

## RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

OVER DE BEPALING EN WIJZE VAN VOORKOMEN DER  
PHOSPHOLIPOIDEN IN DE MELK EN MELKPRODUCTEN,

DOOR

B. J. HOLWERDA.

(Ingezonden 20 Maart 1936.)

Een onderzoek van VAN DAM en HOLWERDA<sup>1)</sup> leidde tot de veronderstelling, dat het karnproces als een flotatieproces is te beschouwen. In dat geval spelen de omhulsels der vetbolletjes een rol; ze komen n.l. terecht in de karnemelk en in de waterige phase van de boter.

Deze membranen nu bestaan geheel of gedeeltelijk uit phospholipoid, zooals al blijkt uit eenige onderzoekingen van PALMER e.a.<sup>2)</sup> Moeten nu de phospholipoiden der membranen beschouwd worden als door de vetbolletjes geadsorbeerde stoffen of moeten de vetbolletjes met membraan als een door de melkklier afgescheiden eenheid worden beschouwd? We hebben getracht door phospholipoidbepalingen in melk en in practisch vetvrije melk daarin een inzicht te krijgen. RIMPILA en PALMER komen langs geheel anderen weg tot de conclusie, dat de vetbolletjes membranen bezitten, die niet als adsorptiebrannen kunnen worden beschouwd. Als gevolg van het karnen komen de omhulsels der vetbolletjes en dus phospholipoiden in de karnemelk en spelen dan weer een rol bij de toepassing van verschillende methoden van vetbepaling daarin. Immers, wil men het effect van het karnen controleeren door de vetbepaling in de karnemelk, dan zouden eigenlijk de phospholipoiden niet mee moeten worden bepaald. Om den invloed, dien de phospholipoiden uitoefenen op de vetbepalingen in karnemelk te elimineeren zijn verschillende methoden toegepast; ze hebben echter nog niet tot een bevredigend resultaat geleid<sup>3)</sup>. In de waterige phase van de boter moeten (zooals ook bij het hiervolgende onderzoek is gebleken) de phospholipoiden in belangrijke

<sup>1)</sup> *Versl. landbk. Onders.*, N<sup>o</sup>. 40 C, 175 (1934).

<sup>2)</sup> WIESE en PALMER, *Journ. Dairy Science*, 15, 371 (1932); PALMER en WIESE, *ibid.*, 16, 41 (1933); RIMPILA en PALMER, *ibid.*, 18, 827 (1935).

<sup>3)</sup> PETERSEN en HERREID, *Techn. Bull.* 63 (1929) Univ. of Minnesota Agric. Exp. Stat. BIRD, BREAZEALE en SANDS, *Agric. Exp. Stat. Iowa, Res. Bull. Dairy Ind. Section* N<sup>o</sup>. 175, March 1935, alwaar volledige literatuurlijst.

453345

mate voorkomen; meer of minder spoedig bederf, dus reuk en smaak schijnen er mede in verband te staan<sup>1)</sup>.

Dan zien we nog af van de rol, die de phospholipoiden misschien zullen spelen bij de biosynthese van het plantaardige en dierlijke vet; MEIGS, BLATHERWICK en CARY<sup>2)</sup> zien n.l. in de phospholipoiden van het bloed de voorloopers van het melkvet. Het vettransport in het bloed zou dan geheel of voor het grootste deel in den vorm van phospholipoiden geschieden. Dit wordt door HILDITCH<sup>3)</sup>, BLACKWOOD<sup>4)</sup> e.a. weer niet waarschijnlijk geacht.

Bij het genoemde onderzoek over het karnproces zijn eenige ervaringen opgedaan, die het wenschelijk maakten zoowel in qualitatieven als in quantitatieven zin de kennis van de in melk voorkomende phospholipoiden uit te breiden. Bij onderzoek o.a. naar de al of niet bestaande identiteit van het melkvet van groote en kleine vetbolletjes (dit niet verkregen door uitboteren, maar door extractie), bleek het vet van de kleine meer phospholipoiden te bevatten dan dat der groote; een somtijds abnormaal hooge breking van het karnemelkvet meenden we ook aan phospholipoiden te mogen toeschrijven. Bij het drogen van Gottlieb-Röse-extracten bleek, dat silicagel de phospholipoiden in meerdere mate adsorbeerde dan natriumsulfaat.

