

DE BEPALING VAN PHOSPHATIDEN IN KARNEMELK

DOOR

H. MULDER

(Ingezonden 31 Augustus 1942)

LITERATUUROVERZICHT

Over het bepalen van het fosphatidegehalte van zuivelproducten is reeds veel geschreven en er zijn verscheiden methoden voor aanbevolen. Men is het echter niet eens geworden over de bruikbaarheid van de methoden, terwijl er verschil van meening bestaat over de hoeveelheid fosphatiden die in zuivelproducten voorkomt.

De methoden kunnen niet worden getoetst door ze toe te passen op zelfgemaakte suspensies van fosphatiden, b.v. van lecithine, in water, omdat niet bekend is welke fosphatiden in melk voorkomen en in welke vorm ze aanwezig zijn. Het is ook niet practisch uitvoerbaar om de fosphatiden in een zuiveren toestand of aan een specifiek reagens gebonden af te scheiden en te wegen. De fosphatiden onderscheiden zich vooral van andere vetachtige stoffen en van vetten, doordat ze fosfor bevatten. Hiervan maakt men bij de analyse meestal gebruik. De fosphatiden worden met behulp van geschikte oplosmiddelen uit de melkproducten geëxtraheerd, waarna in het extract een fosphorbepaling wordt uitgevoerd. Uit het fosphorgehalte wordt het gehalte aan fosphatiden berekend.

a. De berekening van het fosphatidegehalte naar aanleiding van fosphorbepalingen

De bepaling van het fosphorgehalte van de „fosphatiden” levert geen principieele moeilijkheden op. Het is echter niet mogelijk om uit het cijfer voor het fosphorgehalte de hoeveelheid fosphatiden op een volkomen juiste wijze te berekenen. Melkproducten bevatten n.l. niet één fosphatide, doch een mengsel van dergelijke stoffen. Zoo heeft men gemeend twee monoaminophosphatiden (lecithine en cephaline) en een diamino-phosphatide (sphingomyeline) aan te kunnen toonen. Met zekerheid is het voorkomen van deze stoffen in melk echter niet bewezen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Voor de verhouding, waarin deze stoffen naast elkaar voorkomen vindt men in de literatuur sterk uiteenlopende cijfers. BISCHOFF (4) b.v. zegt, dat lecithine en cephaline in de verhouding 2 : 1 aanwezig zijn; SASAKI (37) en HIRATSUKA noemen de verhouding 1 : 2,33; volgens KOCH en WOODS (22) moet dit zijn 1 : 1 en volgens REWALD (35) 1,4 : 1. KURTZ (23) vond voor de verhouding: lecithine : cephaline : sphingomyeline, 8,4 : 4,5 : 1. Behalve over de verhouding, waarin de verschillende fosphatiden naast elkaar voorkomen, verschilt men van meening

454249

over de samenstelling van deze stoffen zelf. Volgens de meeste onderzoekers b.v. is lecithine een onverzadigde verbinding, hoewel men het er niet over eens is welke vetzuurresten in het lecithinemolecuul voorkomen; sommigen echter zeggen, dat lecithine geen dubbele binding bevat. Het lijkt niet onmogelijk, dat de fosphatiden, die in melk worden gevonden, evenals natuurlijke vetten een wisselende samenstelling hebben en dat ze bovendien niet altijd in dezelfde verhouding naast elkaar aanwezig zijn. Dit maakt het echter onmogelijk om uit een phosphorbepaling het gehalte aan fosphatiden nauwkeurig te berekenen. Dikwijls heeft men zich uit de moeilijkheid gered door aan te nemen, dat er slechts één fosphatide in melk voorkomt en dat dit distearyllecithine is, dat ca 3,84 % P bevat (b.v. CHAPMAN (10); BIRD, BREAZEALE en SANDS (2, 3). HORRALL (20) ging van de veronderstelling uit, dat alles stearoëlecithine is; deze verbinding bevat 3,86 % P. Anderen veronderstelden bij hun berekening, dat er behalve lecithine ook cephaline in melk aanwezig is en dat de beide stoffen in een onderlinge verhouding 1 : 1 voorkomen (b.v. WRIGHT, Holm en DEYSHER (18)); ze berekenden een gemiddeld phosphorgehalte van bijna 4 %. Ook schijnen sommige onderzoekers eenvoudigheidshalve een phosphorgehalte van 4 % te hebben aangenomen. Daar we vrij zeker te doen hebben met een mengsel van lecithine en cephaline, en sphingomyeline, dat volgens eenige literatuuropgaven ook aanwezig is, eveneens ca. 4 % phosphor bevat, *lijkt de veronderstelling, dat de fosphatiden van de melk gemiddeld 4 % phosphor bevatten, wel te verdedigen*. Volgens een recente mededeeling van HILDITCH en MADDISON (21), die tegenwoordig voor ons niet toegankelijk is, bevatten de melkphosphatiden vrij veel hogere vetzuren, zoodat het niet onmogelijk is, dat het phosphorgehalte iets lager dan 4 % zal zijn.

Een andere groep onderzoekers, o.a. MOHR en MOOS (27), berekent geen fosphatidegehalte, doch vermeldt alleen het resultaat van de phosphorbepaling. Ofschoon dit wetenschappelijk juist is, is het toch min of meer een ontvluchten van de moeilijkheid, terwijl men bij sommige onderzoekingen weinig aan het phosphorgehalte heeft en beslist het fosphatidegehalte moet kennen.

b. Het extraheeren van de fosphatiden

De bepaling van het fosphatidegehalte wordt geheel onzeker, omdat niet bekend is op welke wijze deze stoffen kwantitatief uit melk kunnen worden afgescheiden, zonder dat andere phosphorverbindingen mede worden afgezonderd. De fosphatiden, die zoowel hydrophobe als hydrophiele eigenschappen hebben, komen n.l. in melk in een gehydrateerden vorm voor. Men kan deze verbindingen daardoor niet met een uitgesproken hydrophoob oplosmiddel extraheeren en loopt gevaar om bij de extractie andere hydrophiele phosphorverbindingen mee te extraheeren. Men moet dus een oplosmiddel kiezen, dat voldoende hydrophiel is om de fosphatiden op te lossen, maar dat ook weer voldoende hydrophoob is om het oplossen van andere phosphorverbindingen, zooals phosphaten, te voorkomen. Men heeft op verscheiden manieren getracht deze moeilijkheden op te lossen.

1. *Extractie van gedroogde producten*

Teneinde te voorkomen, dat te zamen met de phosphatiden o.a. anorganische phosphor wordt afgescheiden, gingen sommige onderzoekers van melkpoeder uit, om geen water bij de extractie aanwezig te hebben (SCHMID-MÜHLHEIM (40); SASAKI (37); BISCHOFF (4); DIEMAIR, BLEYER en OTT (12); REWALD (35)). Anderen gingen de melk vóór de extractie drogen. Als droogmiddel werden o.a. gebruikt: gips (SUPPLEE (41) en CUSICK (9)) en natriumsulfaat (HOLWERDA (19)). BURUIANA en FURTUNESCO (7) droogden de melk op zand bij 105° C. Weer anderen (OSBORNE en WAKEMAN (30, 31)) precipiteerden de eiwitten van de melk; volgens hen worden de phosphatiden door de geprecipiteerde eiwitten vastgehouden. Het neerslag werd door hen gedroogd en vervolgens met een organisch oplosmiddel, b.v. chloroform, aether, alcohol of een mengsel hiervan geëxtraheerd. Ook wel liet men melk druppelen bij een mengsel van alcohol en aether, waaraan wat azijnzuur was toegevoegd. De phosphatiden losten dan op in het alcohol-aether-mengsel; dit werd door filtreren van eiwitten bevrijd, bij een lage temperatuur tot een dikke stroop ingedampt, daarna aangewreven met waterrij natriumsulfaat en tenslotte geëxtraheerd met een aether-alcohol-mengsel of met chloroform (BRODRICK-PITTARD (8); MOHR, BROCKMANN en MÜLLER (28)). BORDAS en RACSKOWSKY (5) en DORNIC en DAIRE (13) volgden een soortgelijke extractiemethode; ze extraheerden de melk met alcohol en de droogrest van de verkregen alcoholische oplossing met een mengsel van alcohol en aether. BUROW (6) droogde de stroopachtige massa niet met natriumsulfaat, doch extraheerde haar zonder meer. MOHR en MOOS (27) zetten het alcoholische extract van de melk op waterrij natriumsulfaat te drogen en gebruikten de oplossing dan zonder meer voor de phosphorbepaling.

