

Lab. Zuivel  
VERSLAG 81.45

4 maart 1981  
Pr.nr. 505.6090

Onderwerp: Bepaling van het ijzergehalte  
van botervet.

Bijlagen: Verslag en ontwerp voorschrift.

Verzendlijst: Van Doesburgh, adj. directeur, sektorhoofd (3x), Directie VKA, afd. Normalisatie, afd. Projectbeheer, afd. Zuivel (7x), A. Hoff, leesportefeuille (5x), Klomp (directie VZ),

Laboratorium Zuivel  
Verslag 81.45

Datum: 4 maart 1981  
Pr.nr. 505.6090

Project: Normalisatie/harmonisatie van onderzoekmethoden voor melk- en zuivelprodukten.

Onderwerp: Bepaling van het ijzergehalte van botervet.

Bijlagen: Verslag en ontwerp voorschrift.

---

Doel

Het vinden van een methode voor de bepaling van een laag gehalte ijzer in botervet.

Samenvatting:



Er bestaan 3 voorschriften voor de Fe-bepaling. In twee van deze wordt de  $\text{NH}_4\text{CNS}$ -kleuring toegepast. (Intern voorschrift B 79 en NIZO-voorschrift rood 994).

In het NIZO voorschrift le ontwerp aug. 1972 wordt uitgegaan van de bathofenantrolinekleuring. Alle voorschriften hebben een verschillende ontsluitingsmethode. Al deze ontsluitingsmethoden en de ontsluitingsmethode voor de bepaling van het kopergehalte (NEN 3713) zijn getest.

Conclusie:

De ontsluitingsmethode volgens NEN 3713 in combinatie met de bathofenantrolinekleuring voldoet het best.  $< 0,05$  ppm ijzer is aantoonbaar. Bovendien kan de ijzer en koperbepaling nu tegelijkertijd uitgevoerd worden.

---

Verantwoordelijk: ir H. Oortwijn   
Medewerker/samensteller: D.M. van Mazijk-Bokslag 

Voor alle bepalingen en ijklijnen is het glaswerk gereinigd met warme 10% HNO<sub>3</sub>.

#### Kleuring.

Het aanwezige ijzerion wordt met behulp van 1,7-difenyl-1,10 fenantroline omgezet in een rood complex. Dit complex wordt geconcentreerd door extractie met iso-amylalcohol. De rode kleur wordt fotometrisch bepaald.

#### Uitvoering

De kleuring gaat als volgt: 10 ml monsteroplossing + 10 ml ged. water + 3 ml hydroxylammoniumchlorideoplossing + 20 ml Na-acetaatoplossing aanvullen tot 50 ml. 10 ml bathofenantroline oplossing (1,7-difenyl - 1,10 fenantroline in iso-amylalcohol) toevoegen, 1 min schudden en centrifugeren. Van de roodgekleurde bovenlaag de extinctie bij 533 nm meten tegen iso-amylalcohol.

#### IJzer-toevoegingen

Het ijzer kan niet in een waterige oplossing aan botervet toegevoegd worden omdat het in botervet aanwezige ijzer ook niet in een waterige fase zit, maar opgelost is in de vetfase.

IJzer (III)chloride is oplosbaar in glycerol, aceton en ether.

Toevoeging 2 ppm:

4,84 g FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O → 100 g glycerol/10 g →

100 g glycerol/1 g → 500 g botervet.

Het botervet bevat dan 20 µg/10 g of 2 ppm toegevoegd ijzer.

Ijklijn (10 - 25 µg/10 g = 1 - 2,5 ppm)

967,4 mg FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O → 100 ml/5 → 100 ml

10 → 100 ml/1 ml = 10 µg
15 → 100 ml/1 ml = 15 µg
20 → 100 ml/1 ml = 20 µg
25 → 100 ml/1 ml = 25 µg

	E 533 nm	<u>E 533 nm - bl. 100</u> µg
10 µg	0,537	5,3
15 µg	0,813	5,4
20 µg	1,089	5,4
25 µg	1,297	5,2
bl.	0,008	

### Ontsluiting

De volgende ontsluitingsmethoden zijn mogelijk:

A. Rood 994, def. ontwerp. Bepaling van het ijzergehalte van boter en botervet. febr.'72.

25,0 g botervet afwegen in een droge centrifugebuis.