#### QUANTITATIEVE BEPALING VAN DE PHOSPHOLIPOIDEN IN MELK EN MELKPRODUCTEN.

Bij een beschouwing van de waarden, die in de literatuur voorkomen voor de hoeveelheid phospholipoid, welke in melk en melkproducten aanwezig is, valt al dadelijk op, dat ook de gegevens der laatste jaren daarover nog zeer uiteenloopen. In het overzicht, dat MOHR en MOOS<sup>5)</sup> geven, kan men b.v. voor volle melk waarden vinden, die varieeren van 0,45—0,004 %. Opvallend is ook, dat sommige onderzoekers in ondermelk tot ongeveer 0,1 % meenen te moeten aannemen; anderen vinden in ondermelk practisch niets. Dit alles is wel verklaarbaar door de vele moeilijkheden, die zich bij een quantitatieve bepaling van de phospholipoiden in melk voordoen. Voor de bepaling toch van deze vetachtige stoffen is men aangewezen op een P-bepaling; de phospholipoiden, die in melk voorkomen, zullen gemiddeld  $\pm 3,85\%$  P bevatten. En de moeilijkheid om van melk en hieruit bereide producten een extract te krijgen, dat alle phospholipoid bevat en niet door

1) SUPPLEE, Cornell Univ. Agric. Exp. Stat., Memoir 29, 101 (1919); THURSTON en BARNHART, *Journ. Dairy Science*, 18, 131 (1935).

2) *Journ. biol. Chem.*, 37, 1 (1919).

3) *Chemistry and Industry*, 54, 184 (1935).

4) *Biochem. Journ.*, 28, 1346 (1934).

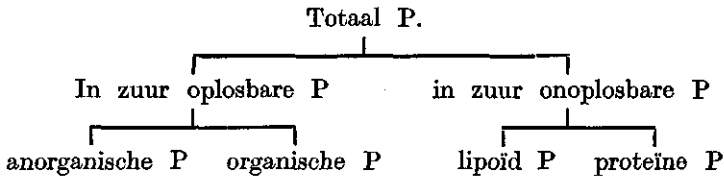
5) *Milchw. Forschungen*, 13, 442 (1932).

andere P-verbindingen wordt verontreinigd, is de aanleiding geweest tot de zeer verschillende uitkomsten, door verschillende onderzoekers verkregen. Ook PERLMANN<sup>1)</sup> wijst er nog weer op, dat gewoonlijk te weinig aandacht wordt besteed aan de zuiverheid van de extracten, die voor de phospholipidebepaling worden gebruikt.

Bij het maken van het phospholipoid-extract moet men met verschillende factoren rekening houden, namelijk:

### I. De verschillende vormen, waarin P in de melk voorkomt.

Zoowel in melk als in bloed komt deze voor in den vorm van: anorganische phosphaten, organische phosphorzure esters, lipoiden en proteïnen. Dit geeft men, zooals LENSTRUP<sup>2)</sup> e.a. dat doen, het best op de volgende wijze weer:



### II. Keuze van het extractiemiddel en wijze van extraheeren.

Zooals bekend, zijn de phospholipoiden bipolaire stoffen d.w.z. ze bezitten een hydrophobe en een hydrophyle groep. Extraheert men nu de melk op een wijze, zoodanig dat een minimum hydrophyle (en in water oplosbare) stoffen in het extract overgaat, zooals bij extractie volgens GOTTLIEB-RÖSE of MOJONNIER het geval is, dan heeft men kans niet alle phospholipoid met het vet te extraheeren. Hoewel b.v. WIESE, NAIR en FLEMING<sup>3)</sup> bij extractie volgens Mojonnier van aan melk toegevoegd phospholipoid 75 à 80 % terugvinden, merken ze zelf al op, dat het niet zeker is, dat ook de natuurlijk voorkomende phospholipoiden op deze wijze geheel geëxtraheerd zullen worden; de colloïde toestand en de dispersiteitsgraad waarin deze voorkomen kunnen van invloed zijn. Hetzelfde merkt ook CHAPMAN<sup>4)</sup> op. Opvallend is, dat degenen, die de phospholipoiden in het Mojonnier-extract bepaalden, over het algemeen lage waarden vinden. Zoo vindt CHAPMAN in melk b.v. 0,0447 %; in ondermelk 0,0165 %; PERLMANN<sup>5)</sup> in melk  $\pm$  0,03 %.

<sup>1)</sup> *Journ. Dairy Science*, 18, 113 (1935).

<sup>2)</sup> *Journ. biol. Chem.*, 70, 193 (1926); zie ook ALLEN, *Journ. Dairy Res.*, 3, 1 (1931) en LANG en MIETHKE, *Biochem. Zeitschr.*, 254, 484 (1932).

<sup>3)</sup> *Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.* 4, 362 (1932).

<sup>4)</sup> *Journ. Dairy Science*, 11, 429 (1928).

<sup>5)</sup> *Journ. Dairy Science*, 18, 113 (1935).