Herhaaldelijk ziet men in de literatuur het vermoeden uitgesproken, dat een te intensieve droging de oorzaak kan zijn van een onvolledige extractie van de phosphatiden (HESS en HELMAN (17), BIRD en SANDS (2), GROSZFELD en WALTER (16)). Bewijzen hiervoor zijn echter niet geleverd. Wel is gebleken, dat een deel van de phosphatiden door stukjes droog eiwit kan worden ingesloten, zoodat het niet toegankelijk is voor de extractiemiddelen. HOLWERDA (19) wees er op, dat de phosphatiden na een al te rigoureuse droging slecht in een mengsel van alcohol en aether, doch uitstekend in petroleumaether of chloroform oplossen. BURUIANA en FURTUNESCO moesten bij de afzondering van de phosphatiden uit melk, die bij 105° C op zand was gedroogd, iets langer extraheeren dan normaal, maar ondervonden verder geen moeilijkheden. Ze gebruikten na elkaar alcohol en aether als oplosmiddelen.

2. *Extractie langs natten weg*

Mede uit vrees voor een nadeeligen invloed van het drogen geven velen de voorkeur aan een extractie langs natten weg. Als extractiemiddel is heel veel gebruik gemaakt van een mengsel van alcohol en aether. De verhouding, waarin deze stoffen worden gemengd, en de verhouding van de totale hoeveelheid extractiemiddel tot de hoeveelheid te extraheeren

melk zijn van veel belang. Tot op zekere hoogte kan men de hoeveelheid „extraheerbare phosphor” naar wensch wijzigen door die verhoudingen anders te nemen. Bij gebruik van veel alcohol vindt men veel „extraheerbare phosphorus”, bij gebruik van veel aether daarentegen weinig. Het is dan ook niet te verwonderen, dat men met de natte wijze van extraheeren zulke uiteenlopende resultaten heeft gekregen. In de eerste plaats lossen, zooals HOLWERDA aantoonde, in alcohol-aether-mengsels gemakkelijk phosphorverbindingen, die geen phosphatiden zijn, op. Verder kunnen bij aanwezigheid van veel alcohol en water anorganische phosphorverbindingen oplossen. HOLWERDA kon b.v. in het volgens MOHR en MOOS op natriumsulfaat gedroogde extract (100 dln melk, 100 dln alcohol-aether 3 : 1) een hoeveelheid anorganische phosphor, overeenkomende met 0,1—0,15 % phosphatide, aantoonen. De genoemde Deutsche onderzoekers vonden dan ook een onwaarschijnlijk hoog gehalte aan phosphatiden; in melk 0,49 % en in ondermelk 0,48 %. GRAHAM en KAY (15) gebruikten hetzelfde extractiemiddel als MOHR en MOOS, doch namen meer van het mengsel ten opzichte van de te extraheeren hoeveelheid melk; ze extraheerden 1 cm³ melk met 49 cm³ vloeistof. Zooals is te verwachten, vonden ze minder „phosphatide” dan MOHR en MOOS; volgens hen bevat melk 0,1—0,32 % phosphatide. Een soortgelijke methode werd door o.m. KOCH en WOODS (22), BLOOR (1), HESS en HELMAN (17), HOLM, WRIGHT, DEYSHER (18) en BURUANA en FURTUNESCO (7) gevolgd. Bij al deze methoden lost er een grootere of kleinere hoeveelheid phosphorverbindingen, die geen phosphatiden zijn, op. Ook is door sommige onderzoekers getracht bij de extractie geen alcohol te gebruiken en dus alleen met aether te extraheeren. Het bleek echter, dat niet alle aanwezige phosphatide in de aether overging; volgens TAYEAU neemt aether ongeveer 70 % van de aanwezige phosphatiden op. Men heeft dit op verschillende manieren willen verklaren. Dikwijls werd aangenomen, dat de phosphatiden in melk aan eiwit zijn gebonden en dat de extractie uit deze verbindingen door de aanwezigheid van alcohol mogelijk wordt gemaakt (OSBORNE en WAKEMAN (30); PALMER en WIESE (33); LOBSTEIN en FLÄTTER (24). MACHEBOEUF en SANDOR (26) nemen aan, dat alcohol dehydrateerend op het phosphatide of eventueel op de phosphatide-eiwitverbinding werkt, tengevolge waarvan het van zijn watermantel beroofde phosphatide toegankelijk wordt voor de aether en opgelost kan worden. De verklaring van HOLWERDA is minder duidelijk; ze neemt aan, dat een sterk dehydrateerende stof als droge aether, de gehydrateerde phosphatiden niet gemakkelijk zal kunnen oplossen. In plaats van alcohol gebruikte TAYEAU (42) een zeepoplossing om het phosphatide in een extraheerbaren vorm te brengen. Evenmin als met behulp van aether alle phosphatiden uit melk kunnen worden geëxtraheerd, lossen deze verbindingen alle op in alleen alcohol (o.a. REWALD (35), FURTUNESCO en BURUANA (7)).

Verscheidene onderzoekers hebben voor het afscheiden van de phosphatiden uit melk gebruik gemaakt van de *vetextractiemethode* van RÖSE-GOTTLIEB. Volgens PETERSEN en HERREID (34), THURSTON en PETERSEN (43) en HORRALL (20) kan volgens deze extractiemethode vrijwel alle aan melk toegevoegde eilecithine worden teruggewonnen. Dit gelukte

echter niet aan CHAPMAN (10) en LYONS en FINLAY (25). WIESE, NAIR en FLEMING (44) vonden in het Röse-Gottlieb-extract 90 % van aan melk toegevoegd sojalecithine terug. Ze merken echter terecht op, dat men hieruit niet met zekerheid mag afleiden, dat de in melk aanwezige fosphatiden ook volledig worden geëxtraheerd; de toestand, waarin deze voorkomen, kan b.v. een geheel andere zijn; de extractie zou daardoor kunnen worden belemmerd of gemakkelijker worden gemaakt. In het algemeen vonden de onderzoekers, die volgens Röse-Gottlieb extraheerden, vrij lage fosphatidegehalten, maar hieruit mag natuurlijk volstrekt niet worden afgeleid, dat de cijfers te laag zijn. Het is heel aannemelijk, dat de bij toepassing van deze methode gevonden waarden laag zijn, omdat er weinig verontreinigende phosphorverbindingen mee worden geëxtraheerd. In de eerste plaats n.l. wordt er een vrij groote hoeveelheid extractiemiddel gebruikt; verder wordt aanmerkelijk meer aether dan alcohol toegevoegd (de verhouding tusschen de van deze vloeistoffen gebruikte hoeveelheden is $2\frac{1}{2} : 1$). Bovendien wordt tenslotte nog vrij veel petroleumaether toegevoegd. In petroleumaether lossen gehydrateerde stoffen slecht op en men ziet na de toevoeging van deze vloeistof dan ook een troebeling ontstaan in de oorspronkelijk vrij heldere aetherische oplossing. Alles samengenomen bestaat er weinig gevaar voor, dat er sterk hydrophiele phosphorverbindingen in het extract zullen achterblijven. WIESE, NAIR en FLEMING konden inderdaad in het extract geen anorganische phosphor aantoonen.

