}031\%$ en $\triangle f = 0{,}014\%$. Van 5 verschillende monsters zoete karnemelk was $\triangle = 0{,}025\%$. Bij zure karnemelk is $\triangle$ kleiner. Bij zoete en zure karnemelk uit dezelfde room bleek $\triangle$„zoet" $= 0{,}031\%$ en $\triangle$„zuur" $= 0{,}019\%$; tevens $\triangle$„zoet" $= 0{,}020\%$ en $\triangle$„zuur" $= 0{,}008\%$. Dit verschil hoeft geen verwondering te wekken, daar bij de aanwezigheid van melkzuur de ionenconcentratie in de waterfase groter is.

Ook bij karnemelk, waarbij de kwestie van een te klein „totaal verdelingsquotiënt" waarschijnlijk geen rol speelt, wordt dus een grotere $\triangle$ gevonden, dan met fosfatiden kan worden verklaard: $\triangle \cong 2 \times \triangle f$. De vraag is dus, welke stoffen dit betreft. Het lijkt niet onwaarschijnlijk, dat het weer de stoffen uit de oppervlaktelaagjes van de vetbolletjes zijn. Bij verdunning van room met zoutoplossing blijft evenwel het effect van groter vetgehalte bij grotere verdunning bestaan (zie 2.5.3.).

Het gebruik van zout is bij vloeistof–vloeistof-extractie een bekende werkwijze. Het hierdoor verbeteren van de extractie kan verschillende oorzaken hebben, zoals: het verminderen van de oplosbaarheid van de te extraheren stof in de waterfase, dus uitzouten; verminderen van de mengbaarheid van beide fasen; grotere associatie van de te extraheren moleculen (CRAIG & CRAIG, 1950; MORRISON & FREISER, 1957). Inderdaad treedt snellere ontmenging van de fasen op bij room, als zout is toegevoegd; het scheidingsniveau wordt evenwel niet beïnvloed. Dat ook uitzouten optreedt blijkt hieruit, dat de eiwitten minder goed in de waterfase oplosbaar zijn als zout is gebruikt. Het is dus niet uitgesloten, dat een deel van de gevonden $\triangle$ aan niet vetachtige stof toegeschreven moet worden. Anderzijds lijkt het waarschijnlijk dat het zout enige invloed heeft op de stabiliteit van de grenslaagjes tussen vetbolletjes en waterfase.

Wat is nu het meest aan te bevelen, wel of niet zout toevoegen? Wil men via *RG* het fosfatidengehalte bepalen, dan is zout stellig een goed hulpmiddel. Voor

het vetgehalte van melk maakt het weinig uit. Bij karnemelk is het een en ander nog niet geheel duidelijk, maar ligt de waarheid wellicht in het midden. Voor room is de vraag evenwel van meer belang, gezien de soms zeer grote △. Waarschijnlijk wordt dan het vetgehalte bij verdunnen met water te laag gevonden. Bij fosfatidenrijke produkten als karnemelk werd door ons steeds met *RG* een hoger vetgehalte gevonden dan met methoden met zure ontsluiting (zie 3.2.3.); bij room bleek het echter enige malen juist andersom te zijn.

STIGEN (1956) gebruikte een „balansproef" met room, ondermelk en daaruit samengestelde „melk" om methoden voor vetgehaltebepaling te controleren. Is de methode juist voor alle drie de produkten, dan moet de „balans" kloppen. (Dit houdt overigens niet in, dat de methode juist is als de balans klopt!). Men kan het ook zo stellen: als men aanneemt dat *RG* juist is voor melk en ondermelk, dan is dit voor room te controleren door deze met ondermelk tot „melk" te verdunnen, naast verdunning met de gebruikelijke vloeistof. Men dient natuurlijk te corrigeren voor het uit de ondermelk afkomstige vet. Bij deze proef doet zich echter een geringe vertroebeling van de uitkomsten voor, tengevolge van de kwestie „*x*" (zie 2.5.3.). Daardoor kan verwacht worden, dat bij verdunning met ondermelk het berekende vetgehalte van de room enige honderdste procenten te laag is. (M.a.w. de „balans" klopt niet helemaal; dit werd ook door STIGEN gevonden).

TABEL 4. Het volgens *RG* gevonden procentisch vetgehalte van room, aangevuld met water, zoutoplossing, resp. ondermelk.

Water (1)	Zoutoplossing (2)	Ondermelk (3)	(2) – (1) △	(2) – (3)
31,87	32,50	32,49	0,63	0,01
34,59	34,94	34,87	0,35	0,07
34,28	34,56	34,53	0,28	0,03
32,45	32,60	32,49	0,15	0,11
37,85	37,93	37,93	0,08	0,00
35,31	35,33	35,36	0,02	–0,03
32,69	32,67	32,61	–0,02	0,06
		Gemiddeld	0,22	0,03[5]

De verrichte experimenten zijn samengevat in tabel 4, gerangschikt volgens afnemende △. Er kan uit geconcludeerd worden, dat het verdunnen met een zoutoplossing (b.v. 1% NaCl) de voorkeur verdient boven het verdunnen met water, als men inderdaad de „balansproef" als criterium neemt. Met zoutoplossing wordt soms een iets te hoog gehalte gevonden, maar verdunnen met water geeft vaak een veel te lage uitkomst.

2.7. TOEPASSING OP MELKPRODUKTEN

De methode *RG* wordt algemeen toegepast op de meeste melkprodukten. De modificatie van MOJONNIER is zelfs bedoeld als een universele methode (MOJONNIER & TROY, 1925). Er is overigens weinig gepubliceerd over onderzoek dienaangaande. Ook in dit onderzoek is er weinig aandacht aan besteed, behalve aan ondermelk c.q. centrifugemelk (zie o.m. 2.2.3. en 2.5.) en aan room (zie o.m. 2.5. en 2.6.).

De methode werd wel enkele malen toegepast op melkpoeder en gecondenseerde melk, maar het enige dat hieruit geconcludeerd kan worden, is dat geen sterk afwijkende gehalten werden gevonden, en dat de spreiding vergelijkbaar is met die bij melk. Gezien de kennis van de methode als zodanig, zijn belangrijke afwijkingen ook onwaarschijnlijk. Bij de toepassing op melkpoeder dient men na het toevoegen van ammonia te verwarmen (RICHMOND, 1908). Daarom werd nog nagegaan bij ondermelk en bij karnemelk of dit verwarmen bij deze produkten invloed heeft op het gevonden vetgehalte. Dit bleek niet het geval te zijn, evenmin als er sprake was van een verlaagd P-gehalte van het geëxtraheerde vet, zodat ook afbraak van fosfatiden niet of nauwelijks optreedt.

De invloed van enkele bewerkingen van melk op het gevonden vetgehalte werd nagegaan. Zo werd melk gedurende 20 minuten op 120 °C in blikjes verhit. Het vetgehalte voor verhitten was 3,075 %, er na 3,074 %; tevens voor verhitten 3,459 %, er na 3,462 %. Waarschijnlijk is er dus geen invloed van betekenis.

Als rauwe melk wordt gehomogeniseerd, treedt een afneming van het gevonden vetgehalte op, als gevolg van vetsplitsing. In het algemeen is *RG* niet geschikt voor produkten die veel vrije vetzuren bevatten, tenzij hiervoor een correctie wordt toegepast. Doorgaans wordt vóór het homogeniseren eerst gepasteuriseerd, waardoor lipase vernietigd wordt. Enkele malen werd gepasteuriseerde melk (enige minuten op 80 °C) voor en na homogeniseren (bij 250.... 300 kg/cm²) onderzocht. Hierbij bleek een kleine afneming in vetgehalte, n.l. 0,004; 0,003 en 0,005 %. Werd dezelfde melk (wel en niet gehomogeniseerd) 6 maal i.pl.v. 3 maal geëxtraheerd, dan bleek een verschil van 0,001; 0,001 en 0,000 %. Er is dus wellicht na homogeniseren een geringe afneming in gevonden vetgehalte door een wat slechtere extractie. Mogelijk treden grotere verschillen op bij zeer grote homogenisatiedrukken.

2.8. REPRODUCEERBAARHEID[1])

2.8.1. *De afwijkingen binnen een serie*

In tabel 5 wordt een overzicht gegeven van de gevonden en de te verwachten toevallige afwijkingen in de uitkomsten van de bepalingen, uitgevoerd zoals in dit onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van alle gegevens van „normale" vetgehaltebepalingen; bij room zijn alleen die gebruikt, waarbij met een zoutoplossing werd verdund. Voor de berekening van s_v werd gebruik gemaakt van de formule:

$$s_v^2 = \frac{\Sigma \Sigma (v - \bar{v})^2}{\Sigma (n-1)}.$$

De betrouwbaarheid van s_v (maximale σ_v voor $p = 0{,}95$) werd berekend met behulp van de χ^2-tabel, als $\varphi < 30$ was; voor $\varphi > 30$ werd aangenomen:

$$\text{spreiding van } s_v \cong \frac{s_v}{\sqrt{2\varphi}}.$$

De waarnemingen zijn vrijwel steeds verricht in 2-, 3- of 4-voud; gewerkt werd n.l. met series van 8, zodat b.v. bij vergelijking van 2 methoden beide in 4-voud werden uitgevoerd. Daarom werd tevens de afwijking van het gemid-

[1] De Heer M. KEULS van de afdeling Wiskunde van de Landbouwhogeschool was zo vriendelijk bij enige statistische problemen behulpzaam te zijn.

TABEL 5. De reproduceerbaarheid van de vetgehalten bij verschillende produkten bij *RG*.

Produkt	onder-melk	melk	melk	room	room	room	karne-melk
Grootte v. h. monster in g ≃	11	1	11	0,2	1	2	11
Gemiddeld vetgehalte in % ≃	0,08	3,6	3,6	35	35	35	1
φ	47	71	196	9	29	86	43
s_v in % vet	0,00228	0,0211	0,00316	0,108	0,0319	0,0289	0,00338
$p = 0{,}05$ dat $\sigma_v >$	0,0027	0,024	0,0035	0,24	0,041	0,033	0,0040
$t_{0,05} \cdot s_{\bar{v}}$ voor $n = 1$	0,0045	0,042	0,0063	0,24	0,064	0,058	0,0067
id. $n = 2$	0,0032	0,029	0,0044	0,17	0,045	0,041	0,0047
id. $n = 3$	0,0026	0,024	0,0036	0,14	0,037	0,034	0,0039
id. $n = 4$	0,0023	0,021	0,0032	0,12	0,032	0,029	0,0034
id. $n = 5$		0,019		0,11			
$t_{0,05} \cdot s(\bar{v}_1 - \bar{v}_2)$ voor $n = 2$	0,0045	0,042	0,0063	0,24	0,064	0,058	0,0067
id. $n = 4$	0,0032	0,029	0,0044	0,17	0,045	0,041	0,0047
Berekend gemiddeld duploverschil $\bar{d}$	0,0026		0,0036			0,033	
$p = 0{,}99$ dat $d <$	0,0059		0,0082			0,075	

Verklaring: φ = aantal vrijheidsgraden waarop de berekening van s_v berust
s_v = gemiddelde spreiding van de steekproeven, σ_v = werkelijke spreiding.
$t_{0,05} \cdot s_v$ = verwachte afwijking van het gemiddelde die in 5% van de gevallen overschreden wordt.
p = kans
n = aantal waarnemingen
$s(\bar{v}_1 - \bar{v}_2)$ = spreiding van het verschil tussen twee gemiddelden.

delde gegeven voor verschillende waarden van n, berekend met behulp van Student's t: $t.s_v/\sqrt{n}$, waarbij t werd opgezocht bij φ vrijheidsgraden voor $p = 0{,}05$ (tweezijdig). Tevens werd de onzekerheid van het verschil van twee gemiddelden berekend: $t.s(\bar{v}_1 - \bar{v}_2)$.

Het zou interessant zijn te weten, of de afwijkingen ongeveer normaal zijn verdeeld. De gewone bepalingen geven geen uitkomsten om dit te toetsen. Daarom werd het vetgehalte van melk in 8-voud bepaald; dit experiment werd 9 maal gedaan. Alle series werden op één gemiddelde gebracht om een frequentieverdeling te maken. Daarna werd een χ^2-toets gedaan t.o.v. de te verwachten normale verdeling. Dit gaf $\chi^2 = 0{,}823$ ($\varphi = 4$), dus een zeer goede overeenstemming ($\chi^2_{0,95} = 0{,}711$ voor $\varphi = 4$); m.a.w. de verdeling komt zeer goed met de normale overeen.

Aangezien een zekere scheefheid niet onwaarschijnlijk is (zie verderop), werd ook hiervoor getoetst. Dit gaf $g_1 = -0{,}0462$ met $s_{g_1} = 0{,}283$ (zie voor de methode SNEDECOR, 1956); hieruit volgt $t = \mid g_1/s_{g_1} \mid = 0{,}163$ ($\varphi = \infty$), dus de scheefheid is beslist niet significant. Door het samenbrengen op 1 gemiddelde, werkt men echter ook bij series van 8 het „maken" van een symmetrische verdeling nog enigszins in de hand. Daarom werd nog van de 9 series afzonderlijk de scheefheid en de significantie ervan bepaald. Uit de gevonden overschrijdingskansen werd door „pooling" een totale overschrijdingskans berekend (KENDALL,

1947). Deze was 0,25, dus ook op deze wijze kan scheefheid niet worden aangetoond.

De berekende waarden voor s_v zijn natuurlijk gemiddelden. Het is van belang te weten, of de werkelijke spreidingen bij de afzonderlijke bepalingen, steeds ten naaste bij gelijk zijn geweest, m.a.w. of de afzonderlijke steekproef-spreidingen opgevat mogen worden als steekproeven uit één verdeling. Dit werd voor het geval van de normale bepalingen op melk ($m = 11$) als volgt getoetst: Aangezien de afwijkingen van het gemiddelde ongeveer normaal verdeeld blijken te zijn, zullen de duplo-verschillen ook normaal verdeeld zijn met een spreiding die $\sqrt{2}$ maal zo groot is, indien ze alle afkomstig zijn uit dezelfde verdeling. Is dit niet het geval, dan zijn er dus zowel meer kleine als meer grote waarden voor het (absolute) duplo-verschil d, dan uit de normale verdeling is te verwachten. M.a.w. de verdeling van de duplo-verschillen zal positieve kurtosis vertonen. 133 waarden van d stonden ter beschikking, dus zeker voldoende voor een vrij scherpe toets. De grootheid g_2, die een maat is voor kurtosis (SNEDECOR, 1956), bleek +2,245 te zijn. $s_{g_2} = 0{,}417$, dus $t = 5{,}38$ ($\varphi = \infty$), waaruit blijkt dat, $p < 0{,}000.001$ dat de kurtosis niet reëel is. (Ook als 1 extreme waarde voor d werd weggelaten, was g_2 nog sterk significant, n.l. $p \cong 0{,}001$). Het is dus duidelijk dat de spreidingen van geval tot geval hebben verschild, en dat de opgegeven waarden voor s_v slechts als gemiddelden mogen worden beschouwd.

Waar kan men nu de toevallige afwijkingen aan toeschrijven? Waarschijnlijk is de variantie opgebouwd uit een vrij constant deel, vnl. ten gevolge van onnauwkeurigheden in het wegen, en een deel evenredig met de hoeveelheid vet, vnl. verliezen t.g.v. spatten, morsen etc. Bij melk e.d. mag het produkt als volkomen homogeen beschouwd worden, indien tenminste de gebruikelijke voorzorgen worden genomen. De afwijkingen in het gewicht van het monster (m) zijn i.h.a. te verwaarlozen t.o.v. die in het gewicht van het verzamelde vet (h), tenzij het vetgehalte (v) zeer hoog is. Zo zou dan resulteren de betrekking:

$$\sigma_v = \frac{\sqrt{a.h^2 + b}}{m},$$

waarin a en b voor een bepaalde analyst vrij constante waarden zouden zijn. (Voor vetrijke produkten zou onder het wortelteken nog een term $c.v^2$ moeten worden geplaatst, waarin c van dezelfde orde van grootte is als b). De gevonden uitkomsten zijn zeker niet strijdig met deze formule; er zijn evenwel te weinig waarnemingen om de hypothese behoorlijk te toetsen. Mogelijk spelen ook andere factoren een rol; s_v voor karnemelk is b.v. al wat afwijkend. Gezien de formule is het niet onwaarschijnlijk, dat de uitkomsten negatief scheef verdeeld zouden zijn. Er is n.l. wel verlies aan vet mogelijk tijdens de bewerking, maar nagenoeg geen winst. Zoals hierboven vermeld, kon scheefheid evenwel niet overtuigend worden aangetoond.

De gegevens van tabel 5 zijn voornamelijk bedoeld om een inzicht te geven in de significantie van de uitkomsten van dit onderzoek. Voor de praktijk hebben ze minder waarde, zeker niet de gegevens over verdunde melk en sterk verdunde room. Ook de spreiding bij karnemelk is niet van praktisch belang, daar het hier zoete karnemelk van nogal vette room betreft. Overigens zal in de praktijk de spreiding doorgaans groter zijn, daar bij ons onderzoek grote ervaring werd verkregen, en bovendien de bepalingen zo nauwgezet werden uitgevoerd als dat normalerwijze niet mogelijk zal zijn. Toch is voor ondermelk, melk en room het gemiddeld duplo-verschil berekend ($\bar{d} = 1{,}128 s_v$) en de te verwachten maximale

d in 99% van de gevallen. Dit, omdat doorgaans de vereiste reproduceerbaarheid wordt opgegeven als een maximaal toelaatbaar verschil tussen duplo's, bij gelijktijdige bepaling door één analyst.

2.8.2. *De afwijkingen tussen series*

Al het tot nu toe behandelde betreft afwijkingen binnen een serie bepalingen. Bij herhaling van de bepalingen in een andere serie is een grotere afwijking denkbaar. Daarom werd van dezelfde melk 3 maal het vetgehalte in 8-voud bepaald. Dit experiment werd 3 maal gedaan. Met behulp van een eenvoudige variantieanalyse werd de spreiding tussen series s_y bepaald: $s_y = 0{,}00293\%$. Daar $s_v = 0{,}00316\%$ (binnen serie) en dus $s_{\bar{v}} = 0{,}00121$ voor $n = 8$, geeft de F-toets $F = 8{,}1$ ($\varphi_y = 6$, $\varphi_v = 196$), dus een uiterst significant verschil. Deze spreiding tussen series heeft geen invloed op de significantie bij vergelijkingen binnen een serie uitgevoerd, mits de monstergrootten ongeveer gelijk zijn. Wel is σ_y natuurlijk van belang voor de nauwkeurigheid van het absolute vetgehalte. In de praktijk zal men dus ten minste rekening moeten houden met een totale spreiding van het gemiddelde van 0,005% voor bepalingen in duplo, en dus met een marge van ongeveer 0,013% voor een zekerheid van 99%.

De afwijkingen tussen series moeten waarschijnlijk voornamelijk worden toegeschreven aan onnauwkeurigheden in het wegen van het vet, b.v. veroorzaakt door verschillen in temperatuur en luchtvochtigheid. Dit houdt in, dat σ_y al naar de omstandigheden zeer verschillende waarden aan zou kunnen nemen. Dat s_y kleiner kan zijn dan hier boven aangegeven, blijkt b.v. uit het volgende experiment, waarbij gesteriliseerde melk enkele malen onderzocht werd met steeds enige dagen tussenruimte. De gevonden vetgehalten waren:

de 1e maal 3,075 en 3,075%
de 2e „ 3,075 en 3,075%
de 3e „ 3,074 en 3,072%
de 4e „ 3,075 en 3,075%.

Hier is de spreiding tussen series dus heel klein geweest.

In het algemeen mag worden geconcludeerd, dat bij *RG* de reproduceerbaarheid zeer goed is, omdat behalve aperte fouten in de handelingen, vrijwel alleen de onnauwkeurigheid van het wegen van invloed is. Doorgaans zijn de uitkomsten verkregen op verschillende laboratoria met dezelfde melk, dan ook beter met elkaar in overeenstemming, dan bij vele andere methoden het geval is.