Extraheert men daarentegen de melk met een mengsel van alcohol en aether (3:1), d.i. een mengsel, waarin de phospholipoiden gemakkelijk en goed oplossen, dan krijgt men een extract, waarin ook stoffen met wat meer hydrophyle eigenschappen kunnen oplossen. Een bezwaar is dan, dat behalve phospholipoiden ook in zuur oplosbare organische P-verbindingen, die we in het vervolg ester-P zullen noemen, in het extract kunnen komen. Nu heeft men wel getracht op allerlei wijzen de zuiverheid van het extract te vergroeten; MOHR en MOOS<sup>1)</sup>, b.v. extraheeren 100 cm<sup>3</sup> melk met 100 cm<sup>3</sup> alcohol-aether-mengsel. Er moeten dan dus veel stoffen met hydrophyle eigenschappen in het extract komen. Wel trachten ze later dit extract met uitgedroogd Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> te drogen, doch dit is niet effectief. Uit alcohol-water-mengsels kan door Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> het water niet worden verwijderd. Ze vinden dan ook zeer hoge waarden: in volle melk, b.v. 0,49 % phospholipoid; in ondermelk 0,48 %. Bij naverken van deze methode bleek me, dat de aldus verkregen extracten zelfs niet vrij te krijgen waren van anorganische P, die er in voorkwam in een hoeveelheid, die met 0,1 à 0,15 % phospholipoid zou overeenkomen.

Neemt men weinig melk t.o.v. het extractiemengsel, zooals GRAHAM en KAY<sup>2)</sup> dat b.v. doen: 1 cm<sup>3</sup> melk met 49 cm<sup>3</sup> alcohol-aether-mengsel, dan verkrijgt men een extract, waarin zeer zeker minder hydrophyle stoffen in oplossing zullen gaan. Ze vinden in melk 0,1—0,32 % phospholipoid. HOLM, WRICHT en DEYSHER<sup>3)</sup>, die op soortgelijke wijze werken, komen voor ondermelk tot waarden van ± 0,13 % phospholipoid.

BRODRICK-PITTARD<sup>4)</sup> volgt een wat anderen weg. 100 cm<sup>3</sup> melk worden met 200 cm van een alcohol-aether-mengsel geëxtraheerd, het extract bij lage temperatuur droog gedampt en met Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gemengd; vervolgens het droge poeder geëxtraheerd met chloroform. Zij vindt waarden voor volle melk varierende tusschen 0,025 en 0,036 % phospholipoid.

Droogt men eiwitbevattende stoffen al te rigoureuus vóórdat geëxtraheerd wordt, dan vindt men weer te weinig lipoid, zooals GROSZFELD en WALTER<sup>5)</sup> al opmerken.

Uit de aangehaalde voorbeelden blijkt, dat het inderdaad de bipolaire eigenschappen der phospholipoiden zullen zijn, die het zeer moeilijk, zoo niet onmogelijk maken, om een volledig en zuiver extract ervan te krijgen uit een gecompliceerde stof als melk.

<sup>1)</sup> *Molkerei Zeitung*, Hildesheim, 46, 1451 (1932).

<sup>2)</sup> *Journ. Dairy Res.*, 5, 54 (1933).

<sup>3)</sup> *Journ. Dairy Science*, 16, 445 (1933).

<sup>4)</sup> *Biochem. Zeitschr.*, 67, 382 (1914).

<sup>5)</sup> *Zeitschr., f. Unters. d. Lebensmittel*, 68, 270 (1934).

## EXPERIMENTEEL GEDEELTE.

Het experimenteele gedeelte van het volgende onderzoek omvat een studie van de eigenschappen der phospholipoiden, die in zoo zuiver mogelijken toestand uit karnemelk en andere producten zijn bereid, en het zoeken naar een eenvoudige methode om in melk en hieruit bereide stoffen de phospholipoiden te bepalen; dit laatste bestaat eigenlijk uit twee gedeelten: 1° hoe moet geëxtraheerd worden om een zoo zuiver mogelijk en volledig extract der phospholipoiden te verkrijgen? 2° de bepaling van de P in dit extract.

Vooraf ga de wijze, waarop de lipoid-P in de verschillende extracten is bepaald en de factoren, waarmede bij de microbepaling, waarvan gebruik is gemaakt, rekening gehouden dient te worden. Na verdampen van het oplosmiddel en destructie (waarover hieronder méér) wordt de hoeveelheid verkregen fosphaat bepaald met behulp van een strychnine-molybdaen reagens, in hoofdzaak volgens MEDINGER <sup>1)</sup> met eenige kleine wijzigingen; de troebeling van phosphorzure strychnine-molybdaat, die bij toevoeging van het reagens ontstaat, kan nephelometrisch worden bepaald. Hiertoe werd gebruik gemaakt van cuvetjes van 10 cm<sup>3</sup>, zooals bij den colorimeter van HELIGE worden gebruikt, en bij verticaal doorzicht vergeleken. Het volume van de te onderzoeken hoeveelheid of van de vergelijkingsvloeistof wordt tot 9 cm<sup>3</sup> gebracht en vervolgens 1 cm<sup>3</sup> reagens toegevoegd. De hoeveelheden P, die men zoo kan bepalen, liggen tusschen 0,002—0,008 mg; zóó werkende ontstaat niet of pas na langen tijd een vlokkig praecipitaat; de troebeling heeft na eenige minuten een constante waarde en blijft geruimen tijd constant.