Een verdere bijzonderheid van de extractiemethode volgens Röse-Gottlieb is, dat de te extraheeren melkproducten alkalisch worden gemaakt met behulp van sterke ammonia. Bij de vetbepaling geschiedt dit om de extractie volledig te doen zijn. Ook bij de fosphatidebepaling schijnt de toevoeging van ammonia van belang te zijn, want HOLWERDA vond iets meer fosphatide in melk en in room als ze vóór de extractie wat ammonia toevoegde, dan zonder deze toevoeging.

c. Indirecte bepalingmethoden

Over eenige indirecte methoden, die werden voorgesteld ter bepaling van de fosphatiden in melk, kunnen we kort zijn. Volgens THURSTON en PETERSEN (43) hebben de fosphatiden of de ontledingsproducten ervan geen invloed op de vetbepalingmethode volgens Babcock. Ze willen het fosphatidegehalte van karnemelk bepalen door de resultaten van de vetbepaling volgens Röse-Gottlieb en die volgens Babcock van elkaar af te trekken. Daar de methode van Babcock geheel onjuiste waarden geeft voor het karnemelkvetgehalte en de ontledingsproducten van de fosphatiden zeker invloed zullen hebben op de resultaten, die volgens deze methode worden verkregen, is het voorstel van THURSTON en PETERSEN geheel onaanvaardbaar (29).

PETERSEN en HERREID (34) denken het fosphatidegehalte van karnemelk te kunnen berekenen door de cijfers, verkregen bij de bepaling van het vetgehalte volgens een variant op de Röse-Gottlieb-methode (de methode van MOJONNIER) en die, welke worden verkregen bij de vetbepaling volgens een door hen ontworpen methode (de Minnesota test) van

elkaar af te trekken. De fosphatiden zullen bij de Minnesota test geen invloed hebben op de vetbepaling, want toegevoegde lecithine verhoogt het gevonden cijfer voor het vetgehalte niet. Het genoemde verschil is echter aanmerkelijk grooter dan het fosphatidegehalte, dat men volgens directe bepalingmethoden vindt. Voor room met 20 % vet varieerde het bij het onderzoek van PETERSEN en HERREID van 0,1684 tot 0,3199 %. Vooral het hoogste cijfer is onwaarschijnlijk hoog. Zelf vonden we tusschen de vetbepaling volgens Röse-Gottlieb en die volgens de Minnesota test een gemiddeld verschil van 0,175 %, terwijl de uiterste verschillen waren 0,09 en 0,38 %. Het gemiddelde verschil is dus aanmerkelijk hooger dan het gemiddelde fosphatidegehalte, dat 0,075 % bedroeg. Toch zou men op grond van dit groote verschil het principe van de fosphatidebepalingmethode van PETERSEN en HERREID niet mogen verwerpen. De Minnesota test is n.l. een ervaringsmethode en het zou kunnen zijn, dat er een correctie zou moeten worden aangebracht op de volgens het origineele voorschrift van PETERSEN en HERREID gevonden cijfers of dat het voorschrift iets diende te worden gewijzigd. Echter ook na het aanbrengen van een correctie zou het voorstel van de beide Amerikaansche onderzoekers moeilijk aanvaardbaar zijn, want de volgens hun methode berekende fosphatidegehalten vertoonen variaties, die veel grooter zijn dan de volgens de directe bepalingmethoden gevonden cijfers voor het gehalte aan fosphatiden.

EIGEN ONDERZOEK

Het is niet gemakkelijk een keuze te doen uit de vele in de literatuur genoemde fosphatidebepalingmethoden, te meer omdat geen van deze methoden geheel bevredigend kan worden genoemd. Vooral de keuze van een extractiemethode geeft moeilijkheden.

a. De methode van Holwerda

Teneinde geen anorganische phosphor in de extracten te krijgen, lijkt het gewenscht het water van de karnemelk vóór de extractie te verwijderen. Daar er gevaar bestaat voor het insluiten van fosphatiden door vaste eiwitdeeltjes, is het niet goed om uit te gaan van gedroogde karnemelk, zooals b.v. karnemelkpoeder. Hetzelfde argument kan echter moeilijk worden ingebracht tegen het drogen van de karnemelk op zand of op een droogmiddel als natriumsulfaat of gips; er zal dan n.l. weinig gevaar voor insluiten bestaan.

HOLWERDA (19), die deze methode toepaste (ze droogde op natriumsulfaat en extraheerde met een alcohol-aether-mengsel 3:1), vond geen anorganische phosphor in haar extracten. Helaas bleek bij haar onderzoek, dat er behalve de fosphatiden nog vrij groote hoeveelheden van een niet-ionogene phosphorverbinding in de extracten overgingen. Volgens HOLWERDA was deze verbinding een phosphorzure ester; met zekerheid is dat echter niet bewezen. Teneinde den invloed van deze vreemde phosphorverbinding op de fosphatidebepaling uit te sluiten, stelde de genoemde onderzoekster voor een correctie aan te brengen. Volgens haar bevat

vetvrije ondermelk geen fosphatiden, zoodat ze de correctie voor melk meende te kunnen leeren kennen door deze vloeistof intensief te centrifugeeren en in de verkregen vetvrije ondermelk de hoeveelheid „extraheerbare phosphor”, volgens haar „ester-phosphor”, te bepalen. Ze vond in volle melk een hoeveelheid extraheerbare phosphor, overeenkomende met 0,079 % fosphatide; in de „vetvrije” ondermelk een hoeveelheid, overeenkomende met 0,059 %. In werkelijkheid is volgens haar dus ongeveer 0,02 % fosphatide aanwezig. Daar de correctie veel grooter is dan het fosphatidegehalte, verliest de methode veel aan betrouwbaarheid. Zeer kleine hoeveelheden fosphatiden zullen dan ook moeilijk met behulp van deze methode kunnen worden bepaald.

1. De toepassing van deze methode op zure en zoete karnemelk

HOLWERDA heeft niet aangegeven hoe de correctie voor karnemelk moet worden bepaald. In karnemelk is een deel van de fosphatiden waarschijnlijk niet verbonden met vetdeeltjes, zoodat het niet mogelijk zal zijn de correctie te bepalen door middel van een bepaling van de extraheerbare phosphor in „vetvrij” gecentrifugeerde karnemelk. Bovendien kan karnemelk moeilijk vetvrij worden gecentrifugeerd, omdat het vet er voor een belangrijk deel in een colloidalen vorm in voorkomt (11, 38). Tabel 1 bevat eenige cijfers, waaruit blijkt, dat het vet en de fosphatiden niet door middel van centrifugeeren uit zure karnemelk kunnen worden verwijderd. Bij de betreffende proeven werden de karnemelkmonsters gedurende 1½ uur in een laboratoriumcentrifuge krachtig gecentrifugeerd.

TABEL 1

Monster n ^o .	% volgens HOLWERDA's methode „extraheerbare phosphor”, uitgedrukt als fosphatide	
	Karnemelk (zuur)	Na centrifugeeren
1	(0,67) *) 0,08	(0,15) 0,04
2	(0,62) 0,075	(0,12) 0,045
3	(0,57) 0,08	(0,16) 0,04

*) De tusschen () geplaatste cijfers geven het vetgehalte (Gerber) aan.