2.8.3. *Proeven met verschillend grote monsters*

Zie voor de opzet van deze proeven 2.5.2. en 2.5.3. Stellen we: m = grootte van het monster; h = gewogen hoeveelheid vet; $v = h/m$; w = „ware vetgehalte" (uitgedrukt als fractie;) $m_1 > m_2$. Daar $v = w + x/m$, is

$$w = \frac{m_1 v_1 - m_2 v_2}{m_1 - m_2}.$$

Daar de afwijkingen in m verwaarloosd kunnen worden t.o.v. die in v, en er in principe geen correlatie bestaat tussen de afwijkingen in v_1 en v_2, is:

$$\sigma_w \simeq \frac{\sqrt{m_1^2 . \sigma_{v1}^2 + m_2^2 . \sigma_{v2}^2}}{m_1 - m_2}.$$

Tevens is:

$$x = (v - w)m = \frac{m_1 m_2}{m_1 - m_2}(v_2 - v_1).$$

Dit geeft:

$$\sigma_x \cong \frac{m_1 m_2}{m_1 - m_2}\sqrt{\sigma_{v1}^2 + \sigma_{v2}^2}.$$

Voor room ($v \cong 0{,}35$; $m_1 = 2$ g; $m_2 = 0{,}2$ g) geven deze formules met de gegevens uit tabel 5: $s_w = 0{,}035\%$ en $s_x = 0{,}25$ mg. De afwijkingen van het gemiddelde zijn echter van groter belang. Doorgaans werd v_1 in 3-voud en v_2 in 5-voud bepaald. Voor dit geval werd berekend de maximale afwijking van het gemiddelde voor een overschrijdingskans $p = 0{,}05$; voor $\bar{w}$ geeft dit 0,04% en voor $\bar{x}$ 0,26 mg. Voor de proeven met melk zijn deze afwijkingen in $\bar{w}$ 0,0044% en in $\bar{x}$ 0,22 mg.

De spreiding tussen series σ_y kan evenwel ook een rol spelen. Indien deze tot stand komt door weegfouten, dan is dit zeker van invloed op de grootte van x. Gaan we nu uit van de formule

$$x = \frac{(m_1 h_2 - m_2 h_1)}{m_1 - m_2}.$$

Een afwijking $|a|$ in m geeft nu een afwijking $\triangle x$ in x:

$$\triangle x = \left|\frac{(m_1 + a)h_2 - (m_2 + a)h_1}{(m_1 + a) - (m_2 + a)} - x\right| = \left|a \,.\, \frac{h_2 - h_1}{m_1 - m_2}\right| = \left|w \,.\, a\right|$$

Een zelfde afwijking $|a|$ in h geeft een afwijking in x:

$$\triangle x = \left|\frac{m_1(h_2 + a) - m_2(h_1 + a)}{m_1 - m_2} - x\right| = \left|a\right|.$$

Hieruit resulteert een $\sigma_x' = \sigma_a \,.\, \sqrt{w^2 + 1}$. Een schatting voor σ_a kan gemaakt worden met behulp van de spreiding tussen series (σ_y), door aan te nemen dat

$$\frac{\sigma_y^2}{\bar{v}^2} \cong \frac{\sigma_a^2}{\bar{m}^2} + \frac{\sigma_a^2}{\bar{h}^2},$$

wat ten naaste bij opgaat. Voor $s_y = 0{,}003\%$; $\bar{m} = 11$ g en $\bar{h} = 0{,}385$ g geeft dit $s_a = 0{,}30$ mg. Voor room ($w \cong 0{,}35$) resulteert dit in $s_x' = 0{,}32$ mg. Gecombineerd met de gevonden $s_{\bar{x}}$ geeft dit een maximale afwijking in $\bar{x}$ voor een overschrijdingskans $p = 0{,}05$ van 0,69 mg. Voor melk ($w \cong 0{,}035\%$) is deze afwijking 0,64 mg.

De schatting s_a is echter onbetrouwbaar, daar σ_y sterk variabel zal zijn. Waarschijnlijk was σ_a meestal veel kleiner dan 0,3 mg, een enkele maal wellicht ook wat groter. Wij hebben de indruk, dat σ_a klein was ten tijde van de proeven met room, gezien de toen constante temperatuur en luchtvochtigheid.

2.8.4. *Fosfatidengehalten*

De spreiding van de bepaalde fosfatidengehalten f (= 26 × P-gehalte) gaf bij:

melk $s_f = 0{,}0004\%$ ($\bar{f} = 0{,}035\%$; $\varphi = 18$)
room $s_f = 0{,}0010\%$ ($\bar{f} = 0{,}2$ %; $\varphi = 4$)
karnemelk $s_f = 0{,}0034\%$ ($\bar{f} = 0{,}1$ %; $\varphi = 13$).

3. METHODEN MET ZURE ONTSLUITING

3.1. ONTWIKKELING

3.1.1. *Literatuuroverzicht*

Waarschijnlijk werd de ontsluiting van het vet met zoutzuur het eerst door SCHMID (1888) toegepast. Een hoeveelheid melk werd met een gelijk volume sterk zoutzuur gekookt tot de kleur donkerbruin was. Daarna werd gekoeld en geschud met ether; na ontmenging werd een aliquoot deel van de vetoplossing drooggedampt etc.

BONDZYŃSKI Sr. (1889) deelde mede dat de methode goed beviel en gaf het principe van de werking: door afbreken van eiwit en de omhulsels van de vetbolletjes wordt het vet ontsloten en extraheerbaar. BONDZYŃSKI Jr. (1894) ontwikkelde een overeenkomstig voorschrift voor kaas. RATZLAFF (1903) ging hier op door en kwam tot de volgende procedure: 3....5 g kaas werd gedurende 8....10 minuten gekookt met 10 ml HCl 25%; na koelen werd uitgeschud met 25 ml petroleumether, dus als bij *RG*. SJOLLEMA (1904) stelde voor 3 maal te extraheren, om het werken met een aliquoot deel te vermijden. BUTTENBERG & KOENIG (1910) voerden het gebruik van alcohol in, waardoor de ontmenging werd versneld en verbeterd. Het filtreren van de vetoplossing, dat zij hadden ingevoerd, werd later terecht weer verlaten.

Het voorschrift had daarmee vrijwel zijn huidige vorm gekregen. Voor kaas is de methode onder de naam SCHMID-BONDZYŃSKI-RATZLAFF *(SBR)* nog steeds algemeen gebruikelijk en in een internationaal aanvaarde norm beschreven, voor andere produkten veel minder, en dan soms onder de naam WERNER SCHMID.

BERNTROP (1902) ontwikkelde een geheel andere methode met zure ontsluiting. Na koken met zoutzuur werd het destruaat gefiltreerd en het residu uitgewassen. Het vet bleef op het filter achter; dit werd gedroogd en daarna geëxtraheerd in een soxhletapparaat. Na verdere ontwikkeling (zie 3.6.) is dit voorschrift onder de onjuiste naam „methode van WEIBULL" *(Wb)* veel gebruikt voor allerlei melkprodukten.

In de jaren 1950....1955 is door MULDER en medewerkers onderzoek aan de methoden met zure ontsluiting gedaan. De uitkomsten zijn nog slechts ten dele gepubliceerd: MULDER & MEYERS (1953); MULDER & HOOGENDIJK (1956). De gedachten waarvan werd uitgegaan bij dit werk waren:

1° Bij *SBR* wordt veel niet-vet geëxtraheerd en *Wb* is omslachtig. Gezien nu bij *Wb* het vet kwantitatief afgefiltreerd schijnt te kunnen worden, is het misschien mogelijk na het koken met zoutzuur direct uit te schudden met petroleumether. Hierdoor zouden de voordelen van beide methoden verenigd worden en de meeste nadelen vermeden.

2° Het zou het eenvoudigste zijn de gehele bewerking tot en met de extractie in één vat uit te voeren.

Wat het laatste betreft: als vat is waarschijnlijk het geschiktste een iets gewijzigde mojonnierbuis. Door het onderste deel bolvormig te maken is verhitten mogelijk. Zulke buizen worden wel gebruikt voor *RG* op melkpoeder („DIETERT-tubes"). *SBR* op kaas bleek hier zonder meer in uitgevoerd te kunnen worden; dit is nu ook algemeen gebruikelijk geworden. Voor toepassing van *SBR* in mojonnierbuizen op melk, was nogal wat onderzoek nodig. Het bleek

gewenst zeer sterk zoutzuur te gebruiken, gezien een grote overmaat HCl nodig is voor een snelle destructie en gezien het beperkte volume van de bol van de buis. Men wilde liefst buizen van de gebruikelijke afmeting nemen i.v.m. de bestaande toestellen voor *RG*. Het volume alcohol bleek ongeveer even groot te moeten zijn als het volume melk. Zo kwam men tot 8 ml melk, 6 ml HCl 36% en 8 ml alcohol.

Direct uitschudden van het destruaat met petroleumether was al toegepast door VISSER (1904) voor kaas, die bij de methode van BONDZYŃSKI Jr. (1894) petroleumether gebruikte i.pl.v. ether. Vooral bij melk bleek deze methode echter bezwaarlijk te zijn, door de hardnekkig standhoudende emulsie, die ontstaat bij het uitschudden. Dit was slechts te voorkomen door weer alcohol te gebruiken. Het een en ander resulteerde in een methode die gelijk is aan *SBR*, op het extractiemiddel na. Deze methode, hier zoutzuur-alcohol-petroleumether-methode genoemd *(ZAP)*, wordt in dit hoofdstuk voornamelijk beschouwd. (VAN BALEN WALTER (1929) deelde al mede, dat *SBR* op kaas ook goed voldeed als alleen petroleumether werd gebruikt, al moest dan wat vaker worden uitgeschud).

SBR heeft de volgende nadelen:

1° Er wordt veel niet-vet geëxtraheerd (zie 3.3.1.).
2° De ontmenging van beide fasen duurt zeer lang, n.l. 2...5 uur.
3° Het scheidingsvlak is niet op constante hoogte bij de verschillende extracties (zie 2.2.1., tabel 1).

ZAP leek in veel opzichten beter te zijn: de ontmengduur is zeer kort (enkele minuten) en het scheidingsniveau is constant. De methode gaf veel lagere vetgehalten dan *SBR*, zelfs iets lager dan *RG*. Dit laatste verschil werd voornamelijk toegeschreven aan afbraak van fosfatiden door het koken met zoutzuur.

3.1.2. *Moeilijkheden bij de extractie (ZAP)*

Inderdaad wordt bij *ZAP* veel minder niet-vet uitgeschud dan bij *SBR* (zie 3.3.), maar ook bleek dat 3 extracties veelal onvoldoende zijn om al het vet te verzamelen. Bij een zevental bepalingen (in 4-voud) van het vetgehalte van melk, werd ook nog het vet verzameld, dat met een 4e t/m 6e extractie werd uitgeschud. Deze waarden (gemiddelden) variëerden van 0,011 tot 0,031%, gemiddeld 0,023% vet. De verschillen tussen duplo's waren soms vrij groot. In tabel 6 worden enkele uitkomsten gegeven van proeven, waarbij de hoeveelheid vet in elke afzonderlijke extractie werd bepaald. Bij melk die verhit is geweest, is het extraheren nog veel onvolledíger (zie 3.5.1.).

TABEL 6. De per afzonderlijke extractie gewonnen hoeveelheid vet in procenten van het monster bij *ZAP*, toegepast op melk en ondermelk; gedurende 1 minuut met de hand schudden.

1e extractie	3,082	3,178	0,072
2e „	0,232	0,123	0,025
3e „	0,035	0,017	0,010
4e „	0,011	0,008	0,005
5e „	0,003	0,004	

Er werd vrij veel onderzoek gedaan betreffende dit lage rendement en de factoren die er op van invloed zijn. Zo werd o.m. nagegaan of de tijdsduur van het koken met zoutzuur een rol speelt. In tabel 7 wordt een voorbeeld van deze

TABEL 7. De gevonden vetgehalten van melk volgens *ZAP* in procenten, in afhankelijkheid van de duur van het koken met zoutzuur; gedurende 1 minuut met de hand schudden.

Kookduur	1e t/m 3e extr.	4e t/m 6e extr.	1e t/m 6e extr.
1 minuut	3,134	0,077	3,211
1½ „	3,221	0,015	3,236
2 „	3,226	0,011	3,237
3 „	3,232	0,011	3,243
4 „	3,231	0,011	3,242
6 „	3,241	0,007	3,248
8 „	3,230	0,021	3,251
10 „	2,974	0,270	3,244

proeven gegeven. Hieruit blijkt dat een zeer korte kookduur voldoende is. Bij het koken met zoutzuur begint de vloeistof spoedig te schuimen; dit houdt na 1....1,5 minuut op. Na ong. 8 minuten treedt weer schuimen op; indien dit voor de tweede maal schuimen plaats heeft gehad, is het rendement van de extractie altijd sterk verminderd. Tenslotte werd besloten een kookduur van 3 minuten aan te houden. Een langere duur geeft geen betere extractie en heeft het nadeel dat meer niet-vet wordt uitgeschud (zie 3.3.).

Een andere factor van belang is het destructiemiddel. Er was reeds eerder gebleken, dat een grote overmaat HCl nodig is; bij gebruik van een zelfde volume HCl 25% i.pl.v. 36%, vindt men vaak afwijkingen. (Frappant is ook het verschil dat tussen verschillende kwaliteiten HCl werd geconstateerd. In een bepaald geval bleek het gevonden vetgehalte van melk 0,050% lager, indien met chemisch zuiver i.pl.v. zoutzuur p.a. werd gekookt. De oorzaak van het verschil is niet verder nagegaan, maar steeds is de p.a.-kwaliteit gebruikt).

Bij de bovenvermelde proeven, werd na het toevoegen van petroleumether steeds gedurende 1 minuut geschud. Bij enkele bepalingen werd deze tijdsduur gevariëerd van 0,25 tot 2 minuten. Hierbij werd de 1e extractie afzonderlijk opgevangen en daarna de 2e + 3e. Er bleek een zekere tendens te zijn, dat langer schudden een betere extractie gaf, maar de duploverschillen waren veel groter dan de verschillen tussen de gemiddelden bij kort en langer schudden.

Bij zeer krachtig schudden ontstaat gemakkelijk een visceuse emulsie, zodat verder schudden dan weinig zin heeft: de beide fasen bewegen bijna niet meer t.o.v. elkaar. Het is daarom beter de buizen te wentelen in een verticaal vlak, zodat steeds de zware vloeistof door de lichte valt. Daartoe werd een met een motor aangedreven apparaatje gemaakt, zodat ook gemakkelijk proeven met een lange extractieduur konden worden gedaan. Het toestel bestaat uit een om

TABEL 8. De per afzonderlijke extractie gewonnen hoeveelheid vet in procenten van het monster, bij *ZAP* toegepast op melk, in afhankelijkheid van de duur van het schudden. De uitkomsten bij 1 minuut betreffen schudden met de hand, de overige rondwentelen van de buizen in een toestel.

	1 minuut	3 minuten	6 minuten	9 minuten
1e extractie	3,482	3,575	3,627	3,638
2e „	0,065	0,052	0,013	0,006
3e „	0,062	0,009	0,000	0,000
4e „	0,018	0,001	0,000	0,000
Totaal	3,627	3,637	3,640	3,644

een horizontale as draaibaar frame, met klemmen waarin de mojonnierbuizen passen. De draaisnelheid werd zo gekozen, dat bij elke omwenteling de bol van de buis juist leeg en weer vol kan lopen (20....25 t.p.m.). Met behulp van dit toestel zijn verscheidene proeven gedaan, waarbij elke extractie afzonderlijk werd opgevangen. In tabel 8 wordt een voorbeeld gegeven. Uit de gegevens werd geconcludeerd dat een schudduur van 5 minuten gewenst is. Bij melkprodukten die verhit zijn geweest treden extra moeilijkheden op (zie 3.5.1.).

Het geringe rendement van de extractie treedt niet op bij *SBR*.

3.1.3. *De oorzaak van de moeilijkheden bij de extractie (ZAP)*

Uit het bovenstaande is duidelijk dat niet het verdelingsquotiënt te laag is, maar dat het lang duurt voordat een evenwicht tussen beide fasen wordt bereikt. De „mengbaarheid" van de twee vloeistoffen is kleiner dan bij *SBR*, in die zin dat de ontmenging veel sneller gaat. De grensvlakspanning tussen de fasen, die werd bepaald met een „DU NOUY-tensiometer", bleek bij *ZAP* ong. 13 dyne/cm te zijn en bij *SBR* ong. 8. Maar ook bij *RG* is deze waarde toch ong. 12 dyne/cm, en hier is de extractie juist heel goed; dus het verschil in grensvlakspanning kan het verschil in extractiesnelheid niet verklaren.

Het is bekend, dat ook onder zeer ongunstige omstandigheden, d.w.z. geringe mengbaarheid en grote moleculen, bij vloeistof–vloeistof-extractie verrassend snel evenwicht wordt bereikt (CRAIG & CRAIG, 1950). De mengbaarheid van de fasen speelt in ons geval waarschijnlijk geen grote rol. Als zuiver botervet in water aan een bepaling wordt onderworpen, blijkt na enkele slagen schudden reeds al het vet in de petroleumether te zijn overgegaan.

Het overgrote deel van het vet is evenwel niet moleculair verdeeld in de zure vloeistof aanwezig. Het meeste drijft er boven op. Dit deel gaat in de petroleumether over, zodra men die slechts heeft toegevoegd. Een ander deel van het vet zal nog geëmulgeerd voorkomen, al betreft het wellicht niet de onveranderde vetbolletjes van de melk. Misschien treedt tijdens het koken met zoutzuur enige homogenisatie op.

Zoals gezegd, wordt zuiver botervet in water met 1 extractie geheel uitgeschud. Dit bleek ook zo, als i.pl.v. water een 5% lactose-oplossing werd genomen (bij koken van suikeroplossingen met zuren ontstaan harsachtige produkten). Werd evenwel botervet in een 3% caseïne-oplossing onderzocht, dan werd door 1 maal uitschudden b.v. 95% van het vet verzameld. Bij melk resulteert 1 extractie – dit alles betreft 1 minuut schudden – meestal in 90....93% „opbrengst".

Bij melk, zowel als bij de caseïne-oplossing, is na het schudden en ontmengen een klein tussenlaagje, vaak niet meer dan enkele „vlokjes", tussen de fasen te zien. Bij microscopisch onderzoek bleek dat deze „vlokjes" het voorkomen van een emulsie hebben. In het destruaat zelf zijn meestal ook enige kleine druppeltjes te zien. Naar aanleiding van deze waarnemingen werd 2 maal de volgende proef gedaan:

32 ml melk werd met 24 ml zoutzuur gekookt en na afkoelen overgebracht in een scheitrechter. 32 ml alcohol werd toegevoegd, waarna gedurende 1 minuut werd geschud met 160 ml petroleumether. Na ontmengen werd de vetoplossing afgeheveld, waarna met petroleumether werd nagespoeld, totdat deze vrij van vet was. De benedenste laag (22 ml) werd afgetapt in een mojonnierbuis; de bovenste laag, inclusief het tussenlaagje, in een andere. 2 maal uitschudden met petroleumether gaf uit de onderste laag 2,1 en 1,5 mg vet, uit de bovenste laag 38,0 en 77,5 mg.

Het meest waarschijnlijke is, dat bij het begin van het uitschudden een kleine hoeveelheid van een emulsie ontstaat, die vet vasthoudt en dit moeilijk afgeeft aan de petroleumether. Dit is in overeenstemming met de feiten dat een lange extractieduur nodig is, en dat overmatig krachtig schudden niet helpt. Het verband tussen de neiging tot schuimen van het destruaat en de slechte extractie, is ook een aanwijzing dat emulsievorming van invloed kan zijn. Waarschijnlijk zijn de afbraakprodukten van de eiwitten hierbij van belang.

Ook bij *SBR* ontstaat het emulsielaagje; hier houdt het echter niet hardnekkig vet vast, zodat uitschudden met de hand voldoende is. Ether onttrekt het vet dus gemakkelijker.