25,0 ml 20% HCl en ca. 20 ml CCl<sub>4</sub> toevoegen.

De buis gedurende 30 min in een waterbad van 60°C plaatsen en regelmatig zwenken.

Dan de buis 15 min zodanig koelen dat de tetra en de zoutzuurlaag afkoelen en de vetlaag vloeibaar blijft. 1 min schudden, centrifugeren en van de bovenlaag (= HCl-laag) 10,0 ml in een centrifugebuis pipetteren (= 10 gram botervet).

Kleuring uitvoeren.

B. NEN 3713. Bepaling van het kopergehalte van boter en botervet.

Als A, alleen de 25,0 ml 20% HCl wordt vervangen door 25,0 ml 15% TCA (trichloorazijnzuur) oplossing.

C. Een variant op NIZO-voorschrift le ontwerp.

Bepaling van het ijzergehalte van boter en botervet met bathofenantroline. aug.'72.

Oorspronkelijk: Weeg 20,0 g botervet af in een droge Kjeldahlkolf en voeg ca. 4 ml water toe.

Voeg ca. 8 ml HNO<sub>3</sub>(1,42 g/ml) toe en verwarm de kolf onder regelmatig schudden in een waterbad van 80°C gedurende 1 uur. Koel af en zuig zoveel mogelijk vet af. Breng 10 ml p.e. of pentaan in de kolf, zwenk zodat het vet in de p.e. (pentaan) oplost en zuig de p.e.(pentaan)laag zoveel mogelijk af. Herhaal deze bewerking nog eenmaal.

Damp het restant van de p.e. af. Voeg glaskralen en 1,5 ml gec.  $H_2SO_4$  toe. Verhit tot de vloeistof lichtgeel tot kleurloos is geworden. Voeg zonodig nog enige keren  $HNO_3$  toe. Verhit totdat er witte nevels ontstaan. Koel af, voeg  $H_2O_2$  toe, verhit tot er witte nevels ontstaan. Koel af en indien de oplossing nog gekleurd is, herhaal dan de behandeling met waterstofperoxide. Voer dan de kleuring uit.

Omdat er bij botervet niets te destrueren is kan de hele destructie vervallen. Daardoor bestaat er ook minder kans op besmetting met ijzer.

Variant:

Weeg 10 gram botervet af in een droge buis. Voeg 10,0 ml 20% HCl toe. Zet de buis gedurende 1 uur onder regelmatig schudden in een waterbad van  $80^\circ C$ . Koel af tot  $40^\circ C$  en zuig het vet af. Voeg 3 x 10 ml p.e. of pentaan toe, zwenk en zuig de p.e. of pentaan af. Voer dan de kleuring uit.

D. Intern voorschrift nr B 79 1e oplage sept. '67.

Weeg 25,0 g botervet af in een erlenmeijer, voeg 25,0 ml 20% HCl toe en kook een tijd onder terugvloei koeling. Laat de oplossing in de koelkast afkoelen tot het vet gestold is. Prik gaatjes in de vetlaag en pipetteer 10 ml uit de HCl laag in een centrifugebuis. Voer de kleuring uit.

Deze vier methoden zijn toegepast op botervet waaraan 2 ppm ijzer was toegevoegd.

A: 1,50 - 1,52 ppm = 76%

B: 1,82 - 1,92 ppm = 93,5%

C: 1,10 - 1,24 ppm = 58,5%

D: 2,17 - 2,60 ppm = 119%.

Extinctie blanco bepaling methode D met koken: 0,077

zonder koken: 0,014.

Naar aanleiding van deze resultaten zijn de methodes A en C geschrapt.

Methode A en B hebben veel overeenkomst.

Methode B is gekozen omdat dit de koperbepaling is zodat ijzer en koper tegelijkertijd bepaald zouden kunnen worden.