Daar de correctie voor de storende phosphorverbindingen niet kan worden bepaald in het centrifugaat van karnemelk, zal dit moeten geschieden in het ultrafiltraat. De storende verbindingen passeeren volgens HOLWERDA een ultrafilter, terwijl de fosphatiden daardoor worden tegengehouden. Als ultrafilter gebruikten we een volgens OSTWALD bereid collodionfilter (32). Bij alle de genomen proeven kon in het ultrafiltraat van

zure karnemelk slechts een spoor extraheerbare phosphor worden aangetoond, waaruit volgt, dat zure karnemelk nagenoeg geen storende phosphorverbindingen bevat. Tijdens de bewerkingen, die de room bij de boterbereiding ondergaat, schijnen deze verbindingen tot niet-extraheerbare stoffen te worden omgezet. Bij zoete karnemelk is het probleem geheel anders, zooals blijkt uit tabel 2. Bij de proeven, waarop deze tabel betrekking heeft, werden de karnemelk en het ultrafiltraat er van geëxtraheerd volgens de methode van HOLWERDA. De gevonden hoeveelheden phosphor werden omgerekend tot % phosphatide, ofschoon dat natuurlijk niet juist is, daar b.v. het ultrafiltraat geen phosphatide bevat. Deze berekening werd echter uitgevoerd om te laten zien welke fout gemaakt wordt als er bij het volgen van de methode van HOLWERDA geen rekening wordt gehouden met de storende phosphorverbindingen. Tevens werd het phosphatidegehalte van de karnemelkmonsters bepaald volgens een methode, waarbij de extractie van Röse-Gottlieb werd gevolgd. Op deze cijfers wordt op blz. 720 teruggekomen.

TABEL 2

Extractie volgens HOLWERDA; schijnbaar phosphatidegehalte		Werkelijk phosphatidegehalte	
A. Karnemelk	B. Ultrafiltraat	Volgens HOLWERDA A — B	Extractie volgens RÖSE-GOTTLIEB
0,163	0,048	0,115	0,10
0,11	0,03	0,08	0,09
0,13	0,03	0,10	0,08
0,08	0,01	0,07	0,075
0,08	0,02	0,06	0,07
0,12	0,04	0,08	0,08

Uit de tabel volgt duidelijk, dat zoete karnemelk phosphorverbindingen, die storend werken bij de phosphatidebepaling volgens de methode van HOLWERDA, bevat.

Aangezien de bepaling van de correctie bij het onderzoek van het phosphatidegehalte van karnemelk uit zuren room volgens de methode van HOLWERDA kan vervallen, is deze methode bij die karnemelksoort goed bruikbaar. Voor het onderzoek van zoete karnemelk is de methode zeer omslachtig, omdat telkens de hoeveelheid extraheerbare phosphor in het ultrafiltraat van karnemelk moet worden bepaald.

2. *Het phosphatidegehalte van centrifugemelk en het bepalen van de correctie, die bij de methode van HOLWERDA moet worden aangebracht*

Over het gebruik van deze methode bij het bepalen van het phosphatidegehalte van andere melkproducten zij nog het volgende opgemerkt. Volgens HOLWERDA bevat ondermelk geen phosphatiden. Ze kwam tot die veronderstelling naar aanleiding van eenige pogingen, die zonder resultaat bleven, om uit centrifugemelk phosphatiden af te zonderen. Eenige andere experimenten van haar lijken echter in strijd te zijn met het bovenstaande. Bij

deze proeven trachtte ze de storende phosphorverbinding, waarvan ze veronderstelde, dat het een phosphorzure ester is, in weegbare hoeveelheden uit ondermelkpoeder af te zonderen. Uit 500 g van dit poeder verkreeg ze echter, naast ca. 600 mg van de storende phosphorverbinding ongeveer 200 mg fosphatide. Het ondermelkpoeder was dus lang niet fosphatidevrij. Daartegenover echter staat, dat het ook niet vetvrij was en dat de aanwezige fosphatiden dus misschien aan het vet zouden kunnen zijn gebonden. Het vetgehalte bedroeg omstreeks 1 % en kan dus niet uitzonderlijk hoog worden genoemd. Men zou zich kunnen afvragen hoe hoog het fosphatidegehalte zou zijn geweest als het poeder in het geheel geen vet had bevat. HOLWERDA geeft reeds een antwoord op deze vraag. Immers volgens haar verandert het fosphatidegehalte van centrifugemelk nagenoeg niet, als deze vloeistof aan een zeer scherpe centrifugeering wordt onderworpen en dus ten naaste bij vetvrij wordt gemaakt. Ook de proeven, die door mijzelf in deze richting werden genomen, hadden eenzelfde resultaat, zooals blijkt uit de cijfers, die in het laatst van de volgende alinea worden gegeven. Eerder dan aan te nemen, dat ondermelk geen fosphatiden bevat, zou ik uit de proeven van HOLWERDA willen afleiden, dat in ondermelk een geringe hoeveelheid fosphatiden voorkomt.

Als we aannemen, dat er bij de proeven van HOLWERDA over het afzonderen van de fosphatiden en de storende phosphorverbinding uit ondermelkpoeder van beide stoffen evenveel verloren ging, komen deze stoffen in centrifugemelk in een verhouding 1 : 3 voor, m.a.w. van de hoeveelheid extraheerbare phosphor bestaat ongeveer $\frac{1}{4}$ deel uit fosphatiden. Daar er volgens HOLWERDA in centrifugemelk een hoeveelheid extraheerbare phosphor aanwezig is, die overeenkomt met 0,05 % fosphatiden, zou er volgens de bovenstaande veronderstelling ongeveer 0,01 % fosphatide in dat product voorkomen. Deze geschatte hoeveelheid komt overeen met die, welke men vindt als men de fosphatiden uit de centrifugemelk extraheert volgens de methode van Röse-Gottlieb. We vonden volgens de laatstgenoemde methode in de centrifugemelk van het boterfabriekje van de proefzuivelboerderij gemiddeld 0,013 % fosphatiden. Na deze ondermelk nog eens gedurende een uur in een laboratoriumcentrifuge te hebben gecentrifugeerd, zoodat ze nagenoeg geheel vetvrij was, vonden we gemiddeld nog 0,012 % fosphatiden.

Ook op andere manieren kon het voorkomen van fosphatiden in centrifugemelk waarschijnlijk worden gemaakt. Zoo kon worden aangetoond, dat het Röse-Gottlieb-extract behalve phosphor ook stikstof bevat. De stikstofhoudende stof is oplosbaar in organische oplosmiddelen en is dus waarschijnlijk geen eiwit. Verder bleek, dat in het ultrafiltraat van ondermelk zoo goed als geen phosphor, die volgens de methode van Röse-Gottlieb kan worden geëxtraheerd, voorkomt (meestal vonden we minder dan 0,002 %). Hieruit volgt, dat de phosphorverbinding, die bij de methode van HOLWERDA storend werkt, niet of slechts in geringe sporen bij de methode van Röse-Gottlieb wordt geëxtraheerd.

Eigenlijk mag ook niet worden verwacht, dat centrifugemelk fosphatidevrij is. De fosphatiden worden n.l. bij roeren, schudden, karnen, centrifugeeren en dergelijke bewerkingen, waarbij de melk in een krachtige

beweging komt, van het oppervlak van de vetbolletjes verwijderd en komen dan terecht in het melkplasma. Als room wordt gecentrifugeerd, blijft er in de „vetvrije” ondermelk een aanzienlijke hoeveelheid fosphatiden achter; in een dergelijke centrifugemelk vonden we b.v. meermalen 0,05 % fosphatiden. Naar aanleiding hiervan moet dus wel worden aangenomen, dat in normale ondermelk een geringe hoeveelheid fosphatiden voorkomt.