We hebben aan de strychnine-molybdaen-methode de voorkeur gegeven boven de ook wel veel gebruikte, volgens BELL-DOISY-BRIGGS <sup>2)</sup>; deze laatste is minder gevoelig (de te bepalen hoeveelheden P liggen tusschen 0,025—0,5 mg); de gevoeligheid voor zuur van de blauwe kleur, die na toevoeging van het reagens ontstaat, en het verloopen van die kleur werd als een bezwaar ondervonden.

Van het uit melk of andere producten verkregen extract werd in het algemeen van 40 cm<sup>3</sup> in een microdestructiebuis (diameter  $\pm$  3 cm, totale lengte 15,5 cm) met behulp van een waterstraalluchtpomp het oplosmiddel verdampt en het residu verascht volgens NEUMANN met een zwavelzuur-salpeterzuur-mengsel. Bij pogingen om een destructie met zuur te omgaan en het residu in een microcalorimeterbom te verbranden (25 atm., zuurstof) zijn geen goede resultaten verkregen; ook bij verbranden van kleine hoeveelheden fosphaat onder toevoeging van vet of suiker bleken deze onder deze omstandigheden gedeeltelijk gereduceerd te worden. Na eenige keeren verdampen met perchloorzuur werd de oorspronkelijke hoeveelheid teruggevonden. Dit is in tegenstelling met MOHR en MOOS <sup>3)</sup>, die bij verbranden van boter in een calorimeterbom goede resultaten verkregen.

De destructie met zuur heeft het nadeel, dat na de destructie een hoeveelheid zwavelzuur met het fosphaat overblijft, waarmee men bij de nephelometrische

<sup>1)</sup> *Chem. Zeit.*, 39, 781 (1915).

<sup>2)</sup> *Journ. biol. Chem.*, 53, 13 (1922).

<sup>3)</sup> *Milchw. Forschungen*, 13, 385 (1932).

bepaling rekening moet houden, terwijl het anderzijds niet wenschelijk is om de destructie met minder dan 0,5 cm zuurmengsel (zwavelzuur-salpeterzuur 1 : 1) uit te voeren. Te hooge plaatselijke verhitting van de destructiebuisen of te lange verhitting kan namelijk aanleiding geven tot de vorming van pyrophosphorzuur met vluchtige eigenschappen. De destructie moet dus voorzichtig worden uitgevoerd; opnieuw toevoegen van salpeterzuur, wanneer de oorspronkelijke hoeveelheid is verbruikt, moet tijdig geschieden.

Als voorbeeld geven we nu de bepaling, zooals ze in melk is uitgevoerd: 20 cm<sup>3</sup> melk worden in een maatkolfje van 25 cm<sup>3</sup> door toevoeging van ammoniak tot de streep aangevuld en voorzichtig gemengd. 1,25 cm<sup>3</sup> van het mengsel wordt al of niet met Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 g) gedroogd en door ½ à 1 uur schudden bij kamertemperatuur geëxtraheerd met 50 cm<sup>3</sup> van een alcohol (96 %) aether-mengsel (3 : 1); 40 cm<sup>3</sup> worden snel afgefiltreerd; in een microdestructiebuis wordt het oplosmiddel daarvan in vacuo snel verdampt en het residu verascht met 0,5 cm<sup>3</sup> van een zwavelzuur-salpeterzuur-mengsel (1 : 1), zoo noodig onder toevoeging van salpeterzuur. Na afloop van de destructie wordt met wat water verwarmd (nitrosyl-zwavelzuur) en aangevuld tot 10 cm<sup>3</sup>. Dan wordt de fosphaatbepaling uitgevoerd in 1,5 à 3 cm<sup>3</sup> hiervan, overeenkomende dus met 120—240 mm<sup>3</sup> melk. (Men doet goed de fosphaatbepaling in twee verschillende hoeveelheden uit te voeren; men kan zodoende tevens controleeren of de hoeveelheid zwavelzuur, bij de destructie achtergebleven, niet storend werkt).

Men neemt dus de gewenschte hoeveelheid van de tot 10 cm<sup>3</sup> verdunde gedestructureerde vloeistof, vult aan tot 9 cm<sup>3</sup> en voegt 1 cm<sup>3</sup> van het molybdaenreagens toe. Om een vergelijkingschaal te maken neemt men hoeveelheden van 0,15—0,5 cm<sup>3</sup> van een fosphaatoplossing (deze bevat 20 mg P per l of 87,6 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> per l en een paar druppels chloroform tegen bederf), vult deze met zwavelzuur ( $\pm$  3,5 cm<sup>3</sup> sterk H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> op 500 cm<sup>3</sup>) eveneens aan tot 9 cm<sup>3</sup>, voegt 1 cm<sup>3</sup> reagens toe (in cm<sup>3</sup> verdeelde reageerbuisen bewijzen hierbij goede diensten) en vergelijkt de ontstane troebelingen. De bepaling, zóó uitgevoerd, is nauwkeurig tot op minstens 10 % relatief; door de bepaling uit te voeren met twee verschillende hoeveelheden van de onbekende stof, zooals reeds werd gezegd, is de nauwkeurigheid nog belangrijker. Misschien kan met een nephelometer grootere nauwkeurigheid worden bereikt.