Resultaten methode B:

1,88 ppm; 1,88 ppm; 1,80 ppm, 1,78 ppm; 1,75 ppm; 1,74 ppm.

Gemiddeld over 6 bepalingen: 1,82 ppm = 91%.

De extincties van de blanco bepalingen waren 0,033 en 0,034 bij 533 nm. De extincties van de bepalingen liepen van 0,970 - 1,044.

Methode D is nog eens getest nadat het glaswerk met 20% HCl is uitgekookt.

Resultaten methode D:

1,81 ppm; 1,87 ppm; 1,84 ppm; 1,78 ppm; 1,80 ppm.

Gemiddeld over 5 bepalingen: 1,82 ppm = 91%.

De zesde bepaling is verloren gegaan door kookvertraging. Bij deze methode is het slechte koken een groot nadeel. Gebruik van puimsteen is niet mogelijk, glaskralen blijven ijzer afgeven zodat men kwartsparels moet gebruiken. De werking van kwartsparels is veel minder zodat er regelmatig kookvertraging optreedt. Voor een behoorlijke menging van botervet en zoutzuur is het nodig flink door te koken.

De resultaten van de methodes B en D zijn gelijk. Vanwege de kookproblemen bij methode D en omdat methode B de koperextractie is, is voor methode B gekozen.

#### Methode B

IJKlijjn: (0,05 - 3 ppm).

967,4 mg FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O → 100 ml / 5 ml → 100 ml / 2 ml → 200 ml /

5 ml → 100 ml / 10 ml = 0,5 µg

10 ml → 100 ml / 10 ml = 1,0 µg

15 ml → 100 ml / 10 ml = 1,5 µg

20 ml → 100 ml / 10 ml = 2,0 µg

25 ml → 100 ml / 10 ml = 2,5 µg

30 ml → 100 ml / 10 ml = 3,0 µg

	E 533 nm				E gem - E blanco	$100 \times \frac{E}{\mu\text{g}}$
0,5 $\mu\text{g}$	0,037	0,041	0,034	0,032	0,030	6,0
1,0 $\mu\text{g}$	0,074	0,071	0,061	0,064	0,062	6,2
1,5 $\mu\text{g}$	0,093	0,093	0,088	0,085	0,085	5,7
2,0 $\mu\text{g}$	0,127	0,122	0,117	0,117	0,115	5,8
2,5 $\mu\text{g}$	0,156	0,157	0,148	0,146	0,146	5,8
3,0 $\mu\text{g}$	0,187	0,185	0,184	0,178	0,178	5,9
blanco	0,003	0,003	0,005	0,006		

Botervet met 0,2 ppm ijzer: 50 g botervet met 2 ppm verdund tot 500 g met botervet = botervet met 0,2 ppm.

Resultaten: 0,16 ppm; 0,16 ppm; 0,18 ppm; 0,18 ppm; 0,17 ppm; 0,18 ppm; 0,19 ppm; 0,19 ppm; 0,19 ppm. 0,16 ppm.

Gemiddelde van 10 bepalingen: 0,18 ppm = 90%.

Omdat het ijzer met 15% TCA-oplossing uit het botervet geextraheerd wordt, zijn de standaardoplossingen voor de ijklijn ook met TCA gemaakt. De blanco ligt voor de TCA-oplossingen hoger dan bij de oplossingen van  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  die met HCl aangezuurd zijn, maar de blanco-extinctie is nu hetzelfde als de blanco bij de monsters. De blanco-waarde komt dus uit de TCA.

Om een meer geconcentreerde kleur te krijgen is nu met 4,0 i.p.v. 10,0 ml bathofenantroline-oplossing uitgeschud en gemeten in vierkante 1 cm kuvetten i.p.v. ronde kuvetten van 1,5 cm  $\phi$ .

IJKlijn met 4,0 ml bathofenantroline-oplossing in 1 cm kuvetten en ijzerstandaardoplossingen in TCA.