3.1.4. *Enkele pogingen ter verbetering*

Het lang durende uitschudden heeft bezwaar: tenzij men een geschikt toestel daarvoor heeft, is het extraheren onprettig werk. Daarom werd geprobeerd een modificatie te vinden, die dit langdurige schudden overbodig zou maken. Daarbij is o.m. het volgende overwogen:

Bij de reeds genoemde methode van VISSER (1904) wordt kaas na koken met zoutzuur en koelen, direct 1 maal uitgeschud met petroleumether. Gezien de redelijk juiste resultaten die deze methode zou geven, mag worden verondersteld dat het vet zeer overwegend in de petroleumether terecht komt. Anderzijds is zonder gebruik van alcohol de ontmengduur zeer lang, b.v. 12 uur. Bij enkele bepalingen werd na koken en koelen eerst geschud met petroleumether en werd daarna pas alcohol toegevoegd, waarna nog even werd gemengd. Dit gaf inderdaad een duidelijke verbetering, en ook de ontmenging ging redelijk snel, b.v. in 15 minuten. Maar anderzijds bleek de verbetering niet altijd afdoende en bovendien werd misschien meer niet-vet geëxtraheerd, zodat deze methode niet in gebruik werd genomen.

Verder werden verschillende andere hulpstoffen i.pl.v. ethanol geprobeerd, vnl. diverse alcoholen. Alleen bij gebruik van methanol was een verbetering te zien. Deze was evenwel niet doorslaggevend, vooral niet bij verhitte melk. *n*- en *iso*-propanol bleken minder goed te zijn dan ethanol, butanol is onvoldoende mengbaar met water. Daarom werd tenslotte besloten bij de oude methode te blijven.

3.1.5. *Voorschriften (SBR* en *ZAP)*

Het voor *SBR* gebruikte voorschrift is als volgt: 8 ml melk, ondermelk of karnemelk, 1....2 ml room, 2....4 ml gecondenseerde melk, of 1 g melkpoeder worden nauwkeurig in de bol van een mojonnierbuis gewogen. Eventueel wordt met water aangevuld tot 8 ml, waarna 8 ml HCl 36% p.a. wordt toegevoegd. Het mengsel wordt op een kleine vlam aan de kook gebracht, en daarna nog 3 minuten zacht gekookt. Na koelen onder de kraan wordt 8 ml ethanol 96% toegevoegd, gemengd en weer gekoeld. De overige behandeling is als bij *RG* (zie 2.2.5.); alleen is de ontmengduur hier veel langer. Men dient vóór het centrifugeren te laten staan tot de bovenste laag helder is geworden. Dit duurt i.h.a. 2....5 uur.

Het begin van de uitvoering volgens *ZAP* is als bij *SBR*. Voor het extraheren gebruikt men 40 ml petroleumether (kooktraject 40....60 °C), waarbij gedurende 5 minuten wordt geschud bij rauwe of laag gepasteuriseerde melk e.d., ge-

durende 10 minuten bij hoog verhitte produkten. Deze extractie wordt nog 2 maal herhaald. De overige uitvoering is weer als bij *RG*. De ontmenging vindt plaats in enkele minuten.

De algemene voorzorgen bij afdampen, drogen, wegen etc. zijn gelijk aan die bij *RG*. Bijzonderheden staan in 2.2. Alleen bij het drogen van het vet zijn nog enige punten van belang (zie 3.3. en 3.4.).

3.2. Vet en vetachtige stoffen (*ZAP* en *SBR*)

3.2.1. *Inleiding*

In 3.1.2. werd enige aandacht besteed aan de extractie van vet + vetachtige stoffen, als een geheel beschouwd. Hier zal nader worden ingegaan op het gedrag van de verschillende componenten voor wat betreft verdelingsquotiënt en chemische veranderingen. Deze bestanddelen zijn: botervet, cholesterolen, vrije vetzuren en fosfatiden. Mulder (1942) heeft er op gewezen, dat de eerste beide ook bij methoden met zure destructie geheel en onveranderd worden geëxtraheerd.

Zuiver, gedroogd botervet werd zowel met *SBR* als met *ZAP* voor 99,98% teruggevonden. Het zeer kleine verlies kon geheel toegeschreven worden aan aanwezige vrije vetzuren (zie 3.2.2.). Ook als botervet aan ondermelk werd toegevoegd, werd het met beide methoden geheel teruggevonden. Dit wil evenwel niet zeggen, dat het „botervet" zoals het in melk voorkomt, geheel wordt geëxtraheerd, gezien het dan in geheel andere vorm aanwezig is.

Bij modelproeven bleek cholesterol geheel geëxtraheerd te worden, ook met *ZAP*, ondanks de geringe oplosbaarheid ervan in petroleumether. Het werd niet aangetast door koken met zoutzuur. Er werd niet nagegaan of de aan cholesterol veresterde zuren worden afgesplitst. Gezien het zeer lage gehalte aan veresterd cholesterol in melk (ong. 0,002%: Mulder & Zuidhof, 1958) en bovendien de waarschijnlijkheid dat van de eventueel afgesplitste zuren het merendeel nog uitgeschud wordt, is deze kwestie niet van belang voor het gevonden vetgehalte van melk e.d.

3.2.2. *Vrije vetzuren*

Over het gedrag van vrije vetzuren bij *SBR* en soortgelijke methoden is nog weinig gepubliceerd. Uit de theoretische beschouwing in 2.3.2. is duidelijk, dat met deze „zure" methoden een hogere opbrengst verwacht kan worden dan met *RG*.

Daar over de oplosbaarheid van hogere vetzuren in petroleumether in de literatuur geen gegevens werden gevonden, werd deze voor enkele zuren bepaald. Gevonden werd als oplosbaarheid per 100 ml oplossing bij 20°C:

myristinezuur:	8,4 g
palmitinezuur:	3,22 g
stearinezuur:	1,22 g

Deze oplosbaarheden zijn vele malen groter dan die in water en ruimschoots voldoende voor de extractie van de te verwachten hoeveelheden vrije vetzuren bij *ZAP*.

Een volgende vraag is, of er tijdens het koken met zoutzuur vetzuren door vervluchtigen verdwijnen. Dit bleek in het uiterste geval 0,002 meq. per bepaling

te kunnen zijn. Daar het vrijwel alleen lagere vetzuren betreft, die toch bij de bepaling overwegend verloren gaan, kan het effect geheel verwaarloosd worden.

Van de voornaamste 9 vetzuren uit botervet werd titrimetrisch bepaald, welk percentage met *ZAP* wordt geëxtraheerd, benevens het deel dat verloren gaat bij afdampen en drogen. Hierbij werd niet meer dan 0,2 meq. vetzuur per bepaling genomen. Daar dit toch nog vrij veel is t.o.v. de hoeveelheden die b.v. in ranzige melk voorkomen, werd voor één der zuren (oliezuur) nog nagegaan of het verdelingsquotiënt afhankelijk is van de concentratie. Dit bleek niet het geval te zijn, wat in overeenstemming is met de waarnemingen van ARCHIBALD (1932) over vloeistof–vloeistof-extractie van lagere vetzuren.

In tabel 9 zijn de gemiddelden van de waarnemingen (2 in 2-voud) weergegeven. Tevens wordt hier een berekening van de verliezen aan vrije vetzuren bij *ZAP* op gebaseerd, uitgaande van een ongeveer gemiddelde samenstelling van botervet. Het doel is hierbij meer een indruk te krijgen van de orde van grootte, dan tot een nauwkeurig bepaald resultaat te komen. In aanmerking is genomen de waarneming van STADHOUDERS (1956), dat het patroon van vrije vetzuren, ontstaan bij lipolyse van melkvet, ongeveer gelijk is aan dat van het substraat.

TABEL 9. Het verlies van vrije vetzuren bij de extractie en bij het afdampen en drogen volgens *ZAP*. Kolom (6) is ook van toepassing op *SBR* en *RG*.

	Samenstelling		Extractie			Afdampen en drogen		
Vetzuur	mol-% (1)	gew.-% (2)	verlies in % (3)	mol-% over (4)	gew.-% over (5)	verlies in % (6)	mol-% over (7)	gew.-% over (8)
Boterzuur	8	3,0	50	4,0	1,5	100	0,0	0,0
Capronzuur	3	1,4	30	2,1	1,0	70	0,6	0,3
Caprylzuur	2	1,2	20	1,6	1,0	25	1,2	0,7
Caprinezuur	3	2,1	10	2,7	1,9	10	2,4	1,7
Laurinezuur	4	3,3	5	3,8	3,1	5	3,6	3,0
Myristinezuur	9	8,5	0	9,0	8,5	0	9,0	8,5
Palmitinezuur	25	26,6	0	25,0	26,6	0	25,0	26,6
Stearinezuur	8	9,4	0	8,0	9,5	0	8,0	9,4
Oliezuur	38*)	44,5*)	10	34,2	40,0	0	34,2	40,0
Totaal	100	100		90,4	93,0		84,0	90,2

* Inclusief andere onverzadigde vetzuren.

Uit de tabel blijkt dus, dat ongeveer een tiende deel van de aanwezige vrije vetzuren verloren gaat. Ter controle werden nog enkele waarnemingen gedaan met een hydrolysaat van botervet. Nagegaan werd of het uit tabel 9 te berekenen verlies bij destilleren en drogen klopte: totaal (7) = 93% van totaal (4). Een bepaalde hoeveelheid hydrolysaat van botervet gaf na extractie volgens *ZAP* 0,0342 meq. vetzuren, na tevens afdampen en drogen 0,0319 meq., dus juist 93% van eerstgenoemde waarde.

Bij bovenstaande proeven (ook die van tabel 9) is steeds gezorgd, dat ong. 0,4 g neutraal vet aanwezig was tijdens afdampen en drogen. Nagegaan werd hoeveel groter het verlies is, wanneer dit wordt nagelaten. Bij toepassen van *ZAP* op een bepaalde hoeveelheid hydrolysaat van botervet, werd 9,5 resp. 10,0 mg „vet" gevonden, zónder resp. mèt een overmaat vet tijdens afdampen en

dogen; een andere proef gaf 13,4 resp. 13,9 mg. Het verschil is dus niet groot.

Tenslotte werd uit enkele proeven geconstateerd, dat het, voor wat betreft de vrije vetzuren, geen verschil maakt of *SBR* dan wel *ZAP* wordt toegepast.

Deze uitkomsten zijn althans kwalitatief in overeenstemming met die van WILLART c.s. (1959), hoewel de proefomstandigheden verschillend waren.

In het bovenstaande werd geconcludeerd, dat van de in de melk e.d. aanwezige vrije vetzuren ongeveer 10% verloren gaat. Mocht tijdens de bepaling vet gehydrolyseerd worden, dan gaat van dat afgebroken deel ook wat verloren, en wellicht meer dan 10%. Gaat de hydrolyse n.l. door tot de vorming van glycerol, dan zal dit zeker niet worden geëxtraheerd. Maximaal zou 15% kunnen achterblijven, als tevens rekening gehouden wordt met de gewichtstoeneming door hydrolysatiewater. FLORENTIN (1939) beweerde dat *SBR* ongeschikt is, wegens hydrolyse van vet t.g.v. het koken met zoutzuur. SWAVING (1939) bestreed dit en stelde dat deze hydrolyse te verwaarlozen is. Geen van beiden publiceerden evenwel overtuigende proefuitkomsten. WILLART c.s. (1959) concludeerden dat de hydrolyse zeer gering is, tenzij vóór de analyse al aanzienlijke vetsplitsing plaats heeft gehad door enzymwerking. Dit zou te wijten zijn aan de dan aanwezige mono- en diglyceriden, die, in tegenstelling tot zuivere triglyceriden, wel gehydrolyseerd zouden worden.

Inderdaad is door JENSEN & MORGAN (1959) in ranzige melk de aanwezigheid van monoglyceriden aangetoond (ongeveer een derde van de aangetaste vetmoleculen levert een monoglyceride) en die van diglyceriden waarschijnlijk gemaakt. In verse melk vonden zij nagenoeg geen monoglyceriden. WILLART c.s. geven voor hydrolyse in 3,5 n HCl bij 100 °C gedurende 10 minuten de volgende uitkomsten:

zuiver botervet	:	geen hydrolyse
distearine	:	15% hydrolyse
enkele monoglyceriden	:	56....61% hydrolyse.

Enkele door ons genomen proeven wezen in dezelfde richting. Zo bleek b.v. dat door 3 minuten koken van 0,4 g botervet in 10 ml 11,5 n HCl het zuurgetal toenam van 2,4 tot 3,5 meq./100 g vet; bij kaasvet, met een veel hoger zuurgetal, was ook de toeneming groter: van 12,5 tot 15,1. Ook werd een technisch preparaat van monostearine aan enige vetgehaltebepalingen onderworpen. De uitkomsten waren:

RG	:	95% „vet"
ZAP, zonder koken	:	95% „
ZAP, normaal	:	90% „

Er is dus inderdaad een afneming, waarschijnlijk door hydrolyse van ong. een derde van het monostearine.

Ook werden enkele proeven genomen met melk, die het bovenstaande leken te bevestigen. Een exact kwantitatieve interpretatie hiervan is echter niet mogelijk, gezien de volgende moeilijkheden:

1° De aanwezige fosfatiden worden wèl grotendeels gesplitst (zie 3.2.3) en geven dus o.m. vrije vetzuren. WILLART c.s. nemen dit in 't geheel niet in beschouwing. Toch geeft dit zeker aanleiding tot extractie van meer dan 0,010 meq. vetzuren per 10 ml melk, zodat de vraag rijst hoe het kan, dat zij dit niet hebben gevonden.

2° Behalve vetzuren worden ook andere zuren geëxtraheerd – o.m. levuline-

zuur –, bij *SBR* zelfs aanzienlijke hoeveelheden, toenemend met langere kookduur (zie 3.3.).

Anderzijds hebben de proeven met botervet in water e.d. ook een mogelijk bezwaar, daar het vet in melk in een geheel andere vorm voorkomt. Hoewel dus in een produkt dat aan lipasewerking onderhevig is geweest, een verder gaande afsplitsing van vetzuren zal plaats hebben door het koken met zoutzuur, is het niet gemakkelijk een uitspraak te doen over de reële daling in het gevonden vetgehalte die dit teweeg zal brengen.

3.2.3. *Fosfatiden*

MULDER (1942) heeft er op gewezen, dat bij „zure" vetgehaltebepalingen de fosfatiden gedeeltelijk gehydrolyseerd worden. Hierover zijn enkele proeven gedaan. De gebruikte preparaten zijn beschreven in 2.3.3., evenals de methode van P-bepaling. N werd volgens een micro-kjeldahl werkwijze bepaald.

Eerst werd *ZAP* toegepast op eifosfatiden. Uitgegaan werd van een suspensie in water, die per 8 ml ong. 50 mg fosfatiden bevatte. Zo werd b.v. gevonden: bij een kookduur met HCl van 0 minuten – d.w.z. juist aan de kook brengen – was het „vetgehalte" 72%; 13,5% van het P werd teruggevonden en 20,2% van de N. Na 5 minuten koken waren deze uitkomsten 65% „vet", geen P en 7,4% van de N; het zuurgetal van het geëxtraheerde materiaal werd bepaald: omgerekend op stearinezuur kwam het overeen met 70% van het vet. Enkele andere proeven gaven nagenoeg dezelfde uitkomsten.

Het is dus duidelijk, dat de fosfatiden worden afgebroken. Bekend is o.m. dat de N-houdende groepen, zoals choline, gemakkelijk afgesplitst worden (DESNUELLE, 1952). Het bleek dat op elk tijdstip gedurende het koken met zoutzuur iets meer eq. N waren afgesplitst dan eq. P. Het P blijft waarschijnlijk gebonden aan glycerol. In het destruaat was n.l. geen anorganisch gebonden P aan te tonen. Glycerol-fosforzuur is zeer bestand tegen zure hydrolyse (MALENGREAU & PRIGENT, 1911). Er worden dus vetzuren van het molecuul afgesplitst, mogelijk pas nadat de basische groep vrij is gemaakt. Dit alles gaat wellicht niet voor alle fosfatiden op.

De vrijgekomen vetzuren zullen grotendeels worden geëxtraheerd (zie 3.2.2.). Volgens MULDER & HOOGENDIJK (1955) worden nog niet afgebroken fosfatiden geheel mee bepaald. Tevens vonden zij, dat er geen verschil is tussen *ZAP* en *SBR* voor wat betreft de fosfatiden. FALKENHAHN (1957) onderzocht mengsels van botervet en „eilecithine" volgens de Britse Standaardmethode ter bepaling van het vetgehalte van melkpoeder, welke methode vrijwel gelijk is aan *SBR*. Hij vond gemiddeld 63,5% van de fosfatiden terug, hetgeen dus goed in overeenstemming is met onze waarnemingen.

Vervolgens werden enige proeven gedaan met melkfosfatiden. De samenstelling hiervan is ongeveer: 30% lecithine, 45% cefalinen, 25% sfingomyeline en een weinig acetaalfosfatiden (RHODES & LEA, 1958; KOOPS, 1958). De beide eerste groepen, die zeer verwant van structuur zijn, worden betrekkelijk gemakkelijk gehydrolyseerd met HCl, sfingomyeline veel moeilijker. Op 4 verschillende preparaten werd *ZAP* uitgevoerd; het gemiddeld „vetgehalte" was 66,3; 65,5; 71,4 en 66,0%. Van het 2e en 3e preparaat werd bepaald hoeveel P in het extract terecht kwam (3 minuten koken); dit was 16 resp. 30%, dus meer dan bij de eifosfatiden. 1 maal werd het zuurgetal van het „vet" bepaald: omgerekend op stearinezuur kwam dit overeen met 83% van het geëxtraheerde.

Het maakte geen verschil of de fosfatiden in water, dan wel in ondermelk werden gesuspendeerd.

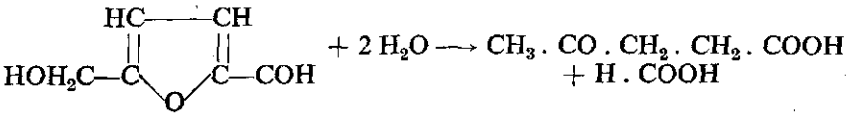
Er kan dus worden geconcludeerd, dat met *ZAP*, zowel als met *SBR*, ongeveer een derde van het gewicht van de aanwezige fosfatiden verloren gaat.

3.3. Extractie van niet vetachtige stoffen

3.3.1. *SBR*

Dat bij *SBR* en verwante methoden veel niet vetachtige stoffen worden geëxtraheerd, is wel bekend. Ook over de oorzaak hiervan verkeert men reeds lang niet geheel in het ongewisse, maar merkwaardigerwijze is weinig van deze kennis gepubliceerd. Men wist vroeger al wel, dat afbraakprodukten van lactose een rol spelen o.m. hydroxymethylfurfural, dat vrij goed in ether oplosbaar is. Ook werd reeds in 1908 door De Graaff in dit verband levulinezuur genoemd. Mulder & Hoogendijk (1956) deelden mede, dat vooral afbraakprodukten van lactose het vetgehalte volgens *SBR* verhogen.

Het is algemeen bekend, dat uit hexosen door verhitten in zuur milieu ω-hydroxymethylfurfural ontstaat. Ook dihexosen vertonen dit verschijnsel, na voorafgaande hydrolyse. Daarbij ontstaan ook andere furanaldehyden, zowel als polymeren ervan, met een vaak harsachtig karakter. Door koken met minerale zuren, wordt hydroxymethylfurfural verder omgezet tot levulinezuur:



Ook levulinezuur is oplosbaar in ether.

Ook Sandberg (1959) is hier nader op ingegaan. Hij toonde hydroxymethylfurfural en levulinezuur in het *SBR*-extract aan. Tevens bleek dat saccharose in veel sterkere mate aanleiding geeft tot bovengenoemde stoffen dan lactose. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de fructoserest.