Het molybdaenreagens bereidde ik op de volgende wijze: los op 4 g ammoniummolybdaat in 10 cm<sup>3</sup> water, filtreer glashelder en voeg toe zooveel van een verzadigde strychninenitraatoplossing ( $\pm$  1 g op 65 cm<sup>3</sup>) dat een even blijvende troebeling ontstaat. Dit zal 8 à 9 cm<sup>3</sup> zijn. Meng de strychnine-molybdaat-oplossing met een gelijk volume salpeterzuur (s.g. = 1,33) laat over nacht staan en filtreer af van de lichte troebeling. Het reagens wordt bij bewaren donkerder van kleur en soms zwak troebel; het moet niet te oud worden gebruikt.

Wat nu betreft de extractie, meenden we oorspronkelijk goede resultaten te kunnen bereiken, wanneer de phospholipoiden op de wijze werden bepaald, zooals door GRAHAM en KAY <sup>1)</sup> was aangegeven. Daar dezen slechts 1 cm<sup>3</sup> melk gebruikten op 50 cm<sup>3</sup> alcohol-aether-mengsel (3 : 1), was de kans groot, dat eenerzijds de dehydrateerende werking van de extractievloeistof groot

<sup>1)</sup> GRAHAM en KAY, l c.

genoeg zou zijn om een zuiver extract te verkrijgen en anderzijds een volledige extractie der phospholipoiden zou worden verkregen. Op deze wijze werkende vonden we echter in ondermelk, in zeer scherp gecentrifugeerde ondermelk en zelfs in ultrafiltraat ervan een hoeveelheid organische phosphorus, die met 0,07 à 0,12 % phospholipoid zou overeenstemmen. In dat geval zouden dan de phospholipoiden in ware oplossing moeten zijn, wat niet zeer waarschijnlijk is. Toch is er nog getracht uit vetvrije ondermelk phospholipoiden te bereiden op een wijze zooals dat voor karnemelk zeer goed mogelijk bleek te zijn. Dit is niet gelukt. Wel bleek bij deze pogingen, dat wanneer b.v. vóór de extractie gedroogd werd met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , een gedeelte van de organische P hierdoor werd geadsorbeerd; deze P-verbindingen waren met  $\pm 70\%$ -ige alcohol weer in oplossing te brengen; het waren géén phospholipoiden, dus phosphorzure esters. We hebben de extractie-methode toen zoo gewijzigd, dat we  $1\text{ cm}^3$  melk of ondermelk eerst droogden met 3 g  $\text{NaSO}_4$  en vervolgens extraheerden met het alcohol-aether-mengsel 3 : 1; in tegenstelling met de oorspronkelijke methode, die we hieronder als „natte” extractie hebben aangegeven, hebben we dit „droge” extractie genoemd.

Uit de volgende tabel I blijkt, dat de hoeveelheid, die als phospholipoid beschouwd wordt, verkregen door droge extractie uit volle melk, ondermelk, gesteriliseerde ondermelk en ultrafiltraat, veel kleiner is dan die, verkregen door natte extractie. Bij zure karnemelk, zoete karnemelk en room zijn de verschillen tusschen natte en droge extractie zeer gering. Dit wijst er eenerzijds op, dat ook bij de droge extractie-methode uit volle melk en ondermelk nog een organische P-verbinding wordt geëxtraheerd, die geen phospholipoid kan zijn, omdat de hoeveelheid, die uit het ultrafiltraat geëxtraheerd kan worden, practisch gelijk is aan die uit de oorspronkelijke ondermelk.

TABEL I.

*Hoeveelheid organische P, berekend als phospholipoid, verkregen door :*

Aard van de stof.	natte extractie.	droge extractie.	$\Delta$
Volle melk . . . . .	0,12	0,07 <sup>s</sup>	0,04 <sup>s</sup>
Ondermelk . . . . .	0,09	0,05—	0,04+
Gesteriliseerde ondermelk . . . . .	0,11	0,04 <sup>s</sup>	0,06 <sup>s</sup>
Gezuurde ondermelk . . . . .	0,09	0,05	0,04
Gekarnde gezuurde ondermelk . . . . .	0,08+	0,05	0,03+
Ultrafiltraat . . . . .	0,06	0,04—	0,02+
Zure karnemelk <sup>1)</sup> . . . . .	0,12	0,11	0,01
Zoete karnemelk . . . . .	0,11	0,10	0,01
Room ( $\pm 20\%$ ) . . . . .	0,20	0,19	0,01

<sup>1)</sup> Een meer uitgebreid onderzoek van zure karnemelk heeft uitgewezen, dat ook daar verschillen tusschen natte en droge extractiemethode tot 0,03 % kunnen optreden.