967,4 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 100 \text{ ml} / 5 \text{ ml} \rightarrow 100 \text{ ml} / 2 \text{ ml} \rightarrow 200 \text{ ml} /$

1 ml  $\rightarrow 100 \text{ ml} / 10 \text{ ml}$ , kleuring  $\rightarrow 4 \text{ ml}$  (0,1  $\mu\text{g} / 4 \text{ ml}$ )

3 ml  $\rightarrow 100 \text{ ml} / 10 \text{ ml}$ , kleuring  $\rightarrow 4 \text{ ml}$  (0,3  $\mu\text{g} / 4 \text{ ml}$ )

5 ml  $\rightarrow 100 \text{ ml} / 10 \text{ ml}$ , kleuring  $\rightarrow 4 \text{ ml}$  (0,5  $\mu\text{g} / 4 \text{ ml}$ )

10 ml  $\rightarrow 100 \text{ ml} / 10 \text{ ml}$ , kleuring  $\rightarrow 4 \text{ ml}$  (1,0  $\mu\text{g} / 4 \text{ ml}$ )

15 ml  $\rightarrow 100 \text{ ml} / 10 \text{ ml}$ , kleuring  $\rightarrow 4 \text{ ml}$  (1,5  $\mu\text{g} / 4 \text{ ml}$ )

20 ml  $\rightarrow 100 \text{ ml} / 10 \text{ ml}$ , kleuring  $\rightarrow 4 \text{ ml}$  (2,0  $\mu\text{g} / 4 \text{ ml}$ )

	E 533 nm				E gem - E blanco	$\frac{E}{100 \times \mu\text{g}}$
0,1 $\mu\text{g}$	0,053	0,054	0,052	0,053	0,017	17
0,3 $\mu\text{g}$	0,068	0,067	0,070		0,032	11
0,5 $\mu\text{g}$	0,087	0,087	0,086	0,087	0,051	10
1,0 $\mu\text{g}$	0,134	0,136	0,092		0,097	10
1,5 $\mu\text{g}$	0,185	0,188			0,151	10
2,0 $\mu\text{g}$	0,226	0,233			0,194	10
blanco	0,034	0,036	0,036	0,037		

Botervet met 0,05 ppm ijzer-toevoeging.

Om botervet met 0,05 ppm Fe te maken moet men uitgaan van Fe-vrij botervet. De L.H. heeft boter gemaakt met zo min mogelijk gebruik van ijzer. Deze boter is hier op het RIKILT gesmolten, gecentrifugeerd en afgefiltreerd over watervrij  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in met salpeterzuur gereinigd glaswerk zodat het zelf gemaakte water vrije botervet vrij moet zijn van ijzerbesmetting. De extincties van de oplossingen van het zelf-gemaakte botervet waren 0,003 en 0,003. Dit is minder dan 0,002 ppm Fe.

1,21 gram  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 100 \text{ ml aceton} / 4 \text{ ml} \rightarrow 100 \text{ ml aceton} / 5 \text{ ml} \rightarrow 100 \text{ ml aceton} / 1 \text{ ml} + 100 \text{ g botervet}$  en al roerend verwarmd tot alle aceton verdwenen was.

Resultaten: 0,045 ppm: 0,043 ppm: 0,041 ppm: 0,043 ppm.

Gemiddeld: 0,043 ppm = 86%.

Eenmaal is er bij het monster van botervet met 0,05 ppm Fe een verdunningsfout gemaakt zodat er i.p.v. 0,05 ppm 0,01 ppm Fe toegevoegd is.

Resultaat: 0,012 ppm.

Vergelijking van Fe bepaling in botervet m.b.v. a.a.s. en de bathofenantroline-methode.

Als Fe-toevoeging is tris [1-phenylbutandionato-(1,3)] - ijzer III gebruikt. Dit is een vetoplosbare ijzerstandaard waarvan 10,07 gram gelijk staat aan 1 gram ijzer

1,007 g Fe-standaard  $\rightarrow$  100 g botervet

1 g  $\rightarrow$  100 g botervet (het gebruikte botervet is monster III)

4 g  $\rightarrow$  200 g botervet (monster I, 0,2 ppm toegevoegd)

1 g  $\rightarrow$  200 g botervet (monster II, 0,05 ppm toegevoegd)

2 g  $\rightarrow$  200 g botervet (monster V, 0,10 ppm toegevoegd).