De vraag is nu hoeveel niet-vet wordt uitgeschud, waarbij niet bij voorbaat aangenomen mag worden, dat dit alleen uit lactose ontstaan schijnvet is. Daartoe werd de reeds 3 maal geëxtraheerde vloeistof nogmaals 3 maal volgens *SBR* uitgetrokken en werd dit 2e extract drooggedampt en gewogen. Omdat de betreffende bestanddelen enigszins vluchtig zijn, werd steeds een gewogen hoeveelheid vet toegevoegd, om de omstandigheden zoveel mogelijk gelijk te houden aan die van een gewone bepaling. De gevonden waarden bij 10 proeven (elk in 2- of 4-voud) variëerden van 0,043 tot 0,063 %, gemiddeld 0,053 %. Indien het destruaat 3 maal met petroleumether werd uitgeschud alvorens de herhaalde extractie volgens *SBR* werd toegepast, werd meer niet-vet gevonden, n.l. gemiddeld 0,070 % (6 waarnemingen in 2-voud). Op dit verschil wordt in 3.3.3. nader ingegaan.

Indien men het niet-vet afzonderlijk opvangt, blijkt het er bruin en stroperig uit te zien. Het is voor een deel oplosbaar in petroleumether; waarschijnlijk is dit voornamelijk levulinezuur. Bij de gewone vetgehaltebepalingen volgens *SBR* wordt het gewicht van het lege kolfje achteraf bepaald, na uitspoelen van het vet met petroleumether. Het niet-vet lost dan evenwel bijna geheel op, als althans niet te weinig echt vet aanwezig is. Voegt men een afgezonderde hoeveel-

heid niet-vet toe aan het vrijwel kleurloze *ZAP*-vet, dan krijgt dit het geelbruine uiterlijk van *SBR*-vet, en is het mengsel weer geheel oplosbaar in petroleumether. Als b.v. melk volgens *SBR* wordt onderzocht, dan blijft na het uitspoelen van het vetkolfje slechts ong. 0,005% niet-vet achter. Bij een vetarm produkt als centrifugemelk kan dit veel meer zijn. Bij de bovenvermelde proeven met voortgezette extractie, werd niet achteraf uitgespoeld, maar werd het lege kolfje vooraf gewogen, zodat in de uitkomsten dus ook de kleine „onoplosbare rest" is begrepen.

Op de met voortgezette extractie verkregen stof werden enkele kwalitatieve reacties gedaan, om na te gaan of het inderdaad niet-vet betrof. Dit waren reacties op organisch P (fosfatiden), op hogere vetzuren en op vet (vetzuren na verzepen) (FEIGL, 1956). De uitkomsten waren negatief; alleen was een spoortje vrije vetzuren aanwezig.

Van in de oplossing aanwezig levulinezuur, bleek onder proefomstandigheden ongeveer 6% te worden uitgeschud. Enkele malen gaf een 4,8% lactose-oplossing volgens *SBR* een „vetgehalte" van gemiddeld 0,030%. Tevens werd hierbij nagegaan, wat de invloed is van de duur van het koken met zoutzuur. Zowel de gewichtshoeveelheid (na afdampen en drogen) als de toeneming in zuurtegraad van het extract werden bepaald. Het laatstgenoemde gegeven werd omgerekend tot gewichtsprocenten levulinezuur. Figuur 6 geeft de gemiddelde uitkomsten. Uit deze gegevens wordt waarschijnlijk dat de verdamping van levulinezuur belangrijker is, wanneer er meer van aanwezig is. (In de vetkolfjes was een bekende hoeveelheid vet gebracht). Tevens lijkt de conclusie gewettigd, dat het niet-vet hier voor het grootste deel uit levulinezuur bestaat.

Als het extract buiten aanwezigheid van vet wordt drooggedampt en gedroogd, dan verdampt het merendeel van het materiaal: een lactose-oplossing gaf zo een „vetgehalte" van 0,010%, tegen 0,028% als vet aanwezig was. Droogproeven met zuiver levulinezuur geven ook aanzienlijke verdamping te zien.

Uit vetvrij gemaakte caseïne, wordt met *SBR* niets, of althans uiterst weinig geëxtraheerd. Ook SANDBERG (1959) vermeldt dit. Het volgende experiment werd 2 maal uitgevoerd: Een caseïnesuspensie (3%), een lactose-oplossing (4,8%) en een lactoseoplossing waarin weer caseïne was gesuspendeerd, werden aan een *SBR*-bepaling onderworpen. De gemiddelde „vetgehalten" waren:

caseïnesuspensie	0,000 en 0,000%
lactoseoplossing	0,030 en 0,027%
lactose + caseïne	0,020 en 0,019%.

Hieruit blijkt dus, dat in aanwezigheid van caseïne bij het koken met zout-

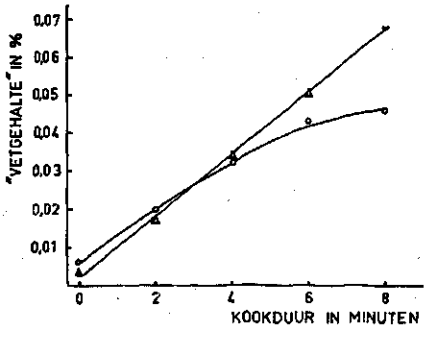


FIG. 6.
„Vetgehalte" volgens *SBR* van een 4,8% lactose-oplossing, bij verschillend lange kookduur met zoutzuur.
o Gewichtsanalytisch
△ Berekend als levulinezuur uit titraties
Voor de verklaring: zie tekst.

zuur, minder afbraakprodukten van lactose worden uitgeschud. Merkwaardigerwijze vonden MULDER & HOOGENDIJK (1956) juist het tegengestelde. Tevens blijkt, dat de wijze waarop SANDBERG uit modelproeven met suikeroplossingen een correctie op het vetgehalte volgens *SBR* berekende, niet verantwoord is. In het volgende zal dit bezwaar nog duidelijker blijken.

Gezien de extraheerbaarheid van levulinezuur lijkt het niet onwaarschijnlijk, dat ook de in melk aanwezige organische zuren voor een deel worden uitgeschud. Het belangrijkste hiervan is citroenzuur, waarvan gemiddeld ong. 0,16% in melk voorkomt. Ongeveer 5% van het aanwezige citroenzuur bleek bij modelproeven te worden uitgeschud. Dit geeft dus aanleiding tot een verhoging van het gevonden vetgehalte met 0,007....0,008%.

Andere zuren in melk zijn: lagere vetzuren, melkzuur, pyrodruivenzuur e.d., volgens MORR c.s. (1957) ong. 0,4 meq./100 ml, hetgeen globaal overeenkomt met bijna 0,02 gewichts-%. Deze groep zuren bleek aanleiding te geven tot een verhoging van het vetgehalte met 0,002....0,003%.

De organische zuren samen geven dus aanleiding tot ong. 0,01% niet-vet, lactose waarschijnlijk tot 0,02%, al is de „storende" invloed van caseïne nog niet geheel duidelijk; dus in totaal 0,03%. Dit is beduidend minder dan gevonden werd met de proeven met voortgezette extractie. Er werden echter verder geen pogingen gedaan om alle bestanddelen van melk afzonderlijk en in combinatie te onderzoeken. In plaats daarvan werd enkele malen een „vetvrije kunstmelk" gebruikt (zie voor de bereiding 2.5.1.). Deze kunstmelk bevatte, onderzocht volgens *RG*, inderdaad nagenoeg geen vet. Met *SBR* bleek enkele malen een „vetgehalte" van 0,067%, of van 0,045% indien geen vet in de kolfjes was gebracht. Deze uitkomst is beter in overeenstemming met die van de voortgezette extractie. Toch zal blijken (in 3.3.3.) dat ook hier waarschijnlijk een onjuiste waarde werd verkregen.

WENGER (1915) heeft er al op gewezen, dat melkzuur bij vetgehaltebepalingen kan worden geëxtraheerd. Sommige melkprodukten hebben natuurlijk een veel groter melkzuurgehalte, dan de 0,006% die ongeveer in verse melk voorkomt (MORR c.s., 1957). Daarom werd hier nog wat nader onderzoek naar gedaan. Aanvankelijk leken de gegevens slecht met elkaar te kloppen. De uitkomsten bleken evenwel niet eenvoudig met de melkzuurconcentratie samen te hangen. Figuur 7 geeft de resultaten van 2 proeven, waarbij melkzuuroplossingen van verschillende sterkte, als melk volgens *SBR* werden onderzocht. Het eigenaardige verloop van de curve is niet verder bestudeerd. Vele factoren, zoals b.v. lactidevorming, kunnen hier van invloed zijn. In elk geval zal bij produkten als zure karnemelk of yoghurt nog een extra verhoging van het gevonden

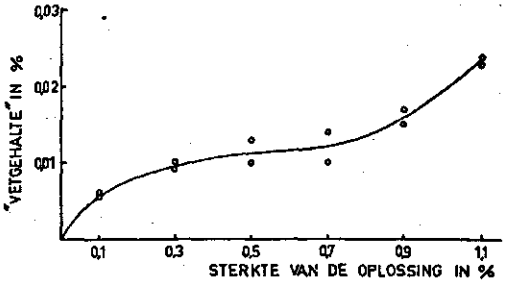


FIG. 7.
„Vetgehalte" volgens *SBR* van melkzuuroplossingen van verschillende sterkte.

vetgehalte van 0,01....0,02% optreden. Dit werd ook gecontroleerd en bevestigd, door melk met en zonder melkzuur te analyseren, waarbij bacteriële zuring en direct toevoegen van melkzuur werden toegepast.

3.3.2. *ZAP*

SANDBERG (1959) geeft aan, dat hydroxymethylfurfural niet, maar levulinezuur wel oplosbaar is in petroleumether: 67 mg/100 ml bij 20°C. Door ons werd 53 mg/100 ml gevonden, dus dezelfde orde van grootte. Van in de zure vloeistof aanwezig levulinezuur bleek dan ook bij *ZAP* 1....1,5% te worden uitgeschud. Men kan dus verwachten, dat een beetje niet-vet geëxtraheerd zal worden, mogelijk overwegend levulinezuur.

De hoeveelheid niet-vet werd globaal bepaald, d.m.v. voortgezette extractie, dus door een 4e t/m 6e extractie met petroleumether te verzamelen. 8 waarnemingen gaven 0,006....0,010% niet-vet, gemiddeld 0,008%. Ook werd de reeds vermelde „vetvrije kunstmelk" een zestal malen onderzocht; het „vetgehalte" was 0,007....0,009, gemiddeld 0,008%.

Verdamping speelt weer een rol: Is geen vet aanwezig tijdens afdampen en drogen, dan blijft bijna geen weegbare rest achter, i.h.a. slechts 0,001%. (Dit verklaart ook de uitkomsten van 0,000% in tabel 8). Er is echter maar weinig vet nodig om de verdamping te belemmeren. Zo werd het vetgehalte van centrifugemelk gemiddeld slechts 0,002% hoger gevonden, als vooraf 0,3 g vet in de kolfjes werd gebracht (6 proeven). Zoals verwacht kon worden, is het niet-vet vrijwel geheel oplosbaar in petroleumether; slechts ong. 0,001% niet. Dit laatste is waarschijnlijk de droge stof uit miniscuul kleine druppeltjes van de waterfase, die ondanks alle voorzorgen toch meekomen.

Om te controleren of het niet-vet inderdaad levulinezuur bevat, en tevens om iets te weten te komen over mogelijke andere bestanddelen, werd het volgende experiment gedaan[1]): Een grote hoeveelheid centrifugemelk werd behandeld volgens *ZAP*. Het 1e extract werd weggedaan om het meeste vet kwijt te raken. Het 2e t/m 4e extract werd ingedampt tot klein volume. (Een klein deel hiervan werd uitgeschud met weinig water. Hierin werd gereageerd op furanaldehyden met barbituurzuur en aniline (AKALSONI, 1927); de reactie was sterk positief). Het concentraat werd geschud met een verzadigde oplossing van 2,4-dinitrofenylhydrazine in 2 n HCl, waarna de petroleumetherlaag werd verdampt. De gevormde dinitrofenylhydrazonen (D.N.P.'s) werden geëxtraheerd met benzeen. Het benzeenextract werd weer uitgeschud met weinig 2% $NaHCO_3$ in water. Na aanzuren ontstond hierin een geel neerslag, dat werd afgezonderd en omgekristalliseerd uit benzeen. Door bepaling van het smeltpunt (209....210°C, KOFLER-bank) en het mengsmeltpunt met de bekende stof, werd het geïdentificeerd als het D.N.P. van levulinezuur.

Het benzeenextract werd drooggedampt, en onderzocht met de methode van VAN DUIN (1961) d.m.v. adsorptiechromatografie over een $ZnCO_3$-zuil, met als eluens petroleumether-benzeen-pyridine 8:1:1. Op de zuil verschenen ruim 20 banden. De eerste, zeer grote band werd geëlueerd. De homogeniteit werd gecontroleerd door verdelingschromatografie over silicagel (zie VAN DUIN, 1961). Na verdampen van het eluens werd de stof omgekristalliseerd uit pe-

[1] Het „Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek" te Ede stelde mij gastvrij in de gelegenheid een deel van dit experiment aldaar uit te voeren. Dr. H. VAN DUIN gaf mij hierbij waardevolle hulp en adviezen.

troleumether. Ze bleek identiek met het D.N.P. van levulinezure ethylester: smeltpunt 100 °C, λ_{max} 362 mμ (in chloroform – 1 % ethanol).

Van de overige banden op de $ZnCO_3$-zuil waren alleen de 2e en 3e band mogelijk van kwantitatief belang. De indruk werd gewekt dat dit *syn-* en *anti*-isomeer van hetzelfde D.N.P. waren, temeer toen na elueren, droogdampen en omkristalliseren het smeltpunt 160 resp. 208 °C bleek te zijn, en λ_{max} 385 resp. 390 mμ (in chloroform – 1 % ethanol). Het vermoeden dat dit de D.N.P.'s van hydroxymethylfurfural zouden zijn, werd niet bewaarheid. Van *syn-* en *anti*-isomeer hiervan bleek n.l. het smeltpunt 215 resp. 235 °C te zijn en λ_{max} 383 resp. 386....387 mμ. De onbekende stof werd daarna niet verder onderzocht. De overeenkomst in oplosbaarheid, gedrag op de zuil en U.V.-spectrum van de D.N.P.'s suggereert evenwel chemische verwantschap met hydroxymethylfurfural. Het is dus wellicht een ander furanaldehyde.

Ter completering werd een blanco proef gedaan (water i.pl.v. centrifugemelk), die geen D.N.P.'s gaf en een proef met een 5 % lactose-oplossing. Het beeld van de zuil bleek vrijwel identiek met dat van de eigenlijke proef. Ook hier werden de D.N.P.'s van levulinezuur en de ethylester ervan geïdentificeerd.

Naar aanleiding van dit experiment kan geconcludeerd worden, dat inderdaad levulinezuur wordt geëxtraheerd, met daarbij nog een groot aantal andere carbonylverbindingen, evenwel in zeer kleine hoeveelheden. Alleen de hoeveelheid ethyllevulinaat is beduidend, zelfs groter dan bij levulinezuur. Het is echter zeer vluchtig. Kleine hoeveelheden verdampen vrijwel geheel in de droogstoof, ook in aanwezigheid van vet. Pas als meer dan 5 mg van de ester bij 0,3 g vet wordt gebracht, blijft iets achter na een uur drogen bij 103....104 °C. Dat zo'n grote hoeveelheid zou worden uitgeschud is niet aan te nemen. Het ethyllevulinaat is duidelijk te ruiken tijdens het drogen van *SBR-* of *ZAP*-vet.

Het is mogelijk, dat ook andere esters worden uitgeschud, zoals b.v. esters van vetzuren. Ook ethyllactaat zou van belang zijn, ware dit niet nog vluchtiger dan ethyllevulinaat. Met alle esters van laag moleculaire zuren zal dit zo zijn. Ook esters van citroenzuur komen waarschijnlijk niet in aanmerking, daar monoësters nog zeer hydrofiel zijn en di- of triësters wel nauwelijks gevormd zullen worden. Esters van aminozuren zijn basen, die dus niet geëxtraheerd zullen worden uit een sterk zure vloeistof.

Zou er sprake zijn van een langzame estervorming, dan wordt mogelijk meer uitgeschud indien het mengsel van destruaat en alcohol lang zou staan voor de extractie. Inderdaad werd geconstateerd, dat 24 uur wachten een ong. 0,005 % hoger vetgehalte gaf. Hiervoor zijn echter ook vele andere verklaringen denkbaar.

Verder kan men verwachten, dat het evenwicht:

$$\text{zuur} + \text{ethanol} \rightleftarrows \text{ester} + \text{water}$$

onder proefomstandigheden ver naar links ligt. Dan zou door een steeds wegnemen van de esters, d.w.z. een lange extractieduur, meer gevormd en uitgeschud worden. Inderdaad bleek het gevonden vetgehalte met ong. 0,003 % per uur langere extractie toe te nemen. Ook hier zijn weer tal van andere verklaringen mogelijk. Overigens zijn deze verschijnselen niet van praktisch belang, gezien de nog geringe verschillen bij extreme omstandigheden.

Enkele malen werd een bepaling uitgevoerd op een 4,8 % lactoseoplossing, met als resultaat een „vetgehalte" van 0,006....0,008 %. Het is dus aannemelijk, dat nagenoeg al het niet-vet afkomstig is van lactose, en wel voornamelijk als

levulinezuur. Bij *SBR* bleek, dat door langer koken met zoutzuur meer niet-vet wordt geëxtraheerd, en wel in het bijzonder levulinezuur. Daarom werden ook met *ZAP* enkele zulke proeven gedaan, waarbij het verschijnsel ook optrad. Bij een bepaling op vetvrije kunstmelk b.v., bleek bij 1 minuut koken een „vetgehalte" van 0,001%, bij 3 minuten 0,009% en bij 8 minuten 0,016%. Het is dus ongewenst een lange kookduur aan te houden.

Ook werd nagegaan of, evenals bij *SBR*, melkzuur wordt uitgeschud. 1% melkzuur toegevoegd aan melk, bleek het gevonden vetgehalte met 0,002.... 0,003% te verhogen, dus een gering effect.

Evenals bij *RG*, treedt bij *SBR* het verschijnsel op, dat een groter vetgehalte wordt gevonden bij een kleiner monster (MULDER & HOOGENDIJK, 1955). Nu werd nagegaan of dit ook voor *ZAP* geldt. Daartoe werden enkele proeven gedaan met melk en room, zoals voor *RG* beschreven in 2.5.3. Inderdaad trad het verschijnsel op, maar in geringere mate: $x = 0{,}3....0{,}6$ mg. Het bleek evenwel ook op te gaan voor lactoseoplossingen, waar $x = 0{,}4....0{,}5$ mg werd gevonden. Het verschijnsel is hier dus veel gemakkelijker te verklaren dan bij *RG*. Het bezwaar voor de bepaling van het vetgehalte van room is dus bij *ZAP* analoog aan dat bij *RG*, al is het vrijwel verwaarloosbaar.

Bovenstaande uitkomsten zijn in strijd met een voorlopige mededeling van MULDER, HOOGENDIJK & WALSTRA (1959), die geen verschil in vetgehalte vonden bij verschillend grote monsters. Gezien het slechts kleine effect is dit niet verwonderlijk.

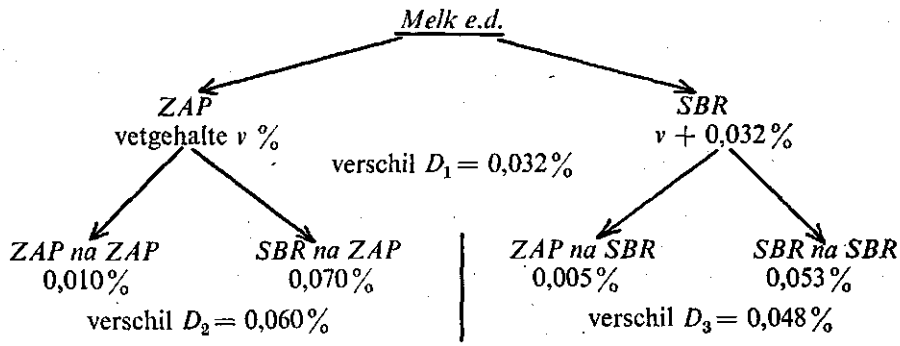
3.3.3. *Vergelijking van SBR en ZAP*

Bij vergelijking van beide methoden, toegepast op melk en ondermelk, bleek *SBR–ZAP* = 0,020.....0,030%. Uit het in 3.2. behandelde zou men willen opmaken, dat de methoden geen verschil geven voor wat betreft vet en vetachtige stoffen. Verder zou het niet-vet bij *SBR* 0,06....0,07% bedragen, en bij *ZAP* ong. 0,008% (zie 3.3.1. en 3.3.2.). Nu blijft bij *SBR* iets van het niet-vet in het vetkolfje achter na het uitspoelen met petroleumether (ong. 0,005%), maar op grond van al deze gegevens zou toch *SBR–ZAP* bijna 0,05....0,06% moeten zijn, dus 2 maal zo groot als werd gevonden.