Anderzijds schijnt het, dat in karnemelk en room minder van deze P-verbindingen voorkomen en meer phospholipoiden. Zoowel dus bij de bereiding van phospholipoiden in zuiveren toestand uit melk e.a. als bij het maken van een extract voor de quantitative bepaling der phospholipoiden is de ervaring opgedaan, dat er in melk een organische P-verbinding voorkomt, die van invloed is op de bepaling der phospholipoiden en dan de aanleiding is, dat deze te hoog zal uitvallen.

We hebben tevens gemeend te mogen aannemen, dat de phospholipoiden ten nauwste met de vetbolletjes in de melk zijn verbonden en wel om de volgende redenen:

1°. Uit, zonder eenige toevoeging, versch bereid ondermelkpoeder-KRAUSE kan door een extractie, analoog aan die, gevolgd bij de quantitative bepaling (droge methode), een organische P-verbinding worden bereid, die geen phospholipoid is. Deze P-verbinding is n.l. in water zeer gemakkelijk helder oplosbaar, bovendien geeft ze bij verzeepen geen vetzuur en breidt zich op water niet uit zooals de phospholipoiden, heeft echter esterachtige eigenschappen, die zeer sterk aan glycerophosphorzuur doen denken (moeilijke verzeepbaarheid met alkali, langzame hydrolyse door zuren<sup>1)</sup>). De hoeveelheid van deze P-verbinding, uit ondermelkpoeder te bereiden, is van dezelfde orde van grootte als de hoeveelheid organische P, bij de quantitative bepaling volgens de bovenomschreven droge methode bepaald, in ondermelk.

2°. De hoeveelheid uit met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gedroogde ondermelk met een alcohol-aether-mengsel extraheerbare hoeveelheid organische P verandert niet of practisch niet, wanneer men:

- a. de ondermelk nogmaals aan een zeer scherpe centrifugeering onderwerpt (16000 toeren per min.) en dus geheel vetvrij maakt, of
- b. ultrafiltreat maakt van de ondermelk en in deze de bepaling uitvoert.

Zie hiervoor ook tabel I, waar slechts een keuze is gedaan uit meerdere bepalingen, in al deze producten uitgevoerd, daar ze wat dit betreft steeds dezelfde uitkomsten gaven.

Wanneer we nu dus moeten aannemen, dat de uit ondermelk extraheerbare P geen lipoid-P, doch ester-P is, dan blijft er blijkens tabel I slechts weinig lipoid-P voor de volle melk over en deze zal dan dus in de membranen der vetbolletjes voorkomen. Dit maakte het waarschijnlijk, dat een betere extractie der phospholipoiden zou worden verkregen, wanneer eerst een behandeling met ammoniak werd toegepast, zooals bij de methode GOTTLIEB-RÖSE. Dit bleek het geval te zijn; in de vethoudende producten volle melk en room wordt de extraheerbare lipoid-P verhoogd, wanneer eerst ammoniak wordt toe-

<sup>1)</sup> MALENGREAU en PRIGENT, *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 73, 68 (1911): Über die Geschwindigkeit der Hydrolyse der Glycerinphosphorsäure.



gevoegd; bij de ondermelk maakt het geen verschil, ook niet in de karnemelk, waar de membranen der vetbolletjes dan ook door het flotatieproces in een anderen toestand zijn gekomen dan in de melk (zie tabel II).

TABEL II.

*Hoeveelheid phospholipoid.*

Aard van de stof.	Droge extractie.	Droge extractie, eerst $\text{NH}_4\text{OH}$ toegevoegd.
Melk . . . . .	0,06—%	0,07 <sup>5</sup> %
Ondermelk . . . . .	0,03 <sup>7</sup> %	0,03 <sup>7</sup> %
Room . . . . .	0,12 %	0,16 %
Karnemelk (zuur) . . . . .	0,12 <sup>5</sup> %	0,12 <sup>5</sup> %

Hoewel dus uit de voorafgaande beschouwing blijkt, dat de bepaling der phospholipoiden in melk nog te hooge waarden geeft, wanneer met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gedroogde melk met het alcohol-aether-mengsel wordt geextraheerd, en met de in de vetvrije ondermelk gevonden waarde zal moeten worden verminderd, hebben we toch gemeend een serie bepalingen uit te moeten voeren in de producten, die bij het botermaken optreden. We hebben steeds de droge extractiemethode gevolgd na voorafgaande behandeling met ammoniak. In de boter moest, om niet al te veel vet in het extract te krijgen, de techniek wat worden gewijzigd; we hebben deze bepaling als volgt uitgevoerd.