Uit het voorgaande volgt, *dat de correctie, die bij de methode van HOLWERDA moet worden aangebracht, niet mag worden bepaald door een bepaling van de hoeveelheid extraheerbare phosphor in „vetvrij” gecentrifugeerde ondermelk*, maar dat deze bepaling moet geschieden in het ultrafiltraat van de melk of het melkproduct. Volgens deze redeneering bevat melk ongeveer 0,01 % meer phosphatide dan HOLWERDA aangaf, zoodat het gemiddelde cijfer niet 0,02 % maar 0,03 % wordt. Dit laatste cijfer komt goed overeen met door andere onderzoekers volgens andere verdedigbare methoden gevonden waarden.

b. Vergelijking van eenige geheel verschillende bepalingsmethoden

Daar we het phosphatidegehalte van melk en dat van melkproducten niet kennen en we niet weten of de extractie van de melkphosphatiden op dezelfde wijze kan geschieden als de extractie van aan ondermelk toegevoegde vreemde phosphatiden, kunnen we moeilijk zeggen welke van de genoemde methoden juist is. Als echter bij onderzoek van eenzelfde monster karnemelk volgens verschillende methoden een gelijk cijfer voor het phosphatidegehalte zou worden gevonden, zou men met een tamelijk groote waarschijnlijkheid mogen aannemen, dat zoowel dit cijfer als de methoden juist zijn. Op grond van deze redeneering hebben we van eenige monsters zure karnemelk het phosphatidegehalte bepaald volgens de methode van BRODRICK-PITTARD, volgens de methode van HOLWERDA en volgens een methode, waarbij gebruik werd gemaakt van de vetextractiemethode van RÖSE-GOTTLIEB. De gevolgdte voorschriften luiden:

1. BRODRICK-PITTARD: 100 g karnemelk werd onder schudden en roeren gedruppeld bij 100 cm³ van een alcohol-aether-mengsel (1:1). Toen alle karnemelk was toegevoegd bleef het mengsel nog ca. 6 uren staan, terwijl dikwijls werd geschud. Het gevormde neerslag werd door centrifugeeren verwijderd en gewasschen met een alcohol-aether-mengsel. De waschvloeistof werd te zamen met het extract in vacuo tot een dikke stroop ingedampt; hierbij werd de temperatuur beneden 50° C gehouden. De stroop werd met een drievoudige hoeveelheid watervrij natriumsulfaat aangewreven en daarna gedurende drie uren in een Soxhletapparaat geëxtraheerd met chloroform. Na verdampen van de chloroform werd de droogrest verascht met soda en salpeter. Het gevormde phosphaat werd volgens de methode van LORENZ bepaald als phosphorammoniummolybdaat.

2. *De methode van HOLWERDA.* 1 cm³ karnemelk werd met 3 g watervrij natriumsulfaat aangewreven en gedurende een half uur geëxtraheerd door schudden met 50 cm³ van een alcohol-aether-mengsel (3 dl alcohol 95 % en 1 dl aether). Daarna werd gefiltreerd en van 40 cm³ helder extract het oplosmiddel in vacuo verdampt in een microdestructiebuis.

Het residu werd volgens NEUMANN verascht met 0,5 cm³ van een mengsel van 1 deel sterk zwavelzuur en 1 deel sterk salpeterzuur. Zoo noodig werd later nog wat salpeterzuur toegevoegd. Na afloop van de destructie werd met wat water verwarmd om het nitrosylzwavelzuur te doen ontleden, waarna tot 10 cm³ werd aangevuld. Het fosphaat werd nephelometrisch bepaald met behulp van een strychnine-molybdeen-reagens volgens MEDINGER *). De benodigde hoeveelheid van de onbekende fosphaat-oplossing werd met water aangevuld tot 9 cm³ en bedeed met 1 cm³ reagens. De ontstane troebeling werd in een cuvette, zooals gebruikt in den colorimeter van HELIGE, vergeleken met de troebelingen van een vergelijkingsschaal, die werd verkregen door bij opklimmende hoeveelheden (0,15—0,5 cm³) van een fosphaatoplossing, die 20 mg phosphor per l bevatte, 1 cm³ van het reagens te voegen, nadat de fosphaat-oplossingen waren aangevuld tot 9 cm³ met verdund zwavelzuur (3,5 cm³ sterk zwavelzuur op 500 cm water). Volgens HOLWERDA is deze methode nauwkeurig tot op 10 % en kan de nauwkeurigheid worden opgevoerd door 2 verschillende hoeveelheden van de onbekende oplossing te nemen. Daar slechts met zure karnemelk werd gewerkt, behoefde geen correctie te worden aangebracht.

3. *Extractie volgens RÖSE-GOTTLIEB.* Deze werd volgens het in de Codex Alimentaris voorkomende voorschrift voor het bepalen van het vetgehalte van melk uitgevoerd. Hierbij wordt na het bezinken een gedeelte van de heldere aetherische oplossing afgetapt en voor de verdere analyse gebruikt. In het buitenland neemt men dikwijls alle aetheroplossing weg en schudt daarna opnieuw met aether en petroleumaether. Bij de fosphatidebepaling bleek dit weinig zin te hebben; het tweede extract bevatte nagenoeg geen fosphatiden. Aanvankelijk bestond het plan om het phosphorgehalte van de extracten op een door HORRALL beschreven methode te bepalen, n.l. door verassing van de droogrest met magnesiumnitraat en bepaling van het gevormde fosphaat volgens DENIGÈS. Daar deze colorimetrische bepaling moeilijkheden opleverde, werd van dit voor-nemen afgestapt en werd het phosphorgehalte van de extracten op dezelfde wijze bepaald als dat bij de methode van HOLWERDA geschiedt.

De volgende tabel (3) geeft een overzicht van de resultaten, die met deze methoden werden verkregen. (Ook tabel 2, op blz. 716 bevat eenige cijfers.)

Daar de drie methoden ten naaste bij hetzelfde cijfer voor het fosphatidegehalte geven, zullen ze waarschijnlijk alle bij benadering juist zijn. Verder volgt uit de cijfers van tabel 3, dat de onderzochte karnemelk-monsters zeer waarschijnlijk ongeveer 0,08 % fosphatiden bevatten.

*) HOLWERDA bereidde dit reagens als volgt: aan een helder gefiltreerde oplossing van 4 g ammoniummolybdaat in 100 cm water wordt zooveel van een verzadigde strychnineacetaatoplossing (1 : 65) toegevoegd, dat een even blijvende troebeling ontstaat. Hiervoor is noodig 8 à 9 cm³. De verkregen oplossing wordt gemengd met een gelijk volumen salpeterzuur (s.g. 1,33) en, na een nacht te hebben gestaan, gefiltreerd. Het reagens moet in het donker worden bewaard en blijft slechts eenige dagen bruikbaar.

TABEL 3

Kerne- melk- monster	Phosphatidegehalte (%) volgens de methode		
	BRODRICK- PITTARD	RÖSE-GOTTLIEB	HOLWERDA
1	—	0,09	0,11
2	—	0,08	0,08
3	—	0,08	0,075
4	—	0,075	0,08
5	0,069	0,08	—
6	0,087	0,09	—
7	0,066	0,07	—
8	0,065	0,07	—

c. Het voorschrift, dat bij het verder onderzoek werd gevolgd

Van de genoemde drie extractiemethoden is die van BRODRICK-PITTARD het omslachtigst. Als men veel phosphatidebepalingen wil verrichten, komt ze dan ook minder in aanmerking dan de beide andere methoden. Van deze beide is de extractie volgens RÖSE-GOTTLIEB het eenvoudigste uit te voeren. Daar deze methode reeds door veel onderzoekers is toegepast en daar bij toepassing van de methode van HOLWERDA bij het onderzoek van zoete karnemelk en andere melkproducten een groote en moeilijk te bepalen correctie op de gevonden waarden moet worden aangebracht, geven we de voorkeur aan de extractie volgens RÖSE-GOTTLIEB.