Het botervet gebruikt voor de verdunningen van de monsters II en V is monster IV.

Resultaten in ppm:

	Berekend	met bathofenantroline	met a.a.s.	bathof. - a.a.s.
I	0,38	0,46 - 0,44	0,37 - 0,43	0,05
II	0,06	0,05 - 0,05	0,08 - 0,07	- 0,025
III		0,18 - 0,18	0,13 - 0,09	0,07
IV		0,01 - 0,02	0,05 - 0,06	- 0,04
V	0,11	0,11 - 0,11	0,09 - 0,08	0,025
				$\sum d$ 0,080
				$\bar{d}$ 0,016
				sd 0,047
				$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{sd} = 0,76$

$t < 2,78$  bij  $p = 0,05$  zodat er geen significant verschil is tussen de a.a.s. en de bathofenantroline-methode.

Dezelfde monsters als gebruikt voor de vergelijking a.a.s. en bathofenantroline-methode zijn ingezet volgens de IDF methode (E-doc 127). De IDF-methode heeft dezelfde kleuring met bathofenantroline maar het ijzer wordt uit het botervet geïsoleerd door uitschudden met sterk salpeterzuur gevolgd door een destructie. Bij gebrek aan meer monster zijn I, IV en V in enkelvoud ingezet. Bij de destructie zijn de nr I en IV verloren gegaan door kookvertraging. Bij het uitschudden met de bathofenantroline is de blanco-bepaling verloren gegaan. Dus zijn er geen resultaten bij de IDF-methode. De IDF methode is naast de bathofenantroline nog eenmaal gedaan. Hiervoor zijn nieuwe monsters met ijzertoevoegingen gemaakt.

Als Fe-toevoeging is weer tris [1-phenylbutandionato-(1.3)] - ijzer III gebruikt.

25,2 mg Fe-standaard in 50 g botervet/1 g  $\rightarrow$  50 g botervet/20 g  $\rightarrow$  100 g (= A = 0,20 ppm toegevoegd) en 5 g  $\rightarrow$  100 g (= B = 0,05 ppm toegevoegd). Het botervet waarin is opgelost en mee is aangevuld is monster C.

nr	IDF methode					TCA-bathofenantroline				
	E 533 nm	$\mu\text{g}$ in meetopl	ppm	$\bar{x}$	$\bar{x}-c$	E 533 nm	$\mu\text{g}$ in meetopl	ppm	$\bar{x}$	$\bar{x}-c$
A1	0,677	4,16	0,415	0,58	0,41	0,117	1,22	0,253	0,248	0,22
A2	0,957	7,52	0,750			0,116	1,21	0,242		
B1	0,664	4,01	0,382	0,61	0,43	0,071	0,67	0,066	0,067	0,04
B2	1,005	8,10	0,833			0,079	0,76	0,068		
C1	0,378	0,56	0,055	0,17		0,037	0,26	0,026	0,028	
C2	0,567	2,84	0,290			0,040	0,30	0,029		
b1	0,140					0,013				
b1	0,519					0,017				

Bij de IDF methode moet ergens een besmetting optreden die met de blanco-bepaling niet verrekend wordt.

Conclusie:

De voorkeur gaat uit naar de TCA-bathofenantroline-methode omdat deze methode betere resultaten geeft dan de IDF-methode en geen significante verschillen geeft met de a.a.s.methode. Bovendien duurt de IDF-bepaling 3 dagen en de TCA-bathofenantroline-ijzerbepaling een halve dag, waarbij de koperbepaling tegelijkertijd gedaan kan worden.

Bepaling van het ijzergehalte van botervet en boter.

1. Onderwerp en toepassingsgebied.

Deze norm beschrijft een methode voor de bepaling van het ijzergehalte van botervet en boter.

2. Definitie.

IJzergehalte: het gehalte aan ijzer, bepaald volgens de beschreven werkwijze en uitgedrukt in mg ijzer per kg.