Hoewel *SBR–ZAP* misschien wat groter is bij ondermelk dan bij melk, is het toch onwaarschijnlijk dat met *SBR* minder werkelijk vet wordt onttrokken dan met *ZAP*. Als de met beide methoden verkregen vetoplossing „teruggeëxtraheerd" wordt met zwak alkalische 50% alcohol, zodat het niet-vet waarschijnlijk nagenoeg geheel onttrokken wordt (de bruine kleur van het *SBR*-vet is b.v. verdwenen), dan is toch na afdampen en drogen nog steeds *SBR* > *ZAP*, zij het heel weinig. Bij het onderzoek van centrifugemelk werd zelfs wel gevonden, dat *SBR na ZAP* groter was dan *SBR* normaal. (Met de term „*SBR na ZAP*" wordt het volgende bedoeld: nadat destruaat + alcohol 3 maal is uitgeschud volgens *ZAP*, wordt nogmaals 3 maal volgens *SBR* geëxtraheerd; de hoeveelheid droge stof in dit laatste extract, uitgedrukt als gehalte van de onderzochte melk e.d., is dan „*SBR na ZAP*").

Het is dus waarschijnlijk, dat de tot nu toe gegeven gehalten aan niet-vet onjuist zijn. Om dit verder te onderzoeken, werden enkele proeven met herhaalde extractie gedaan. Hierbij werd zoveel mogelijk onder gelijke omstandigheden gewerkt: steeds was vet in de kolfjes aanwezig (tegengaan verdamping);

het gewicht van het lege vetkolfje werd vooraf vastgesteld (dus niet uitspoelen etc.). Onderstaand wordt een schema van deze proeven gegeven, waarin tevens de gemiddelden van de uitkomsten zijn vermeld. Het betrof 3 waarnemingen bij melk, 2 bij ondermelk, en 1 bij wei, die alle ongeveer dezelfde resultaten gaven.



Op het eerste gezicht zou men verwachten, dat b.v.:

$$ZAP + SBR\ na\ ZAP \cong SBR + ZAP\ na\ SBR,$$

en dit is zeker niet het geval. Het is het gemakkelijkst de verschillen D te vergelijken. Daar het schijnvet, zoals levulinezuur e.d., in zeer grote overmaat in de zure vloeistof aanwezig is, en er dus met elke extractie ongeveer evenveel van verzameld zou worden, verwacht men, dat $D_1 \cong D_2 \cong D_3$. Dit is duidelijk niet het geval. Alleen bij een proef met ultrafiltraat van melk was $D_1 \cong D_2$ (D_3 werd hier niet bepaald).

Om uit te zoeken hoe de bovenstaande discrepanties verklaard moeten worden, werden diverse proeven gedaan. De hoeveelheid niet-vet uit centrifugemelk bleek niet beïnvloed te worden door toevoegen van botervet aan het monster, noch bij *SBR* noch bij *ZAP*. Ook werd geen verschil in verdampen van niet-vet gevonden tijdens drogen bij proeven met directe extractie enerzijds, en die met voortgezette extractie anderzijds. De bij *ZAP* gevonden hoeveelheid niet-vet bleek waarschijnlijk iets, zij het heel weinig, af te nemen met toenemend rangnummer van de extractie. Dit is niet verwonderlijk, maar bij *SBR* bleek juist een toeneming. Er waren enkele aanwijzingen, dat er misschien een kleine afneming is in de oplosbaarheid van een deel van het niet-vet in de waterfase met toenemend rangnummer van de extractie. Een deel van het verschil tussen D_2 en D_3 kan hier mogelijk mee worden verklaard.

Het voornaamste bleek evenwel het volgende: Bij *SBR* neemt de hoeveelheid niet-vet van 1 extractie toe met 0,001% per uur staan van de zure vloeistof vóór de extractie. Daar bij *SBR* de ontmenging van de fasen erg lang duurt, is meestal ong. 24 uur nodig voor 3 extracties, bij voortgezette extractie dus 48 uur. Nu werden de proeven steeds zo gedaan, dat alle extracties met hetzelfde rangnummer ongeveer tegelijkertijd werden uitgevoerd; dus ook bij *ZAP* had de vloeistof lang gestaan. Het verschil tussen D_3 en D_2 is nu geheel te verklaren. Bij *SBR na ZAP* heeft de zure vloeistof 24 uur gestaan, voordat de *SBR*-extractie begon. Hier is dus de vorming van schijnvet doorgegaan, zonder dat dit steeds voor een deel werd weggenomen, zoals bij *SBR na SBR*. Maar ook voor het verschil tussen D_3 en D_1 is dit van belang: daar het schijnvet toch nog slechts

weinig in ether-petroleumether oplost, is van het extra gevormde niet alles weggenomen bij de eerste 3 extracties.

Hiermee is de kwestie waarschijnlijk wel verklaard, temeer daar bij ultrafiltraat van melk ($D_1 \cong D_2$) een veel geringere toeneming in de hoeveelheid niet-vet bij lang staan werd gevonden dan bij melk e.d. De proeven met „vetvrije kunstmelk" hebben voor *SBR* dus weinig waarde (voor *ZAP* wel), doordat ze te hoge uitkomsten geven; die met een mengsel van lactose en caseïne geven een betere benadering, als men ook de extractie van organische zuren in aanmerking neemt. De conclusie kan dus zijn, dat bij *ZAP* inderdaad ong. 0,008% niet vetachtige stof als vet wordt gevonden, maar dat het bij *SBR* veel minder is dan aanvankelijk werd aangenomen. Dit is dan 0,03....0,04% bij bepalen van het vetgehalte van melk, waarbij slechts weinig niet-vet achterblijft na het uitspoelen met petroleumether. Bij vetarme produkten als ondermelk zal meer achterblijven en zal dus het gevonden vetgehalte minder te hoog zijn, maar een uitspraak over de juiste hoeveelheid is hier moeilijk.

Mogelijk speelt bij het verschil tussen *SBR* en *ZAP* ook oxydatie van het *ZAP*-vet nog een kleine rol. Hierop wordt in 3.4. nader ingegaan.

3.3.4. *Pogingen de hoeveelheid niet-vet te verminderen*

ZAP werd o.m. ontwikkeld, om het extraheren van niet-vet te ontgaan bij methoden met zure ontsluiting. Hoewel een aanzienlijke verbetering bereikt is, is deze poging toch niet volledig geslaagd. Men zou ook kunnen proberen, het ontstaan van de storende stoffen te verhoeden, tenminste voor zover deze niet van nature in de melk voorkomen.

SCHLOEMER & RAUCH (1942) ontwikkelden een voorschrift waarbij gekookt werd met zoutzuur en chloroform. Daardoor bleef de temperatuur ong. 77 °C, en ontstonden althans geen bruine stoffen. MOHR & HÄSING (1948) constateerden evenwel dat het vet onvolledig werd ontsloten. Bij vroeger op dit laboratorium gedane proeven, werd iets dergelijks geprobeerd door koken in aanwezigheid van alcohol. Ook dan bleef bruinkleuring achterwege, maar het volgens *SBR* gevonden vetgehalte was nog duidelijk hoger i.pl.v. lager. Misschien speelt hier estervorming een rol.

Bij de methode van de Britse „Society of Public Analysts" (1936) voor de bepaling van het vetgehalte van melkpoeder, wordt na toevoegen van water eerst gekookt met weinig ammonia, daarna pas met zoutzuur. Volgens HÄLLQVIST & HELLVING (1949) zou daardoor de afbraak van het eiwit gemakkelijker verlopen, en zou men dus kunnen volstaan met minder sterk zoutzuur of een kortere kookduur, met als gevolg minder schijnvet. Daarom werd enig onderzoek gedaan met *ZAP*. De verbetering is slechts hoogstens 0,002%. Bij *SBR* is dit iets meer.

Ook bij de Britse methode wordt achteraf uitgespoeld met petroleumether. SANDBERG (1959) beveelt daarbij aan eerst een weinig water in het kolfje te brengen, waardoor de niet vetachtige stoffen voor een groter deel achter zouden blijven. Ons bleek evenwel, dat dit bij *ZAP* in 't geheel geen, en bij *SBR* slechts een verbetering van ong. 0,002% geeft.

Verder werd nog geprobeerd minder schijnvet te laten ontstaan, door te koken onder toevoeging van $SnCl_2$. Het is bekend, dat dit o.m. de vorming van polymerisatieprodukten tegengaat bij zure hydrolyse van eiwitten. Hoewel inderdaad de kleur van het destruaat veel lichter bleef, bleek bij *SBR* meer dan

een verdubbeling van de hoeveelheid niet-vet. Dit moet o.m. toegeschreven worden aan extractie van het tinchloride zelf, dat enigszins in ether oplosbaar is. Ook bij *ZAP* resulteerde een kleine verhoging van het gevonden vetgehalte.

Ook werd gepoogd het ontsluiten door koken met een organisch zuur uit te voeren, in de hoop zo de vorming van levulinezuur te voorkomen. Mierenzuur bood nog de meeste perspectieven, maar een volledige ontsluiting van het vet bleek niet mogelijk. Wel lukte dit, als enig HCl aan het mierenzuur werd toegevoegd, maar dan werd weer schijnvet gevormd en uitgeschud.

Op grond van de resultaten van vele pogingen, lijkt het niet mogelijk door zure destructie ontsluiting van het vet te krijgen, zonder dat levulinezuur e.d. worden gevormd. Ook pogingen om het eiwit volledig op te lossen met pepsine en verdund zoutzuur mislukten.

3.4. Vergelijking van *ZAP* met *RG*

In het navolgende zal onder $\triangle$ worden verstaan: het vetgehalte volgens *RG* minus het vetgehalte volgens *ZAP*, bij toepassing van beide methoden op dezelfde melk, ondermelk e.d., dus b.v. „$\triangle$melk".

$\triangle$melk werd 10 maal bepaald en was $-0{,}005 \ldots +0{,}004\%$, gemiddeld $-0{,}001\%$ ($s\triangle = 0{,}003\%$). Het voorgaande geeft gegevens over de hoeveelheden vet en vetachtige stoffen die niet mee bepaald worden, en over de hoeveelheid niet-vet die wel bepaald wordt, zowel voor *RG* als voor *ZAP*. Met behulp hiervan, kan dus een gecorrigeerd vetgehalte berekend worden, door met het te weinig aan vet te vermeerderen en met het niet-vet te verminderen. Daartoe moet het gehalte aan fosfatiden en dat aan vrije vetzuren bekend zijn. De hoeveelheid niet-vet bij *ZAP* werd bepaald door toepassing van herhaalde extractie, voor het niet-vet bij *RG* werd 0,004% aangenomen (zie 2.5.). De uitkomsten van enkele proeven zijn gegeven in tabel 10. $\triangle$-gecorrigeerd is gemiddeld 0,004%, dus niet ver van nul.

Tabel 10. Vetgehalte en gecorrigeerd vetgehalte (in procenten) van melk, volgens *RG* en *ZAP*.

RG (1)	*ZAP* (2)	$\triangle$ (3)	Fosfatiden (4)	Vrije vetzuren (5)	Niet-vet *ZAP* (6)	*RG* gecorrigeerd (7)	*ZAP*, gecorrigeerd (8)	$\triangle$, gecorrigeerd (9)
3,275	3,280	−0,005	(0,030)	(0,012)	0,010	3,283	3,281	+0,002
3,527	3,530	−0,003	0,033	0,015	0,009	3,537	3,533	+0,004
3,663	3,666	−0,003	0,030	0,010	(0,008)	3,670	3,669	+0,001
3,105	3,103	+0,002	0,031	0,012	0,008	3,113	3,106	+0,007
3,254	3,250	+0,004	0,028	0,012	0,006	3,262	3,254	+0,008
Gemiddelde		−0,001						+0,004

De uitkomsten tussen haakjes zijn niet bepaald maar geschat.
(7) = (1) + 0,13 × (4) + 0,67 × (5) − 0,004.
(8) = (2) + 0,33 × (4) + 0,1 × (5) − (6).

Daar de bij room toe te passen correcties relatief weinig zullen verschillen van die bij melk, is het te verwachten, dat – als de room een 10 maal zo hoog vetgehalte heeft als melk – $\triangle$room $\simeq$ 10 $\triangle$melk zal zijn. Bij 5 bepalingen bleek

△room = −0,01....−0,04%, gemiddeld −0,02%. Dit is dus in overeenstemming met de resultaten bij melk. (Bij de toepassing van *RG* op room, werd verdund met 0,5% NaCl-oplossing).

△ondermelk (vetgehalte 0,07....0,15%) werd 16 maal bepaald en was gemiddeld 0,011% ($s\triangle = 0{,}004\%$). Nu is bij ondermelk de correctie op het verschil in vetgehalte vrijwel nul. Vrije vetzuren zijn nagenoeg niet aanwezig in ondermelk, behalve wat boterzuur, dat toch bij beide methoden verloren gaat. Het te weinig aan fosfatiden is ten naaste bij gelijk aan de hoeveelheid niet-vet, zowel bij *RG* (0,002%) als bij *ZAP* (0,006%). M.a.w. ook △-gecorrigeerd = = 0,011%. Dit is vreemd, gezien de uitkomsten bij melk en room.

Om na te gaan waaraan de grote △ondermelk moet worden toegeschreven, werd de volgende proef enkele malen gedaan: Van dezelfde ondermelk werd het vetgehalte bepaald volgens *ZAP* en *RG*, maar tevens werd op volgens *RG* verkregen vet + 8 ml water een bepaling volgens *ZAP* uitgevoerd, en wel op 2 manieren: zowel zonder koken met zoutzuur (uitkomst genoemd „*ZAP op RG, koud*"), als normaal met 3 minuten koken („*ZAP op RG, warm*"). De uitkomsten zijn samengevat in tabel 11. Hierbij zijn de volgende opmerkingen te maken:

Kolom (5). Het gemiddelde is gelijk aan de gemiddelde △ondermelk van alle waarnemingen.

Kolom (6). Dit verschil is op te vatten als de hoeveelheid niet-vet van *RG*, daar dit onder de omstandigheden van (3) niet uitgeschud zal worden. Het gemiddelde is goed in overeenstemming met de te verwachten 0,001....0,002% (zie 2.5.).

Kolom (7). Dit verschil wordt geacht veroorzaakt te worden door de afbraak van fosfatiden t.g.v. het koken met zoutzuur. Daar het gemiddelde fosfatidengehalte van ondermelk ong. 0,016% is, en een derde van de fosfatiden bij *ZAP* verloren zou gaan (zie 3.2.3.), stemt het gevonden gemiddelde er zeer goed mee overeen, als men tevens bedenkt, dat bij *RG* 10% van de fosfatiden achterblijft.

Kolom (8). Ook bij ondermelk wordt met *ZAP* wat schijnvet onttrokken, en wel levulinezuur ontstaan uit suikers. Daar bij (4) geen suikers aanwezig zijn, en dus vrijwel geen schijnvet gevormd kan worden, is een gemiddelde uitkomst van ongeveer +0,005% te verwachten, dus sterk verschillend van de gevonden −0,004%.

TABEL 11. Vetgehalte (in procenten) van ondermelk, volgens *RG* en *ZAP*. Verklaring: zie tekst.

RG (1)	*ZAP* (2)	*ZAP op RG, koud* (3)	*ZAP op RG, warm* (4)	(1)−(2) △ (5)	(1)−(3) (6)	(3)−(4) (7)	(2)−(4) (8)
0,152	0,142	0,147	0,141	0,010	+0,005	0,006	+0,001
0,114	0,107	0,112	0,106	0,007	+0,002	0,006	+0,001
0,105	0,096	0,106	0,101	0,009	−0,001	0,005	−0,005
0,111	0,097	0,108	0,099	0,015	+0,003	0,009	−0,002
0,089	0,076	0,090	0,085	0,013	−0,001	0,005	−0,009
0,119	0,104	0,118	0,114	0,015	+0,001	0,004	−0,010
Gemiddelde				0,011	+0,001[5]	0,006	−0,004

Het is dus duidelijk, dat bij *ZAP* toegepast op ondermelk een deel van het vet niet wordt gewonnen. Gezien de gevonden △ bij melk en room, lijkt het of dit hierbij niet, of in veel mindere mate, zo zal zijn. Toch moet dit onwaarschijnlijk geacht worden. Het is gemakkelijk te controleren met een balansproef. Bepaald werd het vetgehalte van room, van ondermelk en van een mengsel van beide (= „melk"). Uit beide laatste gegevens werd weer een vetgehalte van room berekend, door de hoeveelheid vet uit de „melk" te corrigeren voor die uit de samenstellende ondermelk. Als nu alleen het vetgehalte van ondermelk bij *ZAP* te laag zou worden gevonden, dan zou het berekende vetgehalte van de room duidelijk hoger moeten zijn dan het direct gevondene. Indien ook bij melk en room overeenkomstig te weinig vet wordt bepaald, zou het gevonden gehalte iets hoger moeten zijn, tengevolge van de extractie van niet vetachtige stof (zie 2.6.). Gevonden minus berekend vetgehalte bleek te zijn: 0,00; −0,06; +0,01 en +0,08%, dus gemiddeld +0,01%. Waarschijnlijk wordt dus ook bij melk en room het vet met *ZAP* niet volledig gewonnen.

Het is niet gemakkelijk hier een verklaring voor te geven. Het meest waarschijnlijk lijkt ons een „binding" tussen vet en andere stoffen, welke zou ontstaan bij het koken met zoutzuur. Het bewuste vet kan n.l. ook met meerdere malen uitschudden niet verzameld worden (zie 3.1.2.), maar als het eenmaal op een andere wijze vrij is gemaakt, dan is het wel extraheerbaar, zoals blijkt uit tabel 11. In dit verband zijn enkele proeven met wei nog interessant. Hierbij bleek n.l. △ wei = 0,001% (gecorrigeerd voor extra verdamping van levulinezuur), terwijl △ ondermelk = 0,017% was (;dit betrof de ondermelk waar de wei van gemaakt was). Misschien is er dus sprake van een interactie tussen vet en afbraakprodukten van kaasstof.

Nu blijft echter het verschil tussen △ melk en △ ondermelk te verklaren. Ten dele speelt misschien gewichtstoeneming van het *ZAP*-vet door oxydatie een rol. In het begin van het onderzoek werd enkele malen het peroxydegetal van het vet bepaald (methode van SABALITSCHKA, 1941). Dit was bij *RG* 0,1 mg O/g vet. Bij *ZAP* was het veel hoger, n.l. 0,5 en bij *SBR* weer laag: 0,1. Nu kan allicht veel meer zuurstof opgenomen zijn dan het peroxydegetal aangeeft, vooral als dit hoog is. Bij *RG* zijn in het vet fosfatiden opgelost, die in die toestand als antioxydans kunnen werken. Bij de zure methoden is dit niet zo, dus is sterkere oxydatie mogelijk. Waarschijnlijk werkt het schijnvet van *SBR* als antioxydans. 1 maal werd een proefje gedaan, waarbij aan *ZAP*-vet voor het drogen enig niet-vet van *SBR* werd toegevoegd: het gevonden vetgehalte bleek inderdaad 0,006% lager dan bij niet toevoegen.

Het *RG*-vet is steeds geel gekleurd, het *ZAP*-vet vóór het drogen ook, maar daarna wit, waarschijnlijk t.g.v. oxydatie van de kleurstoffen (caroteen etc.). Aan het eind van dit onderzoek zou nader worden ingegaan op de oxydatie van *ZAP*-vet. Dit bleek toen plotseling steeds geel gekleurd, hoewel niets aan de bepaling was veranderd. Ook het peroxydegetal was toen veel lager: 0,1.... 0,2 mg O/g vet. Het lukte niet een verklaring te vinden, noch om de oude toestand weer plaats te doen hebben.