Als het phosphorgehalte van de extracten volgens de strychnine-molybdeen-methode wordt bepaald, heeft men slechts weinig extract nodig. Teneinde chemicaliën te besparen, hebben we de hoeveelheden in het voorschrift iets gewijzigd. Het gevolgde voorschrift luidt: In een gecalibreerden schudecilinder met een inhoud van 50 cm³, die voorzien is van een ingeslepen stop, wordt 4 cm³ melk achtereenvolgens bedeed met 0,8 cm³ sterke ammonia, 4 cm³ alcohol, 10 cm³ aether en 10 cm³ petroleumaether. Na elke toegevoeging wordt, evenals dit geschiedt bij de vetbepaling volgens RÖSE-GOTTLIEB, geschud. Nadat men heeft laten bezinken, leest men het volumen van de aetherlaag af en pipetteert 10 cm³ van het aethermengsel in een microdestructiekolfje. Nadat de oplosmiddelen zijn verdampt door het kolfje in een waterbad te verwarmen, wordt het phosphorgehalte van de droogrest bepaald op de door HOLWERDA beschreven wijze (blz. 718). Uit het gevonden phosphorgehalte kan dat van de karnemelk worden berekend.

d. Eenige in de literatuur genoemde cijfers voor het phosphatidegehalte van karnemelk

In de literatuur vindt men in het algemeen hogere waarden voor het phosphatidegehalte van karnemelk opgegeven dan de in tabel 3 genoemde. MOHR en MOOS hebben een uitvoerig literatuuroverzicht

gegeven van de tot 1932 gepubliceerde waarden. Ze ontmoetten cijfers, die uiteenliepen van 0,0332—0,8768 %. Deze groote verschillen zullen voor een deel moeten worden toegeschreven aan verschillen tusschen de gevolgde methoden. Misschien ook kunnen een deel van de verschillen zijn ontstaan doordat de onderzochte soorten karnemelk niet op dezelfde wijze en uit dezelfde melksoort waren bereid.

Tabel 4 bevat eenige van de in de literatuur genoemde cijfers.

TABEL 4

	Extractie- methode	Phosphatide (%)	Vetgehalte (%)	Phosphatide, berekend op vet (%)	Opmerkingen
MOHR en BROCKMANN	BRODRICK- PITTARD	0,1142	0,50	22,8	
MOHR en MOOS. . .	—	0,8433	0,45	187,4	Extract bevatte anorg. P ?
HOLM en WRIGHT .		0,284—0,382	0,96—1,64	—	
HORRALL. .	MOJONNIER	0,14—0,16	—	19,7	Zoete karne- melk
"	"	0,10—0,17	—	17,9	Zure karnemelk
CHAPMAN. .	"	0,1036—0,148	0,643	20,25	
BIRD en SANDS . .	"	0,149	0,70	25,26	
BIRD, BREA- ZEALE, SANDS . .	"	0,1329	—	—	Uit room met 20 % vet
"	"	0,1670	—	—	Uit room met 30 % vet
"	"	0,2154	—	—	Uit room met 40 % vet
HOLWERDA .	HOLWERDA	0,10—0,125	—	—	

Als we de door MOHR en MOOS en de door HOLM en WRIGHT vermelde cijfers, waarvan bijna met zekerheid kan worden gezegd dat ze niet juist zijn, uitschakelen, is er een tamelijk goede overeenstemming tusschen de volgens verschillende methoden gevonden cijfers.

Volgens de tabel zou karnemelk 0,11—0,17 % phosphatiden bevatten. Zelf vonden we volgens de drie genoemde methoden van onderzoek in het algemeen lagere waarden; meestal 0,08 %. Een verklaring voor dit verschil vermogen we niet te geven. Misschien moet deze worden gezocht bij een verschil in vetgehalte van den room, waaruit de karnemelk werd bereid, en mogelijk bij een verschil in samenstelling van de melk of bij de gevolgde techniek in de boterfabriek.

e. Het fosfatidegehalte van de karnemelk van het proefboterfabriekje

Tabel 5 geeft een overzicht van de voor het fosfatidegehalte gevonden waarden, die betrekking hebben op karnemelksoorten, die in het boterfabriekje van de Proefzuivelboerderij werden vervaardigd uit zuren room met ongeveer 20 % vet. Er werd even voor het afkarnen doorgaans 6—10 % water in de karn gespoeld. De tusschen () geplaatste cijfers zijn afkomstig van een niet gepubliceerd onderzoek van HOLWERDA; deze werden bepaald volgens de door haar ontworpen methode.

TABEL 5.

in 4 karnemelkmonsters werd gevonden	0,05—0,06 %	fosfatiden
„ 10 (4)	„ „	0,06—0,07 % „
„ 15 (40)	„ „	0,07—0,08 % „
„ 21 (13)	„ „	0,08—0,09 % „
„ 8	„ „	0,09—0,10 % „

Het gemiddelde van deze cijfers is 0,07—0,08 %. Zonder inspoelen van water bij het karnen zou dit gemiddelde zijn: 0,08—0,09 %.

Daar de karnemelkmonsters gemiddeld ongeveer 0,5 % vet bevatten kwamen er op 100 deelen vet ca. 15 deelen fosfatide voor.

f. De invloed van eenige factoren op het fosfatidegehalte van karnemelk

Voor een deel moeten de geconstateerde schommelingen in het fosfatidegehalte van de karnemelk waarschijnlijk worden toegeschreven aan schommelingen in het vetgehalte van den room en andere min of meer kleine variaties bij de boterbereiding. De grootste schommelingen kunnen daarmede echter niet worden verklaard. Waarschijnlijk zijn het geen seizoenschommelingen, want binnen betrekkelijk kleine perioden werden relatief groote veranderingen in het fosfatidegehalte waargenomen. SIRKS (39) vond soortgelijke schommelingen in het fosfatidegehalte van melk. In 1939 vond hij in gemengde stalmelk op 7 Maart 0,009 % fosfatiden, op 5 April 0,028 %, op 18 April 0,016 % en op 2 Mei 0,028 %.

Het fosfatidegehalte van karnemelk uit weidemelk en van karnemelk uit stalmelk bereid was even hoog (tabel 6). De melkmonsters, waarop de cijfers van deze tabel betrekking hebben, waren afkomstig van twee groepen koeien; de eene groep liep in de weide, de andere stond in dien-zelfden tijd op stal.

TABEL 6

	Fosfatidegehalte (%)							Ge-middeld
	Proef n°.							
	1	2	3	4	5	6	7	
Karnemelk van weidemelk	0,08	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,10	0,094
Karnemelk van stalmelk	0,11	0,105	0,10	0,08	0,09	0,09	0,085	0,094

Het resultaat van deze proeven is in overeenstemming met oudere, niet gepubliceerde proeven, die in dit laboratorium werden genomen en waarbij werd gevonden, dat er weinig verschil bestaat tusschen het fosphatidegehalte van weidemelk en dat van stalmelk. Ook volgens GOULD (14) is het fosphatidegehalte van melk niet sterk afhankelijk van de voeding van het vee.

Het is bekend, dat sommige factoren, die bij de boterbereiding van belang zijn, ook invloed hebben op het fosphatidegehalte van karnemelk. Daarom werd de invloed van eenige van deze factoren nader onderzocht.

Het *pasteuriseeren van den room* had geen invloed op het fosphatidegehalte van karnemelk (tabel 7).

TABEL 7

	Phosphatidegehalte (%)	
Karnemelk uit rauwen, zoeten room	0,07	0,09
Karnemelk uit gepasteuriseerden room	0,07	0,08
Karnemelk uit rauwen, gezuurden room	0,07	0,09
Karnemelk uit gepasteuriseerden en gezuurden room . .	0,065	0,085

Het zuren van den room had volgens tabel 7 evenmin invloed op het fosphatidegehalte van de karnemelk als het pasteuriseeren. Dat het zuren geen invloed heeft, blijkt ook uit de proeven, waarvan de resultaten in tabel 8 zijn vermeld. Uit de cijfers van deze tabel blijkt, dat de wijze waarop de room werd gekoeld geen invloed had.