3. Beginsel.

Het in een gewogen hoeveelheid van het monster aanwezige ijzerion wordt met behulp van 1,7 - difenyl - 1,10 fenantroline (bathofenantroline) omgezet in een rood complex. Dit complex wordt geconcentreerd door extractie met iso-amylalcohol. De rode kleur wordt fotometrisch bepaald.

4. Reagentia en hulpstoffen.

Alle reagentia moeten minstens van pro analyse kwaliteit zijn.

4.1 Trichloorazijnzuuroplossing

Los 150 g trichloorazijnzuur op in tweemaal gedestilleerd water en vul aan tot 1000 ml. Bewaar de oplossing koel en in een bruine fles.

4.2 Koolstoftetrachloride.

Destilleer, indien nodig, de vloeistof voor gebruik met behulp van ijzervrij glaswerk.

4.3 Hydroxylammoniumchloride-oplossing.

Los 20 g hydroxylammoniumchloride op in water en vul aan tot 100 ml. Schud de oplossing zo vaak uit met de bathofenantroline-oplossing (4.5) tot de iso-amylalcohollaag kleurloos blijft.

4.4 Natriumacetaatoplossing.

Los 232,5 g natriumacetaat.watervrij op in 500 ml water. Voeg 3 ml hydroxylammoniumchloride (4.3) toe en schud de oplossing zo vaak uit met de bathofenantroline-oplossing (4.5) tot de iso-amylalcohollaag kleurloos blijft.

- 4.5 Bathofenantroline-oplossing.  
Los 83,1 mg 4,7-difenyl-1,10 fenantroline op in iso-amylalcohol en vul aan tot 100 ml.
- 4.6 Standaard ijzeroplossing (2 mg/ml).  
Los 967,4 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  op in de trichloorazijnzuur (4.1) en vul aan tot 100 ml.
- 4.7 Verdunde standaard ijzer-oplossing (0,1 mg/ml).  
Pipeteer 5 ml van oplossing 4,6 in een maatkolf van 100 ml en vul aan met trichloorazijnzuur(4.1).
- 4.8 Verdunde standaard ijzeroplossing (0,001 mg/ml).  
Pipetteer 1 ml van oplossing 4.7 in een maatkolf van 100 ml en vul aan met trichloorazijnzuur (4.1).
- 4.9 Aceton.
5. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen.  
Reinig het glaswerk met warme 10% salpeterzuur. Spoel het glaswerk driemaal met water en daarna driemaal met gedestilleerd water. Droog het, voor zover nodig, door spoelen met aceton.
- 5.1 Balans, waarop tot op 0,1 g kan worden gewogen.
- 5.2 Centrifuge met een toerental van meer dan 500 omwentelingen per minuut.
- 5.3 Centrifugebuizen van 100 en 50 ml met bijbehorende stoppen van glas of kunststof.
- 5.4 Maatkolven van 100 ml.
- 5.5 Volpipetten van 1, 3, 4, 5, 10, 15, 20 en 25 ml.
- 5.6 Maatpipetten van 5, 10 en 25 ml met een schaalverdeling in 0,1 ml.
- 5.7 Maatcilinder van 25 ml.
- 5.8 Waterbad van 60°C.
- 5.9 Koelbad met een konstant niveau van stromend water.
- 5.10 Elektrische fotometer, geschikt voor het meten bij een golflengte van 533 nm met bijbehorende cuvetten met een optische weglengte van 1 cm.
6. Monsterneming.  
Zie voor de monsterneming van botervet NEN 3704 en voor die van boter NEN 3701. Vermijd besmetting met ijzer.

7. Voorbehandeling.

Onderwerp het monster slechts dan aan de in NEN 3705 (voor botervet) of NEN 3702 (voor boter) beschreven voorbehandeling, indien het zichtbaar niet homogeen is.

Vermijd daarbij besmetting met ijzer.

8. Werkwijze.

8.1 Bepaling.

Vermijd bij de uitvoering van de bepaling elke besmetting met ijzer.