Hoewel dus mogelijk een deel van de gevonden discrepantie tussen △ melk en △ ondermelk met oxydatie van het *ZAP*-vet verklaard moet worden, is niet aannemelijk dat dit de enige oorzaak is. Het komt ons waarschijnlijk voor, dat het volgende een rol speelt:

In 2.5. bleek bij de behandeling van het niet-vet bij *RG*, dat dit vnl. uit de

oppervlaktelaagjes afkomstig is. Er is meer van dit materiaal te winnen, door vaker te extraheren, en er waren aanwijzingen dat de stoffen toch voor een klein deel vetachtig zijn. Er kan b.v. sprake zijn van een complex van wel en niet vetachtige stoffen, dat ten dele wordt geëxtraheerd. Daardoor wordt dus enerzijds niet-vet uitgeschud, maar anderszijds ook wat te weinig „vet". Dit kan echter bijna niet voor ondermelk opgaan. Bij *ZAP* zou het complex door koken met zoutzuur gesplitst worden, en het vet er wel uit worden geëxtraheerd.

Het meest waarschijnlijk lijkt ons: Bij *RG* blijft een klein deel van het vet achter, maar dit wordt ten dele gecompenseerd door niet-vet; beide hoeveelheden nemen toe met de hoeveelheid oppervlaktelaagjesstof. Bij *ZAP* blijft een ander deel van het vet (ong. 0,01 %) achter, in hoeveelheid evenwel onafhankelijk van het vetgehalte. Gecombineerd met de overige gegevens (aangaande fosfatiden, vrije vetzuren, niet-vet *ZAP* etc.) blijkt dan, dat voor de bepaling van het vetgehalte van melk en room beide methoden ongeveer even juist zijn, maar dat voor ondermelk *RG* de voorkeur verdient. *RG* geeft echter weer grotere afwijkingen als veel vrije vetzuren aanwezig zijn.

Bij *SBR* moet juist als bij *ZAP* een deel van het vet achterblijven, daar – zoals in 3.3.3. duide ijk blijkt – bij *SBR* zeker niet meer vet onttrokken wordt dan bij *ZAP*.

3.5. Toepassing op enkele produkten (*ZAP* en *SBR*)

3.5.1. *Melkprodukten*

In 3.1.2. werden enkele moeilijkheden bij de extractie volgens *ZAP* beschreven. Het betrof daar rauwe melk, maar bij hoog verhitte melk verloopt de extractie nog aanmerkelijk slechter. Wordt 3 maal gedurende 1 minuut uitgeschud, dan wordt bij gesteriliseerde melk soms wel 0,2 % te weinig vet gewonnen. In tabel 12 wordt een voorbeeld gegeven van de verrichte proeven met verschillende extractieduur. Uit deze proeven werd geconcludeerd, dat gedurende 10 minuten schudden (wentelen) vereist is. Langer schudden helpt doorgaans niet: na 10 minuten is een visceuse emulsie gevormd, zodat dan verder geen vet meer wordt onttrokken, alvorens ontmenging plaats heeft gehad (b.v. door centrifugeren). Ook bij gesteriliseerde ondermelk is gedurende 10 minuten extraheren noodzakelijk.

Tabel 12. De per afzonderlijke extractie gewonnen hoeveelheid vet in procenten van het monster, bij *ZAP* toegepast op hoog verhitte melk (20 minuten 120 °C), in afhankelijkheid van de duur van het schudden.

	1 minuut	3 minuten	6 minuten	9 minuten
1e extractie	3,405	3,583	3,688	3,890
2e „	0,346	0,292	0,255	0,078
3e „	0,108	0,064	0,030	0,004
4e „	0,056	0,024	0,005	0,002
Totaal	3,915	3,963	3,978	3,974

Melk die gedurende 10 minuten op 80 °C verhit is geweest, bleek zich geheel te gedragen als rauwe melk; verhitting gedurende 10 minuten op 100 °C gaf al

een slechtere extractie, hoewel nog niet zo slecht als bij gesteriliseerde melk (20 minuten 120 °C).

Daar tijdens de bereiding van vele melkprodukten een vrij sterke verhitting wordt toegepast, is bij het bepalen van het vetgehalte daarvan volgens *ZAP* een zelfde bezwaar te verwachten. Dit werd dan ook ondervonden bij melkpoeder en bij ongesuikerde gecondenseerde melk. Bij dit laatste produkt is 3 maal uitschudden gedurende 10 minuten mogelijk niet eens altijd afdoende daar één maal met een 4e extractie nog 0,01 % vet werd uitgeschud.

Zowel *SBR* als *ZAP* zijn geheel ongeschikt voor gesuikerde gecondenseerde melk. Met *ZAP* is de extractie volkomen onvoldoende. Hier werd b.v. volgens *RG* een vetgehalte van 8,62 % gevonden, volgens *ZAP* slechts 6,26 % en wel met een zeer grote spreiding (s = 0,36 %). *SBR* geeft daarentegen veel te hoge waarden, zoals verwacht kon worden; b.v. *RG* 8,23 % en *SBR* 9,85 %, ook weer met een zeer grote spreiding (s = 0,35 %). Er wordt dus veel schijnvet uitgeschud, waarvan wel wat achterblijft bij het uitspoelen met petroleumether, maar het merendeel toch niet. Ook wanneer vóór het uitspoelen een beetje water in het kolfje wordt gedaan (SANDBERG, 1959) lost toch nog veel van het niet-vet in de petroleumether op.

Bij zure melkprodukten geeft het melkzuur aanleiding tot een verhoging van het gevonden vetgehalte met 0,01....0,02 % bij *SBR* en met 0,002.... 0,003 % bij *ZAP*, zo als al werd vermeld (3.3.1. en 3.3.2.).

Bij een produkt rijk aan fosfatiden zoals karnemelk, wordt het vetgehalte volgens *ZAP* lager gevonden dan volgens *RG*, en wel meer naarmate het vetgehalte van de room waar de karnemelk uit is bereid, hoger was. Dit bleek o.m. bij een vroeger op dit laboratorium uitgevoerd onderzoek. Figuur 8 geeft de uitkomsten van deze proeven en moge ter illustratie dienen.

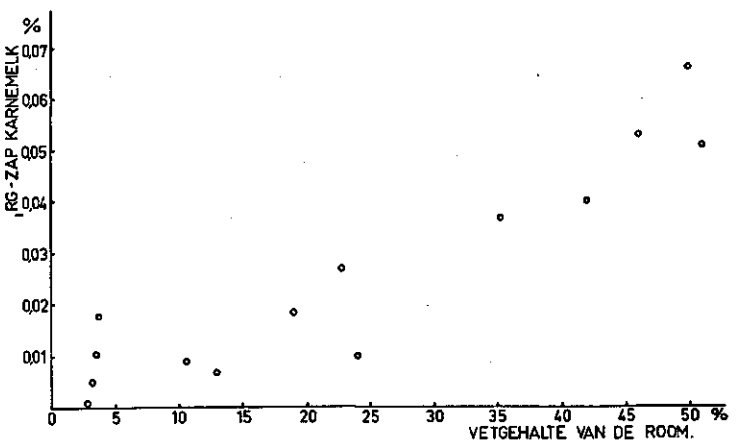


FIG. 8. Het verschil *RG–ZAP* bij karnemelk, bereid uit room van verschillend vetgehalte.

3.5.2. *Kaas*

Voor de bepaling van het vetgehalte van kaas zijn ettelijke methoden ontwikkeld. Een uitgebreid, maar nog geenszins volledig overzicht van de oudere literatuur vindt men b.v. bij UTZ (1913). *RG* wordt ook wel gebruikt, maar is toch minder geschikt, o.m. gezien het vaak hoge gehalte aan vrije vetzuren in

kaas. Als standaardmethode wordt meestal *SBR* gebruikt, zoals in de internationale norm. De ontwikkeling ervan werd in 3.1.1. gegeven. Het volgende voorschrift werd door ons gebruikt:

Ong. 3 g kaas wordt nauwkeurig in een mojonnierbuis gewogen en zacht gekookt met 10 ml HCl 36%; nadat de kaas ogenschijnlijk is opgelost, wordt nog 2 minuten doorgekookt, waarna wordt gekoeld en 10 ml alcohol wordt toegevoegd. Verder wordt gehandeld als bij melk (zie 3.1.5.), behalve voor wat betreft de duur van het drogen, welke hier wat langer moet zijn, omdat doorgaans meer vet aanwezig is; 1,5 uur bleek voldoende.

Ook bij toepassing van *SBR* op kaas is enig niet-vet te verwachten, hoewel relatief minder dan bij melk, daar zo goed als geen suiker aanwezig is. Ook het citroenzuur is doorgaans vrijwel geheel omgezet. Toch leek het gewenst, ook voor kaas *ZAP* te beproeven. Het voorschrift wijkt slechts af van dat voor *SBR* in het gebruikte extractiemiddel: alleen petroleumether. Bij het uitschudden bleken evenwel dezelfde moeilijkheden als bij melk. Gedurende 10 minuten schudden is noodzakelijk om in 3 extracties al het vet te verzamelen. Verder extraheren levert dan geen droge stof meer op.

Ook de invloed van de kookduur bleek ongeveer zo te zijn als bij melk (zie 3.1.2.). Nadat de kaas op 't oog is opgelost, is nog 2 minuten doorkoken gewenst. Bij 1 minuut doorkoken werd bij *ZAP* soms nog onvolledige extractie waargenomen. Bij wat langer koken – b.v. 4 minuten na het oplossen – bleek het vet bij *SBR* soms niet geheel oplosbaar in petroleumether: een vlokkig bezinksel blijft dan achter. Er is niet verder onderzocht waar deze vlokjes uit bestaan, maar ze zijn kennelijk overwegend niet vetachtig. Worden ze n.l. met het vet meegewogen, dan resulteert een duidelijk te hoog vetgehalte.

Bij *SBR* bleek een korte extractieduur, dus b.v. 1 minuut met de hand schudden, ruimschoots voldoende.

Het onderzoek naar de juistheid van de methode is bij kaas wat lastiger dan b.v. bij melk, gezien de slechtere reproduceerbaarheid (zie 3.7.), die toegeschreven moet worden aan het onvoldoende homogeen zijn van het monster. Eigenlijk zouden dus wat grotere series proeven nodig zijn. Gelukkig is echter de hoeveelheid niet-vet, gevonden bij voortgezette extractie, beter reproduceerbaar, daar voor deze kleine hoeveelheid de homogeniteit van weinig belang is.

Bij proeven met voortgezette extractie (zie voor de techniek 3.3.3.) bleek:

$$SBR\ na\ ZAP = SBR\ na\ SBR$$

Daar bovendien (in tegenstelling tot bij melk) de uitkomst volgens *SBR* onafhankelijk bleek van de duur van het staan vóór de extractie, en tevens *ZAP na SBR* zowel als *ZAP na ZAP* nihil bleken te zijn, is het te verwachten dat:

$$SBR\ na\ ZAP = SBR - ZAP$$

zal zijn. Inderdaad bleek bij 6 proeven in 4-voud $SBR - ZAP = 0{,}02 \ldots 0{,}12\%$, gemiddeld 0,06% en $SBR\ na\ ZAP = 0{,}05 \ldots 0{,}09\%$, gemiddeld ook 0,06%.

Het is dus waarschijnlijk, dat bij *SBR* ong. 0,06% niet-vet mee wordt bepaald. Waar bestaat dit nu uit? Uit 3.3.1. is op te maken dat ong. 0,03% melkzuur geëxtraheerd kan worden, gezien het melkzuurgehalte van kaas. Melkzuur kan dan ook gemakkelijk aangetoond worden (reactie met *p*-hydroxydiphenyl en zwavelzuur; FEIGL, 1956). De zuurtegraad van het niet-vet werd nog bepaald en hieruit bleek een gemiddeld equivalentgewicht van 150. Dit komt dus overeen met $90/150 \times 0{,}06 = 0{,}036\%$ melkzuur, als aangenomen wordt dat dit het enige

zuur is dat wordt geëxtraheerd, en als geen vorming van lactiden op zou treden. Behalve een kwalitatieve reactie op organische N, die negatief uitviel, werd verder niet ingegaan op de aard van het niet-vet, daar het niet zo belangrijk te weten is welke, als wel dàt er niet-vet-stoffen worden geëxtraheerd. Misschien zijn het o.m. polymerisatieprodukten, gezien het bruine en taaie uiterlijk. Bij *ZAP* wordt vrijwel geen niet-vet uitgeschud.

Voor wat betreft vet en vetachtige stoffen, is het onwaarschijnlijk dat verschillen optreden t.o.v. melk. Er is dus een verlies van een tiende van de vrije vetzuren en van een derde van de fostatiden te verwachten, zowel bij *SBR* als bij *ZAP*. 10% van de vrije vetzuren kan evenwel bij sommige kaassoorten, zoals blauwe-schimmelkazen, een niet te verwaarlozen hoeveelheid zijn. Blijkens proeven van MULDER & HOOGENDIJK (1955) is het fosfatidengehalte van volvette kaas doorgaans 0,10...0,16%; het gehalte in de droge stof 0,17... 0,24%. Mogelijk neemt het met de rijping wat af.

Of, evenals bij melk, een klein deel van het vet achterblijft doordat het in niet extraheerbare vorm is overgegaan tijdens de bewerking, is niet gemakkelijk uit te maken.

3.6. DE METHODE „WEIBULL"

3.6.1. *Literatuuroverzicht*

Zoals in 3.1.1. werd vermeld, bedacht SCHMID (1888) het koken met zoutzuur om het vet van melk te ontsluiten. BERNTROP (1902) ontwierp een methode, waarbij na het ontsluiten het destruaat wordt gefiltreerd, zodat het vet op het filter achterblijft. Na uitwassen van het filter wordt dit gedroogd, waarna het met ether wordt geëxtraheerd. Deze methode was o.m. bedoeld voor brood en gecondenseerde melk. Blijkens VAN DER WAL & WIJS (1908) werd de bepaling ook spoedig toegepast op melk en andere melkprodukten. KONING & MOOY (1916*b*) gaven een voorschrift dat thans nog ongewijzigd wordt gebruikt:

25 ml melk wordt met 20 ml water en 30 ml 8 n HCl gedurende 15....20 minuten zacht gekookt. Daarna wordt het mengsel heet gefiltreerd door een nat filter en het filter met heet water uitgewassen, tot het filtraat zuurvrij is (of beter chloorvrij). Het filter wordt dan gedurende 1 uur bij 103....105°C gedroogd, waarna het gedurende 2 uur in een soxhletapparaat wordt uitgetrokken. Het extract wordt doorggedampt en na drogen wordt de hoeveelheid vet gewogen.

Het is duidelijk, dat de thans ingeburgerde naam „WEIBULL" voor de methode onjuist is. Hier is trouwens al meermalen op gewezen, o.m. door VAN DER WAL & WIJS (1908) en door MULDER (1942). De beste naam zou zijn: methode van BERNTROP. WEIBULL (1892) heeft – na SCHMID dus – een methode bedacht voor brood, waarbij dit werd verhit met verdund zwavelzuur; na neutraliseren met marmerpoeder werd het mengsel op papier gedroogd en dan met ether uitgetrokken. Dit is dus principiëel een andere methode. Bovendien heeft WEIBULL zich veel bezig gehouden met de bepaling van het vetgehalte van melk e.d. en daarbij steeds *RG* gepropageerd voor melk, melkprodukten en kaas (zie b.v. WEIBULL, 1898, 1906).

Volgens EISSES (1948) zijn moeilijkheden bij *Wb* vnl. toe te schrijven aan:

1° Het filter is niet geheel droog, of wordt weer enigszins nat tijdens het extraheren. Indien het ten tweede male wordt gedroogd, kan er weer wat vet aan worden onttrokken.

2° Er is te weinig water in het mengsel tijdens het koken. Dit gaat in het bijzonder op voor melkpoeder, waar volgens sommige voorschriften geen extra water aan wordt toegevoegd. Indien nu te lang wordt gekookt, en dus veel water verdampt, blijkt later het vet niet volledig onttrokken te kunnen worden. Wordt daarentegen te kort gekookt, dan blijft veel „kool" op het filter achter, waardoor niet meer behoorlijk uitgewassen kan worden.

STOLDT (1951, 1952) heeft *Wb* gepropageerd als „universele methode" voor melk- en zuivelprodukten en heeft gedetailleerde voorschriften opgesteld, maar in feite niets nieuws toegevoegd. De toevoeging „STOLDT" aan de naam van de methode, maakt deze naam dus nog onjuister. MOHR & KOENEN (1952, 1953) hebben het werk van STOLDT nog weer gecontroleerd en de methode aanbevolen, ook voor gesuikerde melkprodukten.

Bij een modificatie die vroeger wel werd toegepast, wordt het destruaat eerst diep gekoeld alvorens gefiltreerd wordt, en wordt ook met ijskoud water uitgewassen. Onlangs is deze methode nog weer voorgesteld (MOUREAUX, 1959). Waarschijnlijk gaat men hierbij uit van de gedachte dat minder kans bestaat dat vet door het filter loopt, als het is gekristalliseerd. Ons zijn evenwel geen onderzoekingen dienaangaande bekend.

De praktische uitvoering van *Wb* biedt nogal wat bezwaren: de methode kost veel meer tijd en werk dan b.v. *ZAP*. Men dient vooraf filters en watten te ontvetten. Zo nu en dan wil het destruaat slecht door het filter lopen, wat meestal onvoldoende uitwassen en dus een onbetrouwbaar resultaat tengevolge heeft. Het komt soms voor dat een filter lekt. Door de ingewikkelde procedure heeft men veel kans tijdens de bewerking wat vet te verliezen. Er wordt vaak beweerd dat *Wb* beter reproduceerbare uitkomsten zou geven dan andere methoden. Voor zover ons bekend, berust dit alleen op de overweging dat van een groter monster wordt uitgegaan, en is deze bewering niet door proeven gestaafd.

Een voordeel van *Wb* zou kunnen zijn, dat heel weinig niet-vet mee wordt bepaald, omdat rigoreus met water wordt uitgewassen. Toch blijven altijd nog niet vetachtige stoffen op het filter achter. Daarentegen bestaat ook de mogelijkheid dat een beetje vet het filter passeert, zoals vrije vetzuren of fijn geëmulgeerd vet.

3.6.2. *Eigen onderzoek*

Ter aanvulling van het uit de literatuur bekende, en in het licht van de gegevens verkregen bij *SBR* en *ZAP*, werd enig onderzoek gedaan. Dit heeft evenwel een oriënterend karakter, gezien te weinig bepalingen werden uitgevoerd om de hoge graad van geoefendheid te krijgen, die voor dergelijk werk gewenst is. De methode werd ook alleen op melk en ondermelk toegepast.

Het gebruikte voorschrift was dat van KONING & MOOY (1916*b*) met de volgende modificaties:

1° De duur van het extraheren werd verlengd tot 4 uur.
2° Tenzij anders vermeld, werd geëxtraheerd met petroleumether.
3° De koeler van het soxhletapparaat werd van boven afgesloten met een chloorcalciumbuisje.

Dit laatste bleek een goed hulpmiddel om het weer vochtig worden van het filter tegen te gaan. Een tweede maal drogen en uittrekken van het filter resulteerde niet in extractie van meer vet.

Enkele malen werd het vetgehalte van melk en ondermelk bepaald (in 4-voud),

TABEL 13. Het vetgehalte in procenten volgens *Wb* van melk en ondermelk, bij extractie met verschillende oplosmiddelen.

Ether	Petroleumether	Verschil	Ether na petroleumether
3,883	3,880	0,003	0,006
3,508	3,504	0,004	0,003
3,613	3,608	0,005	0,004
0,088	0,084	0,004	0,003
0,093	0,089	0,004	0,003
Gemiddeld		0,004	0,004

zowel bij extractie met ether als met petroleumether. Tevens werden de met petroleumether uitgetrokken filters aan een na-extractie met ether onderworpen. De gevonden gemiddelde uitkomsten zijn vermeld in tabel 13. De met de na-extractie verzamelde stof is geheel onoplosbaar in kokende petroleumether, en is dus vrijwel zeker niet vetachtig. Daar de hoeveelheid bovendien gelijk is aan het verschil in vetgehalte, gevonden met de beide oplosmiddelen, is het waarschijnlijk dat dit verschil alleen veroorzaakt wordt door extractie van wat niet-vet door ether. Er wordt wel beweerd dat ether aanmerkelijk hogere gehalten zou geven dan petroleumether, maar waarschijnlijk is dan te kort geëxtraheerd, daar uittrekken met petroleumether gedurende 2 uur veelal onvoldoende is. Ook is het mogelijk dat wat condenswater op het filter bij ether-extractie minder stoort dan bij uittrekken met petroleumether.