TABEL 8

Temperatuurbehandeling van den room na het pasteuriseeren	Zoete karnemelk	Zure karnemelk
Tot karnen op 12° C; karntemperatuur 15° C	0,085	—
" " " 20° C; " 15° C	0,095	—
8—19—0; karntemperatuur 14° C	0,075	0,08
19—19—0; " 14° C	0,09	0,08
0—20—5; " 14° C	0,09	0,09
20—20—5; " 14° C	0,09	0,08
25—25—0; " 12,5° C	0,09	0,10
25—25—0; " 20° C	0,085	0,10

Het vetgehalte van den room, waaruit de karnemelk werd bereid, had, zooals reeds was bekend (b.v. BIRD, BREAZEALE en SANDS), een grooten invloed op het fosphatidegehalte van de karnemelk (tabel 9).

TABEL 9

Vetgehalte van den zuren room	6,9 %	16,25 %	25,85 %	39,0 %
Phosphatidegehalte van de karnemelk . .	0,06 %	0,075 %	0,09 %	0,125 %

Men zou zich kunnen indenken, dat de fosphatiden vrij snel in karnemelk worden ontleed en dat daarmede de schommelingen in het fosphatidegehalte van dit product moeten worden verklaard. Van eenige monsters karnemelk werd het fosphatidegehalte dadelijk na het karnen bepaald en tenslotte nogmaals nadat de monsters ongeveer 10 dagen bij kamertemperatuur hadden gestaan.

Dadelijk na het karnen	0,08 %	0,09 %	0,07 %	0,07 %	0,055 %	0,055 %	0,05 %	0,06 %
Na 10 dagen bewaren	0,07 %	0,09 %	0,07 %	0,07 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,06 %

Uit deze cijfers volgt, dat het fosphatidegehalte van de karnemelk-monsters bij de bewaring weinig of niet was veranderd.

SAMENVATTING

In de voorgaande mededeeling werd een overzicht gegeven van in de literatuur genoemde methoden ter bepaling van het fosphatidegehalte van karnemelk. Evenmin als men het eens is over de bruikbaarheid van deze methoden, is men het er over eens hoeveel fosphatide in melk en melkproducten voorkomt. De methoden kunnen niet worden gecontroleerd door bepalingen uit te voeren in zelfbereide suspensies van fosphatiden, omdat niet precies bekend is welke fosphatiden in melk voorkomen en in welken vorm ze aanwezig zijn.

Uitgaande van de veronderstelling, dat wanneer voor eenzelfde monster karnemelk volgens verschillende bepalingsmethoden hetzelfde cijfer voor het fosphatidegehalte wordt gevonden, zowel de toegepaste methoden als het cijfer zeer waarschijnlijk juist zullen zijn, hebben we de hoeveelheid fosphatiden in eenige monsters karnemelk volgens drie geheel verschillende methoden bepaald. Deze methoden waren 1°. die van BRODRICK-PITTARD, 2°. die van HOLWERDA, en 3°. een methode, waarbij dezelfde extractiemethode werd toegepast als bij de vetbepaling volgens RÖSE-GOTTLIEB. De drie methoden gaven gelijke cijfers voor het fosphatidegehalte, zoodat we aannemen, dat ze juist zijn.

De methode van BRODRICK-PITTARD is heel bewerkelijk, zoodat ze niet voor serieonderzoek in aanmerking komt.

De methode van HOLWERDA is bruikbaar voor zure karnemelk, maar minder goed voor zoete en voor andere melkproducten, die storende P-verbindingen bevatten. Tegengesteld aan de meening van HOLWERDA, dat er in scherp gecentrifugeerde ondermelk geen fosphatiden voorkomen, vonden we, dat in dit product een kleine hoeveelheid (0,01—0,015 %) van deze verbindingen aanwezig is. De correctie, die HOLWERDA bij het

onderzoek van melk voor de storende P-verbinding aanbracht en die ze bepaalde door een „phosphatidebepaling” in gecentrifugeerde ondermelk te doen, is dus te hoog en haar bepalingen zijn dientengevolge alle ruim 0,01 % te laag uitgevallen. In gecentrifugeerde karnemelk komt een aanzienlijke hoeveelheid phosphatiden voor (soms wel 0,05 %). De correctie voor de P-verbinding, die storend werkt bij de methode van HOLWERDA, kan worden bepaald door middel van een „phosphatidebepaling” in het ultrafiltraat van het te onderzoeken melkproduct. De methode wordt dan echter nog bewerkelijker dan die van BRODRICK-PITTARD.

De *derde methode*, waarbij gebruik werd gemaakt van de *extractie-methode* van RÖSE-GOTTLIEB, is gemakkelijk en snel uit te voeren. Ook omdat reeds dikwijls gebruik is gemaakt van deze methode, geven we aan haar de voorkeur.

We hebben een voorschrift uitgewerkt, waarbij van 4 cm³ karnemelk wordt uitgegaan (blz. 720). Het phosphatidegehalte van het extract wordt bepaald door het phosphorzuur, dat bij de verassing van de droogrest volgens NEUMANN ontstaat, te bepalen met behulp van het reagens van MEDINGER volgens een door HOLWERDA uitgewerkte methode (blz. 719). Bij de berekening van het phosphatidegehalte werd aangenomen, dat de melk-phosphatiden gemiddeld 4 % P bevatten.

De karnemelk, die in het proefboterfabriekje van de proefzuivelboerderij uit room met 20 % vet werd bereid, bevatte 0,04—0,10 %, gemiddeld 0,08 %, phosphatiden; d.i. 15 g per 100 g vet.

Karnemelk, bereid uit weidemelk, bevatte evenveel phosphatiden als karnemelk uit stalmelk. Het pasteuriseeren en het zuren van den room hadden evenmin invloed op het phosphatidegehalte van de karnemelk als de temperatuurbehandeling van den room. Daarentegen had het vetgehalte van den room een grooten invloed. Bij een bewaring van de karnemelk gedurende ca. 10 dagen bij kamertemperatuur veranderde het phosphatidegehalte niet.

De beschreven methode is even goed te gebruiken voor andere melkproducten en melk als voor karnemelk.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Literatur über die Bestimmung von Phosphatiden in Buttermilch wurde besprochen.

Der Phosphatidgehalt von einigen Buttermilchsarten wurde auf drei verschiedenen Weisen bestimmt. Da diese Methoden dieselben Zahlen für den Phosphatidgehalt gaben wurde angenommen, dass sowohl die Methoden als die gefundene Gehalte richtig waren. Die drei Methoden waren:

1°. Die Methode von BRODRICK-PITTARD. Sie fordert viel Arbeit und eignet sich nicht für Serienuntersuchungen.

2°. Die Methode von HOLWERDA. Diese Methode ist geeignet für Buttermilch aus gesauertem Rahm, fordert aber für Süsrahmbuttermilch und andere Molkereiprodukte welche störende P-Verbindungen enthalten,

sehr viel Arbeit. Im Widerspruch mit der Behauptung von HOLWERDA, dass in Magermilch keine Phosphatide vorkommen, wurde auch darin eine kleine Menge von den genannten Verbindungen (etwa 0,01—0,015 %) gefunden. Deshalb ist es nicht möglich die Korrektur für störende Phosphor enthaltende Verbindungen durch eine „Phosphatidbestimmung“ in den „fettfrei“ zentrifugierten Produkten anzubringen, sondern man muss diese Bestimmung in den Ultrafiltraten ausführen.

3°. Bei der dritten Methode wurden die Phosphatide nach der Fettextraktionsmethode von RÖSE-GOTTLIEB extrahiert. Der P-gehalt der Extrakte wurde, nachdem die Trockenmasse nach NEUMANN zerstört war, mit dem Reagenz von MEDINGER, nach einer von HOLWERDA ausgearbeiteten Methode, bestimmt. Er wurde angenommen, dass die Phosphatide der Milch 4 % P enthalten. Diese Methode (S. 720) ist schnell durchführbar. Für eine Bestimmung braucht man nur 4 cm³ Buttermilch.