8.1.1 Weeg 25,0 g van het analysemonster af in een droge centrifugebuis van 100 ml.

8.1.2 Pipeteer 25 ml trichloorazijnzuur in de centrifugebuis en voeg ca. 20 ml koolstof-tetrachloride toe.

8.1.3 Plaats de buis in het waterbad (5.8). Zwenk na 10 min. de buis met een draaiende beweging zodanig rond, dat de drie (bij botervet) of vier (bij boter) gevormde lagen gescheiden blijven (van boven naar beneden: gesmolten botervet, eiwitneerslag alleen bij boter, trichloorazijnzuuroplossing en koolstof-tetrachloride waarin een weinig vet is opgelost). Zet de buis opnieuw in het waterbad. Herhaal dit rondzwenken tweemaal, steeds nadat de buis 10 minuten in het waterbad heeft gestaan. Zet de buis daarna zodanig in het koelbad (5.9) dat slechts de koolstofftetrachloridelaag en een gedeelte van de laag met trichloorazijnzuuroplossing direkt door het stromende water worden afgekoeld en het botervet vloeibaar blijft.

8.1.4 Sluit na 15 min de centrifugebuis met de bijbehorende stop en schud de buis krachtig gedurende ca. 1 min. Centrifugeer gedurende 5 tot 10 min.

In plaats van te centrifugeren kan men de buis ook enige uren laten staan.

8.1.5 Pipetteer uit de bovenste vloeistoflaag (de trichloorazijnzuuroplossing) 10 ml in een centrifugebuis van 50 ml.

Voeg achtereenvolgens toe 10 ml gedestilleerd water, 3 ml hydroxylammoniumchlorideoplossing (4.3), 20 ml natriumacetatoplossing (4.4) en 4,0 ml bathofenantrolineoplossing (4.5) toe. Sluit de buis met de bijbehorende stop en schud de buis krachtig gedurende 1 minuut. Centrifugeer de buis gedurende 5 tot 10 min tot de iso-amylalcohol laag volkomen helder is.

8.1.6 Breng met behulp van een maatpipet een voldoende hoeveelheid van de iso-amylalcohollaag in een cuvet.

Meet de extinctie van de roodgekleurde iso-amylalcohollaag bij 533 nm tegen iso-amylalcohol.

8.1.7 Verricht een blanco bepaling volgens 8.1.2 tot en met 8.1.6.

8.2 Ijkgrafiek.

8.2.1 Pipetteer in vijf maatkolven van 100 ml resp. 0 ml; 1,0 ml; 3,0 ml; 5,0 ml en 10,0 ml van de verdunde standaardijzeroplossing (4.8) en vul de inhoud aan met de trichloorazijnzuuroplossing (4.1).

8.2.2 Pipetteer uit elke maatkolf 10 ml in een centrifugebuis overeenkomend met 0  $\mu\text{g}$ ; 0,1  $\mu\text{g}$ ; 0,3  $\mu\text{g}$ ; 0,5  $\mu\text{g}$ ; en 1,0  $\mu\text{g}$  per 10 ml.

8.2.3 Handel verder als omschreven in 8.15 en 8.16.

8.2.4 Zet in een grafiek de extincties tegen de hoeveelheden ijzer uit. Trek door de punten de best passende rechte. Construeer de ijklijn evenwijdig aan deze rechte door de oorsprong.

9. Berekening.

9.1 Bereken het extinctieverschil  $E - E_0$

waarin  $E$  = extinctie verkregen bij het onderzoek van het monster en  $E_0$  = extinctie verkregen bij het onderzoek van de blancobepaling volgens 8.1.7.

9.2 Bereken uit het extinctieverschil met behulp van de ijkgrafiek het ijzergehalte per 10 ml oplossing.

9.3 Voor botervet:  $\mu\text{g}/10 \text{ ml} \times 25/10 \times 1/25 = \mu\text{g}/\text{gram} = \text{mg}/\text{kg}$   
voor boter :  $\mu\text{g}/10 \text{ ml} \times 29/10 \times 1/25 = \mu\text{g}/\text{gram} = \text{mg}/\text{kg}$ .