Waarschijnlijk wordt met petroleumether vrijwel geen niet-vet onttrokken, daar een na-extractie in het geheel geen droge stof oplevert. Ook is het vet geheel kleurloos, terwijl het met ether verkregen vet enigszins bruinrood is getint. De hoeveelheid niet-vet is overigens ook bij gebruik van ether gering en bij extractie gedurende 2 uur wellicht nog minder dan de gevonden 0,004%.

3 maal werd bepaald hoeveel teruggevonden werd van aan melk, in de vorm van een hydrolysaat van botervet, toegevoegde vetzuren. De uitkomsten waren 77; 87 en 75%, gemiddeld 80%, dus wat minder dan bij *ZAP*. Dit is ook wel te verwachten, daar met het uitwassen ook wel wat vetzuren het filter zullen passeren. Ook de verschillen in uitkomst zijn niet bevreemdend, want de ene maal moet met meer water uitgewassen worden dan de andere maal.

Het verschil *ZAP–Wb* bleek voor centrifugemelk heel klein; 2 maal werd 0,001% gevonden (4-voud). Bij melk was het groter n.l. 0,014; 0,023; 0,034 en 0,023%. Nu bevat het *ZAP*-vet enig niet-vet en bovendien iets meer vrije vetzuren. Tevens zou bij *Wb* iets meer van de fosfatiden afgebroken kunnen worden, doordat langer gekookt wordt, maar anderzijds is het gebruikte zoutzuur veel minder sterk. Het is dus niet te verwachten, dat het verschil veel groter dan 0,01% is, als alleen deze oorzaken in aanmerking komen.

Om na te gaan of vet het filter passeert, werd filtraat + waswater van 8 *Wb*-bepalingen, dus van 200 ml melk, uitgeschud met een mengsel van ether en petroleumether. Dit extract werd drooggedampt, waarna het residu werd uitgetrokken met petroleumether. Deze oplossing werd 2 maal uitgeschud met 2,5% NH_3 in 50% alcohol, om niet vetachtige stoffen en vrije vetzuren te verwijderen. Na afdampen van de petroleumether bleef een rest van 12,1 mg over, dus ong. 0,006% van de oorspronkelijke melk. Deze droogrest bleek te bestaan

uit vet. Door verzepen loste de stof geheel op, en na aanzuren van deze oplossing ontstond een neerslag van vetzuren. Ook kon glycerol aangetoond worden (reactie op acroleïne na verhitten met $KHSO_4$; FEIGL, 1956). Het moet niet uitgesloten worden geacht, dat soms meer dan 0,006% vet het filter passeert.

Het volgende kan worden geconcludeerd:

1° Extractie met petroleumether is niet onvolledíger dan met ether, en geeft geen niet-vet, maar moet b.v. 4 uur duren.
2° Ook bij gebruik van ether wordt heel weinig niet-vet gevonden, n.l. 0,004% of minder.
3° Er gaat wat vet verloren door uitwassen en waarschijnlijk ook op andere wijze, b.v. 0,01....0,03% bij melk.
4° De methode is dan ook voor melk weinig reproduceerbaar, voor ondermelk beter (zie 3.7.).
5° Van vrije vetzuren en wellicht ook van fosfatiden gaat iets meer verloren dan bij *ZAP*.
6° Het is gewenst de koeler van het soxhletapparaat af te sluiten met een buisje met een droogmiddel.

3.7. REPRODUCEERBAARHEID

Voor de hier gebruikte termen, tekens en statistische methoden wordt verwezen naar het overeenkomstige hoofdstuk bij *RG* (2.8.).

In tabel 14 wordt een overzicht gegeven van de reproduceerbaarheid van de verschillende methoden, toegepast op enkele produkten. Tevens is berekend de onzekerheid van het verschil in vetgehalte bij vergelijking van verschillende voorschriften, waarbij alleen gegevens zijn vermeld van de vergelijkingen die inderdaad zijn gemaakt.

Er werden geen proeven gedaan om te toetsen of de afwijkingen in vetgehalte normaal om het gemiddelde zijn verdeeld.

Bij de gegevens van tabel 14 kunnen nog enkele opmerkingen worden gemaakt. Zowel bij ondermelk, melk als kaas is s_v bij *SBR* wat groter dan bij *ZAP* hoewel de verschillen elk niet significant zijn. Als aanvulling bij het verschil *SBR-ZAP* voor kaas, is nog interessant de reproduceerbaarheid van de hoeveelheid niet-vet, verkregen door herhaalde extractie *SBR na ZAP* (x). Hiervoor is $s_x = 0{,}010\%$ ($\varphi = 12$) en $t_{0{,}05}$. $s_{\bar{x}} = 0{,}011\%$ voor $n = 4$, dus aanzienlijk kleiner dan $t_{0{,}05}$. $s_{\bar{\Delta}}$ voor $n = 4$.

Het verschil tussen s_v bij melk en s_v bij ondermelk is voor *ZAP* kleiner dan voor *RG* (zie tabel 5). Gezien het verschil in grootte van het monster bij beide methoden ($m = 8$ resp. 11 g), heeft het zin niet s_v, maar het produkt ervan met m te vergelijken. $m \times s_v$ is dan voor ondermelk ongeveer even groot, maar voor melk is dit bij *ZAP* nogal wat kleiner. De spreiding wordt bij *ZAP* dus heel weinig beïnvloed door de hoeveelheid vet.

Bij *Wb* is de invloed van het vetgehalte echter opvallend groot, wat ook wel in overeenstemming is met de overige gegevens over deze methode. Voor melk is *Wb* alleen al om de slechte reproduceerbaarheid ongeschikt. De spreiding is bij ondermelk klein, hetgeen toegeschreven kan worden aan het grote monster en het lage vetgehalte.

Toch moet *Wb* afgeraden worden voor het bepalen van het vetgehalte van ondermelk. *RG* is de aangewezen methode. Om nu een betere reproduceerbaarheid te krijgen bij *RG*, kan men een groter aantal bepalingen doen. Het is even-

TABEL 14. De reproduceerbaarheid van de vetgehalten volgens *ZAP*, *SBR* en *Wb*, bij verschillende produkten.

	Produkt Grootte monster in g ≈ Gem. vetgehalte in % ≈	ondermelk 8* 0,08	melk 8* 3,6	room 1 35	room 2 35	kaas 3 34
ZAP	φ	41	99	5	6	16
	s_v	0,0027	0,0031	0,040	0,021	0,033
	$p = 0{,}05$ dat $\sigma_v >$	0,0032	0,0035	0,084	0,042	0,047
	$t_{0,05} . s_{\bar{v}}$ voor $n = 2$	0,0039	0,0044	0,073	0,036	0,049
	id. $n = 4$	0,0027	0,0031	0,052	0,026	0,035
	$t_{0,05} . s(\bar{v}_1 - \bar{v}_2)$ voor $n = 2$	0,0055	0,0062			
	id. $n = 4$	0,0039	0,0044			
	$\bar{d}$ (berekend uit s_v)	0,0030	0,0035	0,045	0,024	0,037
	$p = 0{,}99$ dat $d <$	0,0070	0,0080	0,103	0,054	0,085
SBR	φ	26	29			12
	s_v	0,0028	0,0036			0,038
	$p = 0{,}05$ dat $\sigma_v >$	0,0037	0,0047			0,057
	$t_{0,05} . s_{\bar{v}}$ voor $n = 2$	0,0041	0,0054			0,059
	id. $n = 4$	0,0029	0,0037			0,041
Wb	φ	14	33			
	s_v	0,0017	0,0054			
	$p = 0{,}05$ dat $\sigma_v >$	0,0025	0,0070			
	$t_{0,05} . s_{\bar{v}}$ voor $n = 2$	0,0026	0,0078			
	id. $n = 4$	0,0018	0,0055			
Verschil $\Delta =$ *SBR–ZAP*	$t_{0,05} . s_{\bar{\Delta}}$ voor $n = 2$	0,0057	0,0064			
	id. $n = 4$	0,0039	0,0048			0,052
Verschil $\Delta =$ *RG–ZAP*	$t_{0,05} . s_{\bar{\Delta}}$ voor $n = 2$	0,0050	0,0062	0,086		
	id. $n = 4$	0,0035	0,0045			
Verschil $\Delta =$ *ZAP–Wb*	$t_{0,05} . s_{\bar{\Delta}}$ voor $n = 4$	0,0032	0,0063			

* voor *Wb*: 25 g
verklaring: zie tabel 5.

wel beter het extract uit meerdere mojonnierbuizen in één vetkolfje te verzamelen. Men moet dan meer dan 1 maal uit hetzelfde kolfje de oplosmiddelen afdampen. Stel dat het extract van 4 buizen samen wordt genomen. σ_v wordt dan bijna 4 maal zo klein als van een gewone bepaling, want bij ondermelk wordt de spreiding nauwelijks bepaald door de hoeveelheid vet, noch door het wegen van het monster. Doet men de gewone bepaling in 4-voud, dan wordt $\sigma_{\bar{v}}$ slechts $\sqrt{4} = 2$ maal zo klein als σ_v, en heeft men nog iets meer werk. Zo'n vier-in-een-bepaling volgens *RG* is beter reproduceerbaar dan een bepaling volgens *Wb*, kost minder werk en duurt korter. Bovendien is de uitkomst ook juister.

Voor de methoden met zure ontsluiting werd niet de spreiding tussen series bepaald. Hoogstwaarschijnlijk zijn echter de bij *RG* dienaangaande verkregen gegevens van toepassing (zie 2.8.2.).

4. DISCUSSIE EN SAMENVATTING

In dit onderzoek werden enkele standaardmethoden voor vetgehaltebepaling op hun merites onderzocht. Hierbij zijn meer de methoden als zodanig beschouwd, dan dat is ingegaan op de toepassing op diverse produkten. Voorzover enkele van de resultaten dan ook aanleiding mogen geven tot voorstellen voor wijziging van de bestaande voorschriften, zal i.h.a. eerst nog een praktisch routine onderzoek plaats moeten vinden.

Algemeen. Bij alle gravimetrische vetgehaltebepalingen is o.m. het verwijderen van de oplosmiddelen van belang. Het bleek dat oververhitten moet worden voorkomen, omdat anders ontleding en dus verlies van vet optreedt. De condities tijdens het drogen werden zo gemaakt, dat gedurende 1 uur drogen altijd voldoende is.

De meeste moeilijkheden zijn i.h.a. te verwachten bij het wegen van de vetkolfjes. Het gevonden gewicht wordt sterk beïnvloed door temperatuur en vochtigheid van de lucht. De omstandigheden dienen hieraan te worden aangepast door tegenwichtkolfjes te gebruiken en door „acclimatiseren" van het glaswerk en de balans. Het gebruik van glazen exsiccatoren is verkeerd.

De methode RÖSE-GOTTLIEB *(RG)*. In het algemeen verstaat men tegenwoordig onder „vetgehalte" het gehalte aan vet + vetachtige stoffen. Bij modelproeven met botervet en met cholesterol, bleken deze stoffen bij *RG* geheel geëxtraheerd te worden; van vrije vetzuren ging twee derde verloren, van fosfatiden 10....15%.

Bij de gebruikelijke uitvoering van *RG* m.beh.v. mojonnierbuizen, is het niveau waarop de beide fasen scheiden van belang. Dit daalt met elke extractie door oplossen van alcohol in de etherfase. Hierdoor kan te veel vet in de buis achterblijven, waarom voorgesteld werd de gebruikelijke hoeveelheden melk en alcohol wat te verhogen, zodat althans het eerste extract vrijwel volledig kan worden afgeschonken.

Bij het uitschudden wordt zeer snel evenwicht bereikt, en lang of krachtig schudden is dan ook niet nodig en zelfs ongewenst. Wel dient men precies het voorschrift te volgen, want door wijzigingen in de extractie, b.v. uitschudden met een mengsel van ether en petroleumether, worden beslist te lage waarden verkregen. Nadat voor de eerste maal is uitgeschud, doet het er echter minder toe welk extractiemiddel wordt gebruikt. Het bleek dat de 2e en 3e extractie heel goed met petroleumether (zonder ether) kunnen worden uitgevoerd. Dit heeft enkele voordelen, vooral het vermijden van emulgering tijdens het schudden. Men probeert dit laatste veelal te voorkomen door meer alcohol te gebruiken, maar dan wordt een hoger vetgehalte gevonden, waarschijnlijk ten gevolge van uitschudden van meer niet-vet.

De hoeveelheid niet-vet is bij *RG* overigens heel gering. Het is voornamelijk uit de oppervlaktelaagjes van de vetbolletjes afkomstig, en is overwegend eiwitachtig. De hoeveelheid is bij ondermelk 0,001...0,002%, bij melk ong. 0,004% en bij room b.v. 0,05%. Waarschijnlijk bevatten deze „niet vetachtige stoffen" toch ook enig werkelijk vetachtig materiaal, en aangezien slechts een deel ervan wordt geëxtraheerd, resulteert dus naast enig niet-vet wellicht ook wat te weinig vet. De betreffende stoffen zijn b.v. in room in grote overmaat aanwezig. De geëxtraheerde hoeveelheid bleek bijna onafhankelijk van de hoeveelheid room

die in de mojonnierbuis wordt ingewogen, dus bij grotere verdunning wordt een hoger vetgehalte gevonden. Het is daarom niet aan te raden van minder dan 1,5 g room uit te gaan.

Bij room treedt overigens nog een andere moeilijkheid op. Bij verdunning met water wordt vaak een te laag vetgehalte gevonden: tot 0,6% te weinig, gemiddeld was het 0,14%. Dit kan voorkomen worden door te verdunnen met een slappe zoutoplossing. Wordt geen zout gebruikt, dan is de normale procedure juist onvoldoende om al het vet uit te schudden. Ook door toevoegen van zout aan b.v. melk of karnemelk wordt een iets hoger vetgehalte gevonden, wellicht ten dele door wat meer niet-vet, maar tevens door dan volledig extraheren van de fosfatiden. Dit is dus vooral van belang als men het fosfatidengehalte wil bepalen via het volgens *RG* verkregen vet.

Methoden met zure ontsluiting. De methode SCHMID-BONDZYŃSKI-RATZLAFF *(SBR)*, soms WERNER SCHMID genaamd, wordt vrijwel alleen nog voor kaas gebruikt. Bij nog slechts ten dele gepubliceerd werk van MULDER en medewerkers, werd deze methode omgewerkt voor uitvoering in mojonnierbuizen. Tevens werden pogingen gedaan om met zoutzuur gekookte melk direct met petroleumether te extraheren, zulks naar analogie van het affiltreren van het vet bij de methode „WEIBULL". Dit mislukte evenwel, maar door tevens alcohol toe te voegen werd een voorschrift ontwikkeld, dat alleen van *SBR* afwijkt doordat slechts met petroleumether wordt geëxtraheerd. Deze zoutzuur-alcohol-petroleumether-methode *(ZAP)* bleek voordelen te hebben boven *SBR*, vooral doordat minder niet-vet wordt uitgeschud en doordat de ontmenging van beide fasen veel sneller gaat.

Met *ZAP* wordt evenwel niet al het vet in 3 extracties verzameld, tenzij men de duur van het schudden verlengt tot b.v. 5 minuten (bij elke maal extraheren). Het rendement van de extractie is ook afhankelijk van de duur van het koken met zoutzuur: 3 minuten is ongeveer optimaal. Het bleek dat een klein deel van het vet vrij hardnekkig vastgehouden wordt in een klein emulsielaagje, dat ontstaat tijdens het uitschudden.

Bij modelproeven met vet en vetachtige stoffen, bleken *ZAP* en *SBR* dezelfde uitkomsten te geven. Botervet en cholesterol werden geheel, vrije vetzuren voor negen tiende en fosfatiden voor twee derde uitgeschud. Het verlies aan fosfatiden is te wijten aan hydrolyse door het koken met zoutzuur. Hydrolyse van vet treedt niet op, wel van eventueel reeds door enzymwerking gevormde di- en monoglyceriden.

Bij *SBR* bevat het extract nogal wat niet-vet, o.m. „schijnvet" ontstaan uit lactose door het koken met zoutzuur. De vorming hiervan wordt enigszins geremd in de aanwezigheid van caseïne, maar misschien weer bevorderd door andere melkbestanddelen. Bij langere kookduur ontstaat meer, maar ook bij langer laten staan van het gekoelde destruaat + alcohol neemt de hoeveelheid ervan toe. Het schijnvet bestaat vnl. uit hydroxymethylfurfural, levulinezuur en polymeren van furanaldehyden e.d. Tevens wordt van enkele melkbestanddelen wat geëxtraheerd, zoals van citroenzuur. Al met al wordt bij *SBR* 0,03.... 0,04% niet-vet mee bepaald bij melk en ondermelk. Bij zure produkten wordt ook nog 0,01....0,02% melkzuur uitgeschud.

Ook bij *ZAP* wordt wat niet-vet mee bepaald, n.l. ong. 0,008%. Het bestaat vrijwel geheel uit levulinezuur.

O.m. uit vergelijkende proeven van *ZAP* met *RG* werd geconcludeerd, dat bij *ZAP* een klein deel van het vet niet extraheerbaar is. De hoeveelheid is waar-

schijnlijk niet afhankelijk van het vetgehalte, en bedraagt ong. 0,01%. Bij *SBR* treedt hetzelfde op.

De methode „WEIBULL", die eigenlijk methode van BERNTROP zou moeten heten, werd aan een oriënterend onderzoek onderworpen. Het is van belang dat het filter geheel droog blijft tijdens het extraheren, wat is te bereiken door de koeler van het soxhletapparaat af te sluiten met een buisje met een droogmiddel. Petroleumether geeft een even volledige extractie als ether, indien wat langer wordt geëxtraheerd. Het heeft het voordeel, dat geen niet-vet wordt meebepaald, maar ook met ether is dit heel gering: hoogstens 0,004%. Bij *Wb* gaat iets meer van de vrije vetzuren en wellicht iets meer van de fosfatiden verloren dan bij *ZAP*. Er gaat echter ook wat zuiver vet verloren, o.m. door dat dit het filter passeert. Dus worden te lage vetgehalten gevonden. Bovendien is de methode zeer bewerkelijk.

Toepassing op zuivelprodukten. Voor wat nu de toepassing als basismethode voor het onderzoek van verschillende produkten betreft, lijkt in doorsnee *RG* het beste en *SBR* vrijwel ongeschikt, evenals *Wb*. Van ondermelk geeft *RG* nagenoeg het exacte vetgehalte, terwijl dit voor verse melk en room slechts zeer weinig te laag wordt gevonden. Voor melk is ook *ZAP* goed, doordat de fouten elkaar ongeveer compenseren, maar bij ondermelk geeft deze methode te lage uitkomsten. Bij de toepassing op melkprodukten bleek het met *ZAP* lastig al het vet te onttrekken indien de melk hoog verhit was geweest. Door nog weer langer uit te schudden, (gedurende 10 minuten) is evenwel een goed resultaat te krijgen.

RG geeft ook bij verhitte melk goede uitkomsten, evenals waarschijnlijk bij allerlei melkprodukten. Het verwarmen van de ammoniakale oplossing, zoals bij de bepaling op melkpoeder gebruikelijk is, geeft geen aanleiding tot ongewenste hydrolyse e.d. Mogelijk geeft *RG* evenwel iets te lage uitkomsten bij produkten die met hoge druk zijn gehomogeniseerd.

De meeste moeilijkheden worden ondervonden bij gesuikerde produkten. *SBR* geeft hier veel te hoge waarden door het vele schijnvet, *ZAP* veel te lage door onvolledige extractie. Vooral bij toepassing van *RG* op gesuikerde gecondenseerde melk ontstaat de reeds genoemde emulsie bij het uitschudden; dit kan voorkomen worden door voor de 2e en 3e extractie alleen petroleumether te nemen.