Een bekende hoeveelheid boter werd gesmolten in een centrifugebuis en dan snel met een warmwatermantel gecentrifugeerd. Dan werd de heldere olielaag grootendeels afgeschonken, de buis vervolgens diep afgekoeld en de laatste hoeveelheid vet kon dan eenvoudig worden verwijderd. In de bekende hoeveelheid waterige vloeistof, die men zoo overhield, werden de phospholipoiden op de gewone wijze bepaald.

De uitkomsten van een dergelijke proef zijn in tabel III vereenigd; er werd van  $\pm 15$  kg melk uitgegaan, waarvan de room, na koeling en zuring, in een laboratoriumkarntje werd verkarnd. De waarde, die voor het phospholipoidgehalte van de ondermelk staat opgegeven, is dus berekend uit ester-P.

Er zijn nu in de melk en de daaruit verkregen vetvrije ondermelk een aantal bepalingen op verschillende wijze uitgevoerd. In tabel IV zijn hiervan eenige uitkomsten opgegeven; in tegenstelling met tabel III geven we hierin de gevonden waarden aan als mg P per 100  $\text{cm}^3$  melk. Daar we de in de ondermelk gevonden hoeveelheid als ester-P moeten beschouwen en slechts het

TABEL III.

Aard van het product.	in g.	Hoeveelheid phospholipoid	
		in %	in g abs. hoeve.
Melk . . . . .	15000	0,07 <sup>s</sup>	<b>10,3</b>
Ondermelk . . . . .	12480	0,05	6,24
Centrifugeslib . . . . .	49	0,75	0,37
Room . . . . .	2335	0,14 <sup>a</sup>	3,32
			room + ondermelk + slib bevat <b>9,93 g.</b>
Room + zuursel in de karn <sup>1)</sup> . . . . .	2320	—	<b>3,18</b>
Karnemelk . . . . .	1410	0,12 <sup>s</sup>	1,76
Boter . . . . .	577	0,16 <sup>a</sup>	0,95
Verlies aan karnemelk wegens wasschen	333	0,12 <sup>s</sup>	0,42
			karnemelk + boter + verlies <b>3,13 g.</b>

verschil tusschen de in ondermelk en in volle melk gevonden waarden als lipoid-P aannemen, is in dit geval deze wijze van uitdrukken meer in overeenstemming met de werkelijkheid. Melk en ondermelk, die met hetzelfde cijfer zijn aangegeven, behooren bij elkaar. We hebben gebruik gemaakt van de natte extractie met alcohol-aether (A-Ae, N), van de droge extractie daarmee (A-Ae, D) en van die volgens GOTTLIEB-RÖSE (G.R.). O = ondermelk, V = volle melk.

Uit de cijfers van tabel IV (het zijn er slechts eenige uit meerdere bepalingen, waarvan de uitkomsten analoog waren aan de vermelde) kan men de volgende conclusies trekken:

1°. Wanneer niet eerst gedroogd wordt met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  vóór de extractie met alcohol-aether, wordt zoowel in de ondermelk als in de volle melk méér organische P gevonden, dan wanneer gedroogd wordt. De hoeveelheid lipoid-P is echter in beide gevallen dezelfde (n°. 1—5 en 7—10).

2°. Wanneer volgens GOTTLIEB-RÖSE wordt geëxtraheerd, wordt zoowel in het ondermelk-als in het volle-melk-extract minder organische P gevonden dan bij het gebruik maken van alcohol-aether. Ook de lipoid-P is dan echter minder (n°. 5 en 6).

3°. De hoeveelheid lipoid-P in melk zal waarschijnlijk slechts een waarde hebben, die gemiddeld niet veel van 0,7—0,8 mg-P per 100 cm<sup>3</sup> afwijkt.

Uit de proeven, waarvan eenige in tabel IV zijn vermeld, is de indruk verkregen, dat in den weidetijd, vooral de ester-P aan meer schommelingen onderhevig was dan dat in den staltijd het geval was. Deze waarnemingen moeten echter worden uitgebreid.

<sup>1)</sup> De geheele hoeveelheid room kon niet in het karntje worden gebracht; er was  $\pm 5\%$  vetvrij zuursel aan toegevoegd.

TABEL IV.