Die Methode ist auch für andere Milchprodukte brauchbar.

Die Buttermilch von der Versuchsbutterei (von Rahm mit 20 % Fett) enthielt 0,04—0,10 %, im Mittel 0,08 %, Phosphatide; dies bedeutet 15 g Phosphatide auf 100 g Fett.

Buttermilch von Landmilch hatte denselben Phosphatidgehalt wie Buttermilch von Stallmilch. Der Phosphatidgehalt der Buttermilch wurde weder von der Pasteurisierung und der Säuerung, noch von der Temperaturbehandlung, wohl aber von dem Fettgehalte des Rahmes beeinflusst.

Der Phosphatidgehalt der Buttermilch änderte sich nicht während einer 10-tägigen Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

SUMMARY

A review of literature on the estimation of phospholipins in buttermilk was given.

From some samples of buttermilk the phospholipincontents were estimated by three different methods. As these methods gave the same result it was concluded that they were right and that the figures for the lipincontents too were right. The three methods were:

1. The method of BRODRICK-PITTARD; a very workable one.

1. The method of HOLWERDA, fit for sour, but less fit for sweet buttermilk and other dairyproducts in which disturbing P-compounds occur. Contrary to the statement of HOLWERDA that skimmilk does not contain any phospholipins, we found in that product a slight amount of these compounds (0,01—0,015 %). Therefore the correction for extractable non-lipin P-compounds, which has to be made when this method is used, cannot be found by a phospholipin estimation in skimmilk, but has to be determined in an ultrafiltrate of the concerning milkproduct.

3. By the third method the fat-extraction-method of RÖSE-GOTTLIEB was applied, while the phosphorcontents of the extract were estimated after a destruction of the residu after NEUMANN, with the reagent of MEDINGER after a method worked out by HOLWERDA. It was assumed that

the phospholipins of the milk contain 4 % P. This method can be carried out quickly; for one estimation only 4 cm³ buttermilk are sufficient. A detailed description of the method was given on page 720.

This method can be used good for other milkproducts as well as for buttermilk.

The buttermilk from cream with 20 % fat, manufactured in the experimental butterfactory, contained 0,04—0,10 % (average 0,08 %) phospholipins; this means 15 g lipins for 100 g fat.

Buttermilk from stable-milk contained the same quantity of phospholipins as buttermilk from pasture-milk. Pasteurization and souring of the cream, just as the temperature-treatment, had no influence on the lipincontents of buttermilk, but the fatcontents of the cream had a great influence. The phospholipincontents did not alter when te buttermilk was kept at roomtemperature during 10 days.

AANGEHAALDE LITERATUUR

- (1) W. R. BLOOR, *Journ. Biol. Chem.* **12** (1915) 133.
- (2) E. W. BIRD en G. E. SANDS, *Journ. Dairy Sc.* **13** (1930) 453.
- (3) E. W. BIRD, D. F. BREAZEALE en G. E. SANDS, Iowa State College, *Agr. Exp. Stat. Res. Bull.* **175** (1935).
- (4) G. BISCHOFF, *Zeitschr. physiol. Chem.* **173** (1928) 227.
- (5) F. BORDAS en S. DE RACKOWSKY, *Compt.-Rend. Acad. Sc.* (1902).
- (6) R. BUROW, *Zeitschr. physiol. Chem.* **30** (1900) 495.
- (7) L. BURUIANA en A. FURTUNESCO, *Lait* **21** (1941) 9.
- (8) N. A. BRODRICK-PITTARD, *Biochem. Zeitschr.* **67** (1914) 382.
- (9) J. T. CUSICK, Cornell University Agr. Exp. Stat., *Memoir No.* 30 (1920).
- (10) O. W. CHAPMAN, *Journ. Dairy Sc.* **11** (1928) 429.
- (11) W. VAN DAM en B. J. HOLWERDA, *Versl. landbk. Onderz.* **40** (1934) 175.
- (12) W. DIEMAIR, B. BLEYER en M. OTT, *Biochem. Zeitschr.* **272** (1934) 119.
- (13) M. DORNIC en M. DAIRE, *Rev. gen. du Lait* **8** (1910) 385.
- (14) GOULD, *Zeitschr. Unters. Lebensm.* **83** (1942) 309 (ref.).
- (15) W. R. GRAHAM en H. D. KAY, *Journ. Dairy Res.* **5** (1933) 54.
- (16) J. GROSZFELD en G. WALTER, *Zeitschr. Unters. Lebensm.* **68** (1934) 270.
- (17) A. F. HESS en F. D. HELMAN, *Journ. Biol. Chem.* **64** (1925) 781.
- (18) G. E. HOLM, P. A. WRIGHT en E. F. DEYSHER, *Journ. Dairy Sc.* **16** (1933) 445.
- (19) B. J. HOLWERDA, *Versl. landbk. Onderz.* **42** (1936) 335.
- (20) B. E. HORRALL, *Purdue University Agric. Exp. Stat., Bull.* **401** (1935).
- (21) TH. HILDITCH en L. MADDISON, *Biochem. Journ.* **35** (1941) 24; ref. *Chem. Zentralbl.* (1942) I 1070.
- (22) W. KOCH en H. S. WOODS, *Journ. Biol. Chem.* **1** (1906) 203.
- (23) F. E. KURTZ, *Rogers Associates: Fundamentals of Dairy Science*, 2e druk), bldz. 77.

- (24) J. E. LOBSTEIN en M. FLÄTTER, Lait **141** (1935) 946.
 (25) J. LYONS en W. FINLAY, Econ. Proc. Royal Dubl. Soc. II (1932) 445.
 (26) M. A. MACHEBOEUF en G. SANDOR, Bull. Soc. Chim. Belg. **14** (1932) 1168.
 (27) W. MOHR en I. MOOS, Molkerei Ztg. Hildesheim **46** (1932) 1451.
 (28) W. MOHR, C. BROCKMANN en W. MÜLLER, Molkerei Ztg. Hildesheim, **46** (1932) 634.
 (29) H. MULDER, Handelingen Genootschap t.b.v. Melkkunde (1942) I.
 (30) T. B. OSBORNE en A. J. WAKEMAN, Journ. Biol. Chem., **21** (1915) 539.
 (31) T. B. OSBORNE en A. J. WAKEMAN, Journ. Biol. Chem., **28** (1916) 1.
 (32) W. OSTWALD, Kleines Praktikum der Kolloidchemie (1920).
 (33) L. S. PALMER en H. F. WIESE, Journ. Dairy Sc. **16** (1933) 41.
 (34) W. E. PETERSEN en E. O. HERREID, University Minnesota, Techn. Bull. **63** (1929).
 (35) B. REWALD, Lait **17** (1937) 225.
 (36) R. SASAKI, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **6** (1930) 51, ref.
 (37) R. SASAKI en E. HIRATSUKA, Proc. Imp. Acad. Tokyo **7** (1931) 99, ref.
 (38) H. A. SIRKS, Versl. landbk. Onderz. **41** (1935) 1.
 (39) H. A. SIRKS, Jaarverslag van het Rijkslandbouwproefstation te Hoorn 1939, blz. 10.
 (40) SCHMID-MÜHLHEIM, Jahresb. Fortschr. Tierchemi (1883) 166.
 (41) G. C. SUPPLEE, Cornell University Agric. Exp. Stat., Memoir No. **29** (1919).
 (42) F. TAYEAU, Lait **20** (1940) 129.
 (43) L. M. THURSTON en W. E. PETERSEN, Journ. Dairy Sc. **11** (1928) 270.
 (44) H. F. WIESE, J. H. NAIR en R. S. FLEMING, Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. **4** (1932) 362.