RG geeft te lage gehalten bij produkten waarin aanzienlijke vetsplitsing is opgetreden. *ZAP* is dan vaak beter. Men kan evenwel ook een correctie op het vetgehalte volgens *RG* aanbrengen voor vrije vetzuren. Het gehalte hiervan is eenvoudig te bepalen met de methode van FRANKEL & TARASSUK (1955). Het voorschrift werd door ons iets gewijzigd, zodat mojonnierbuizen gebruikt kunnen worden. 12 ml melk wordt na toevoegen van 12 ml alcohol, 2 maal uitgeschud met 25 ml van een mengsel van 2 delen ether en 3 delen petroleumether. Het extract wordt getitreerd met alcoholische loog; het verbruikte aantal meq. vermenigvuldigd met 1,2 is nu de aan te brengen correctie in procenten vet.

Voor kaas is *RG* weinig geschikt, o.m. door het vaak hoge gehalte aan vrije vetzuren, maar ook omdat kaas veelal niet goed op wil lossen in ammonia. Daarom verdienen de methoden met zure ontsluiting de voorkeur. *SBR* heeft het nadeel dat het ontmengen lang duurt en geeft ong. 0,06% niet vet, wat de methode dus minder geschikt doet zijn als basismethode. Met *ZAP* wordt geen niet-vet onttrokken en duurt ook het ontmengen veel korter, maar het is nodig gedurende 10 minuten te schudden bij elke extractie.

Reproduceerbaarheid. Deze is voor *RG*, *ZAP* en *SBR* heel goed bij juiste en zorgvuldige uitvoering. Bij *Wb*, toegepast op melk, is de spreiding wat groter ondanks het veel grotere monster.

Bij het onderzoek van centrifugemelk, waar de spreiding relatief het grootst is, kunnen toch zeer goede resultaten bereikt worden met een iets gewijzigde *RG*, waarbij het extract uit meerdere, b.v. 4 mojonnierbuizen in 1 vetkolfje wordt verzameld en verder behandeld.

Opgemerkt moet worden, dat een reproduceerbaarheid als in dit onderzoek verkregen, slechts bereikt kan worden bij grote ervaring en zeer nauwgezette uitvoering. In de praktijk zal men dus op een grotere spreiding moeten rekenen.

SUMMARY

Gravimetric methods for the determination of the fat content of milk and milk products[1])

In this study some standard methods for the determination of the fat content, and in particular the merits thereof, were investigated. In this respect, a method as such was mainly considered, rather than its application to the different milk products. The implication of this study may possibly lead to some suggestions as to the modifacation of the existing standards, but firstly it shall be necessary to get confirmation by means of a routine investigation.

General. In all gravimetric methods, the removal of the solvents must be given consideration. Overheating, especially when nearly all the solvents have been evaporated, must be prevented, as this leads to breakdown and thus loss of fat. Our experience has shown that the conditions during drying can be regulated in such a way, that one hour would be sufficient.

Most of the difficulties arise in the weighing of the flasks containing the fat. The temperature and the humidity of the air are important factors to contend with during weighing. To consider these conditions, a method with a counter-weight system was adopted, using a similar flask, which was given the same treatment then that of the receiving flask, as regards heating and cooling. „Acclimatization" of the glassware and the balance is also a necessity. The use of glass dessicators is not desirable.

The method of RÖSE-GOTTLIEB *(RG)*. Nowadays the term „fat content" is generally accepted to include fat and fatty substances. With model experiments it was shown, that butterfat and cholesterol are completely extracted with the *RG*-method. It was also shown that two thirds of the free fatty acids and 10 to 15% of the phospholipides are lost respectively.

In the normal execution of the method, using the Mojonnier tube, the seperating level of the phases is of importance. This level becomes lower with each extraction, as a result of the light petroleum-ether dissolving part of the alcohol. This has the effect that too much solvent (containing fat) remains in the tube. Therefore it is suggested, that the usual amounts af milk and alcohol should be enlarged, so that at least the first extraction could nearly completely be pourred off.

Partition equilibrium is attained quickly, and prolonged or heavy shaking is

[1]) De Heer J. A. LABUSCHAGNE B.Sc., Universiteit van Pretoria, Zuid-Afrika, was zo vriendelijk mij met het opstellen van de Engelse tekst te helpen.

unnecessary and even undesirable. Extraction with a mixture of ether and light petroleum definitely gives low values. After the first extraction, however, the type of solvent is of less importance. In the 2nd and 3rd extractions light petroleum (without ether) is sufficient. This has its advantage, particularely as regards the prevention of emulsion formation during shaking. Using more alcohol, the emulsion could also be prevented, but a higher fat content is then found, most probably being due to an increased amount of non-fat substances extracted.

However, the amount of non-fatty material in the *RG*-determination is quite small. It is mainly derived from the fat globule membranes, and is largely of a protein nature. The amount found in the case of skimmilk is 0.001 to 0.002%; in milk approximately 0.004%; in cream e.g. 0.05%.

Some true lipide is probably associated with the nonfat substances, and as only a part of the membrane material is extracted, some fatty substances might also be left behind. These membrane materials are e.g. present in cream in relatively large quantities. The extracted amount appears to be nearly independent to the amount of cream weighed in the Mojonnier tube, and thus the figure found for the fat content increases with higher dilutions. Therefore it will not be advisable to weigh in less than 1.5 g of cream.

In the case of cream an additional difficulty is encountered. When diluting with water, the fat content is often found too low; in extreme cases as much as 0.6%, on an average 0.14%. However, this can be prevented by diluting with a weak salt solution. The normal procedure (no salt) is not quite sufficient to extract all the fat.

The addition of salt to milk or buttermilk also causes a slightly higher fat content, probably due to the extraction of more non-fat substances and the complete extraction of phospholipides in this case. This is of particular importance for the estimation of the phospholipide content of milk etc., when the *RG*-fat is used for the purpose to determine its P-content.

Methods using acid. The method of SCHMID-BONDZYŃSKI-RATZLAFF *(SBR)*, at times called WERNER SCHMID-method, is mostly being used to determine the fat content in cheese. A modified method, in which the Mojonnier tube could be used, was devised by MULDER and coworkers. Attempts were also made for the direct extraction with light petroleum, after the boiling of milk with hydrochloric acid. However, this was not succesfull, but the additional use of alcohol gave satisfactory results. The so called „Hydrochloric acid-alcohol-light petroleum-method" *(ZAP)* was then developed, which only differs from the *SBR*-method in that the ether is omitted. This *ZAP*-method has many advantages to that of the *SBR*-method, particularely as less non-fat substances are extracted, and as the two phases seperate much faster.

The duration of shaking has to be lengthened to 5 minutes, otherwise the *ZAP*-method will give low values, due to incomplete extraction. The efficiency of the extraction is also influenced by the time of boiling with HCl. An optimum was found after 3 minutes. It appeared, that a small fraction of the fat rather remained stubbornly as an emulsion, originally caused by the shaking.

No difference between the *ZAP*- and the *SBR*-method was observed, as regards the percentage of fat and lipides extracted. In model experiments, butterfat and cholesterol were completely extracted, while only nine tenths of the free fatty acids and two thirds of the phospholipides were recovered. The loss of phospholipides is ascribed to hydrolysis, due to the boiling with HCl.

Pure fat, as such, is not hydrolyzed, but certainly are mono- and diglycerides, when present.

The extract of the *SBR*-method contains a considerable amount of non-fat substances, mostly being degradation products of the lactose. A longer boiling time, as well as a longer period of standing of the boiled liquid, have the effect that the amount of these products increases. The degradation products consist mostly of hydroxymethylfurfural, levulinic acid and polymerized furan aldehydes. In addition to this, certain milk constituents are extracted, e.g. citric acid. These non-fat substances amount to a total of 0.03 to 0.04% in the *SBR*-method in the case of milk and skimmilk, while that for sourmilk products an additional amount of 0.01 to 0.02% lactic acid is extracted.

In the case of the *ZAP*-method approximately 0.008% levulinic acid is the only non-fat substance to be extracted.

In other, and in comparative experiments between the *ZAP*- and *RG*-methods, it was concluded that a small fraction of the fat is not extracted, when the *ZAP*-method is used. This amounted probably to about 0.01% fat, which is the same for the *SBR*-method.

A pilot-experiment was conducted into the WEIBULL-method, which actually should bear the name of BERNTROP. This method proved to be unsatisfactory, the reasons being: laboriousnous; the reproducibility is poor; more fat and fatty substances get lost in comparison with the other „acid" methods.

Application to dairy products. In general, as regards the actual application, the *RG*-method seems to be the best one to be used as a standard. The *SBR*-, as well as the WEIBULL-method, is not quite suitable as a standard method.

The *RG*-method gives almost the exact fat content when skimmilk is being tested; the values found for fresh milk or cream are only very slightly low. The *ZAP*-method also proved to be satisfactory for milk, ascribed to the fact that the errors nearly compensate each other, but with skimmilk too low results are obtained. In the case of high heattreated milk products, the extraction of the fat according to the *ZAP*-method is difficult, thus necessitating prolonged shaking (10 minutes).

Various difficulties are encounterd with sweetened milk products. The *SBR*-method gives extreme high values, being due to the extraction of sugar degradation products, while on the other hand the *ZAP*-method gives extreme low values, this being due to incomplete extraction. The emulsion formation in the *RG*-method already mentioned, is accentuated in the case of sweetened condensed milk.

The *RG*-method gives low values in the case of products in which considerable fat hydrolysis has already occurred, while the *ZAP*-method, again, gives better results. However, when the free fatty acid content is known, corrections could be applied to the value determined with the *RG*-method.

As regards cheese, the *RG*-method is not quite suitable, because of the often high free fatty acid content, but mainly due to the cheese not always dissolving properly in ammonia. It is thus apparent that the „acid" methods are better. The disadvantage of the *SBR*-method is the time it takes for the two phases to separate, as well as the extraction of about 0.06% non-fat substances. In the case of the *ZAP*-method these disadvantages are not encountered, but on the other hand a long shaking time is needed (10 minutes).

Reproducibility. In exact and thoroughly conducted experiments, the

reproducibility for the *RG*-, *ZAP*- and *SBR*-methods is quite good. In the case of the WEIBULL-method, as applied to milk, the deviations are greater, in spite of the fact that a much greater sample is weighed in.

A large coefficient of variation is found with separated milk, due to its low fat content. A modification of the *RG*-method could still give accurate results, by collecting the extracts of e.g. 4 determinations in one receiving flask, and then continuing as usual.

In practice, a greater standard deviation will have to be contended with, compared with this study. Moreover, in this investigation only the deviations between duplicates were usually important, most of the cases being comparisons between different procedures. But as regards the actual fat content, other deviations may also play an important role. In practice, a fat content of milk, being the average value of two *RG*-determinations, will have an uncertainty of e.g. 0.015 % fat at the 99 % safety level.

Dit proefschrift werd bewerkt onder leiding van Prof. Dr. H. MULDER, die ik voor zijn raad en steun mijn oprechte dank betuig. Tevens dank ik de heer J. J. DE GRAAF, voor de nauwgezette uitvoering van een groot aantal analysen.

LITERATUUR

AKALSONI, S., 1927. Ch. Zentralbl. **1927–2**, 1962 (ref.).
ARCHIBALD, R. C., 1932. J. Am. Chem. Soc. **54**, 3180.
BAKALOR, S., 1955. Dairy Sci. Abstr. **17**, 885 & 981.
BALEN WALTER, B. C. VAN, 1929. Chem. Weekbl. **26**, 164.
BERNTROP, J. C., 1902. Z. Angew. Chemie **15**, 121.
BIRD, E. W. & O. F. BREAZEALE, 1931. Iowa Agr. Exp. Sta., Res. Bull., 144.
BONDZYŃSKI Sr., S., 1889. Landw. Jahrb. Schweiz **3**, 119.
BONDZYŃSKI Jr., S., 1894 Z. Anal. Chemie **33**, 186.
BUTTENBERG, P. & W. KOENIG, 1910. Z. Unters. Nahr. Genussm. **19**, 475.
CHAPMAN, O. W., 1928. J. Dairy Sci. **11**, 429.
CRAIG, L. C. & D. CRAIG, 1950. In: A. WEISSBERGER „Technique of Organic Chemistry" Vol. III, 171.
DESNUELLE, P., 1952. „Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids" Vol. I, 70.
DUIN, H. VAN, 1957. Ongepubliceerde resultaten N.I.Z.O.
DUIN, H. VAN, 1961. Bijdrage tot de „Vloeistof-Vloeistof Verdelingschromatografie der Alifaten", Diss. Amsterdam.
EISSES, J., 1948. Ongepubliceerde resultaten Rijkszuivelst.
EISSES, J., 1956. Ongepubliceerde resultaten Rijkszuivelst.
FALKENHAHN, W. V., 1957. Austr. J. Dairy Techn. **12**, 61.
FEIGL, F., 1956. „Spot Tests in Organic Analysis" 5th ed.
FLORENTIN, D., 1939. Lait **19**, 25.
FRANKEL, E. N. & N. P. TARASSUK, 1955. J. Dairy Sci. **38**, 751.
GOTTLIEB, E., 1892. Landw. Versuchsstationen **40**, 1.
GOULD, I. A., 1941. Mich. Agr. Exp. Sta., Quart. Bull. **24**, (1), 19.
GRAAFF, DE, 1908. Pharm. Weekbl. **45**, 1285.
GURD, F. R. N., 1960. In: HANAHAN, 1960, hoofdst. 8.
HÄLLQVIST, B. & L. HELLVING, 1949. Rep. XII Int. Dairy Congr., Stockholm **2**, 678.
HANAHAN, D. J., 1960. „Lipide Chemistry".
HANKINSON, C. L. & D. D. COLE, 1958. J. Dairy Sci. **41**, 703.
HERMANS, P. H., 1952. „Inleiding tot de Theoretische Organische Chemie".
HOLLAND, R. F., 1938. Diss. Cornell Univ., Ref.: J. Dairy Sci. **24**, 167.
HOLWERDA, B. J., 1936. Versl. Landbouwk. Ond. **42**, 335.
HORRALL, B. E., 1935. Purdue Univ. Agr. Exp. Sta., Bull. 401.
HOSTETTLER, H., W. LEHMAN & L. KÜNZLE, 1946. Mitt. Lebensm. Hyg. **37**, 238.

JACOBSON, C. A. & A. HOLMES, 1916. J. Biol. Chem. **25**, 29.
JENSEN, R. G. & M. E. MORGAN, 1959. J. Dairy Sci. **42**, 232.
KENDALL, M. G., 1947. „The Advanced Theory of Statistics".
KONING, C. J. & W. C. MOOY, 1916a. Pharm. Weekbl. **53**, 32.
KONING, C. J. & W. C. MOOY, 1916b. Pharm Weekbl. **53**, 50.
KOOPS, J., 1957. Ned. Melk & Zuivelt. **11**, 43.
KOOPS, J., 1958. Ned. Melk & Zuivelt. **12**, 226.
MALENGREAU & PRIGENT,1911. Z. Physiol. Chemie **73**, 68.
MARKLEY, K. S., 1947. „Fatty Acids. Their Chemistry and Physical Properties".
MOHR, W. & J. HÄSING, 1948. Milchwiss. **3**, 321.
MOHR, W. & K. KOENEN, 1952. Milchwiss. **7**, 120.
MOHR, W. & K. KOENEN, 1953. Rep. XIII Int. Dairy Congr., Den Haag **3**, 1245.
MOJONNIER, T. & H. C. TROY, 1925. „The Technical Control of Dairy Products" 2nd ed.
MORR, C. V., W. J. HARPER & I. A. GOULD, 1947. J. Dairy Sci. **40**, 964.
MORRISON, G. H. & H. FREISER, 1957. „Solvent Extraction in Analytical Chemistry".
MOUREAUX, P., 1959. Techn. Laitière **14**, (280) 17.
MULDER, H., 1942. Hand. Gen. Melkk. **1942-I**, 1.
MULDER, H. & P. M. HOOGENDIJK, 1955. Ongepubliceerde resultaten Lab. v. Zuivelbereiding, Wageningen.
MULDER, H. & P. M. HOOGENDIJK, 1956. Rep. XIV Int. Dairy Congr., Rome **3** (2), 326.
MULDER, H., P. M. HOOGENDIJK & P. WALSTRA, 1959. Rep. XV Int. Dairy Congr., Londen **3**, 1528.
MULDER, H., J. W. MENGER & J. KOOPS, 1957. Ned. Melk & Zuivelt. **11**, 263.
MULDER, H. & P. MEYERS, 1953. Rep. XIII Int. Dairy Congr., Den Haag **3**, 1317.
MULDER, H. & C. J. SCHIPPER, 1959. Ned. Melk en Zuivelt. **13**, 137.
MULDER, H. & T. A. ZUIDHOF, 1958. Ned. Melk & Zuivelt. **12**, 173.
PAYENS, T. A. J., 1959. Ned. Melk & Zuivelt. **13**, 237.
PIEN, J. & G. MAURICE, 1932. Lait **12**, 269.
POPP, M., 1904. Milchztg. **33**, 305.
RADEMA, L. & H. MULDER, 1948. Ned. Melk & Zuivelt. **2**, 204.
RADEMA, L. & H. MULDER, 1951. Ned. Melk & Zuivelt. **5**, 104.
RATZLAFF, E., 1903. Milchztg. **32**, 65.
RHODES, D. N. & C. H. LEA, 1958. J. Dairy Res. **25**, 61.
RICHMOND, H. D., 1908. Analyst **33**, 389.
RÖSE, B., 1888. Z. Angew. Chemie **2**, 100.
SABALITSCHKA, T., 1941. Ber. Deutsche Chem. Ges. **74**, 1040.
SANDBERG, U. H., 1959. Rep. XV Int. Dairy Congr., Londen **3**, 1552.
SANDELIN, A. E., 1941. Meyerit. Aikak. 3, 138.
SCHEEL, K. C., 1936. Z. Anal. Chemie **105**, 256.
SCHLOEMER, A. & K. RAUCH, 1942. Z. Unters. Lebensm. **83**, 289.
SCHMID, W., 1888. Z. Anal. Chemie **27**, 464.
SCHWARZ, G. & F. WOERNER, 1960. Kieler Milchw. Forschb. **12**, 319.
SEUSS, A., F. KIERMEIER, G. LANG & H. TEUFEL, 1955. Milchwiss. **10**, 85.
SJOLLEMA, B., 1904. Chem. Weekbl. **1**, 431.
SNEDECOR, G. W., 1956. „Statistical Methods" 5th ed.
Society of Public Analysts 1936. Analyst **61**, 105.
STADHOUDERS, J. J., 1956. Med. Landbouwhogeschool **56** (11).
STARR, M. P. & B. L. HERRINGTON, 1941. J. Dairy Sci. **24**, 165 & 807.
STIGEN, A. L., 1956. Rep. XIV Int. Dairy Congr., Rome **3** (2), 580.
STOLDT, W., 1951. Milchwiss. **6**, 152.
STOLDT, W., 1952. Milchwiss. **7**, 232.
SWAVING, A. J., 1939. Lait **19**, 573.
TARASSUK, N. P. & E. N. FRANKEL, 1954. J. Dairy Sci. **37**, 646.
TERRIER, J., 1949. Mitt. Lebensm. Hyg. **40**, 245.
UTZ, 1913. Milchw. Zentralbl. **42**, 457.
VISSER, H. L., 1904. Chem. Weekbl. **1**, 424.
WAL, G. H. VAN DER & J. J. WIJS, 1908. Pharm. Weekbl. **45**, 661 & 1208.
WEIBULL, M., 1892. Z. Angew. Chemie **5**, 450.
WEIBULL, M., 1898. Milchztg. **27**, 406.
WEIBULL, M., 1906. Z. Unters. Nahr. Genussm. **11**, 736.
WENGER, G., 1915. Milchw. Zentralbl. **44**, 324.
WILLART, S., R. NILSSON & Y. RASMUSSON, 1959. Milk & Dairy Res., Alnarp, Rep. 57.