N <sup>o</sup> .	Onderzochte stof.	gevolgde methode van extractie.	Mg org. P per 100 cm.		Mg lipid-P per 100 cm.
			O.	V.	
1	O I . . . . .	A—Ae, N	2,8 <sup>o</sup>	—	—
2	V I . . . . .	A—Ae, N	—	3,6 <sup>5</sup>	0,8 <sup>5</sup>
3	O I . . . . .	A—Ae, D	1,7 <sup>4</sup>	—	—
4	V I . . . . .	A—Ae, D	—	2,6 <sup>o</sup>	0,8 <sup>o</sup>
5	O II . . . . .	G.R.	0,4 <sup>o</sup>	—	—
6	V II . . . . .	G.R.	—	1,0 <sup>o</sup>	0,6 <sup>o</sup>
7	O II . . . . .	A—Ae, D	1,7 <sup>2</sup>	—	—
8	V II . . . . .	A—Ae, D	—	2,5 <sup>2</sup>	0,8 <sup>o</sup>
9	O II . . . . .	A—Ae, N	2,4 <sup>4</sup>	—	—
10	V II . . . . .	A—Ae, N	—	3,2 <sup>4</sup>	0,8 <sup>2</sup>
11	O III weidemelk	A—Ae, D	2,8 <sup>o</sup>	—	—
12	V III . . . . .	A—Ae, D	—	3,6 <sup>o</sup>	0,8 <sup>o</sup>
13	O IV . . . . .	A—Ae, D	2,3 <sup>2</sup>	—	—
14	V IV . . . . .	A—Ae, D	—	3,1 <sup>2</sup>	0,8 <sup>o</sup>
15	O V . . . . .	A—Ae, D	3,3 <sup>2</sup>	—	—
16	V V . . . . .	A—Ae, D	—	4,0 <sup>o</sup>	0,6 <sup>3</sup>
17	O VI . . . . .	A—Ae, D	2,6 <sup>o</sup>	—	—
18	V VI . . . . .	A—Ae, D	—	3,2 <sup>o</sup>	0,6 <sup>o</sup>
19	O VII stal melk	A—Ae, D	2,0 <sup>o</sup>	—	—
20	V VII . . . . .	A—Ae, D	—	2,8 <sup>o</sup>	0,8
21	O VIII . . . . .	A—Ae, D	2,0 <sup>4</sup>	—	—
22	V VIII . . . . .	A—Ae, D	—	2,8 <sup>o</sup>	0,7 <sup>4</sup>

Neemt men aan een hoeveelheid van 0,7—0,8 mg lipid-P per 100 cm<sup>3</sup> melk, dan komt dit dus ongeveer overeen met 175—200 mg phospholipoid per l melk.

Uit een onderzoek van SIRKS<sup>1)</sup>, waarbij het aantal vetbolletjes van verschillende grootteklassen in een bekend volume melk (vetgehalte 2,86 %) werd geteld, kan berekend worden dat het vetoppervlak in 1 l melk  $\pm 56$  m<sup>2</sup> is. Neemt men met ROGERS<sup>2)</sup> aan, dat gemiddeld per cm<sup>3</sup> melk  $3 \times 10^9$  bolletjes aanwezig zijn met een gemiddelden diameter van  $3 \mu$ , en dat men het totale vetoppervlak mag berekenen door dit als diameter aan te nemen, dan volgt daaruit, dat 1 l melk een vetoppervlak van  $\pm 84$  m<sup>2</sup> vertegenwoordigt. FLEISCHMANN-WEIGMAN<sup>3)</sup> komen met een dergelijke berekening tot een vetoppervlak van  $\pm 73,5$  m<sup>2</sup> per kg melk. Hierbij nu in aanmerking nemende, dat 1 mg phospholipoid een monomoleculaire laag van 0,5 m<sup>2</sup> kan

<sup>1)</sup> *Versl. landbk. Onderz.*, N<sup>o</sup>. 41 C, 16 (1935).

<sup>2)</sup> *Fundamentals of Dairy Science*, (1928) p. 143.

<sup>3)</sup> *Lehrbuch d. Milchwirtschaft*, 7e Auflage, S. 89.

vormen, zooals GORTER<sup>1)</sup> voor de bloedlipoiden aanneemt, dan is de in melk aanwezige hoeveelheid phospholipoid dus in staat een monomoleculair oppervlak van 87,5—100 m<sup>2</sup> te vormen, voldoende dus om de vetbolletjes te bedekken. De spreiding van de phospholipoiden der melk dient echter nader te worden onderzocht.

### BEREIDING DER PHOSPHOLIPOIDEN EN PHOSPHORZURE ESTER(S) UIT MELK EN HAAR PRODUCTEN.

Uit de cijfers van tabel III krijgt men een indruk hoe de P, die wel als lipoid-P beschouwd wordt, over de verschillende producten tijdens de boterbereiding wordt verdeeld. Zooals reeds is gezegd, meenen we uit de cijfers voor organische P, in ultrafiltraat gevonden, in combinatie met de onmogelijkheid om uit vetvrije ondermelk phospholipoiden te bereiden, te mogen aannemen, dat de z.g. lipoid-P in ondermelk beter als ester-P beschouwd kan worden. Dan zullen dus de karnemelk en de waterige phase van de boter de beste objecten moeten zijn om er de phospholipoiden uit af te zonderen.

Voor een bereiding uit zure karnemelk b.v. zijn we als volgt te werk gegaan:

Telkens 1 l karnemelk wordt op groote vouwfilters gebracht (SCHLEICHER en SCHÜLL, n<sup>o</sup>. 1117½) en het eiwit enz., dat na een paar uren uitlekken op het filter achterblijft (de zoo verkregen filtraten waren zóó helder, dat we konden aannemen, dat de phospholipoiden in hoofdzaak in het neerslag worden vastgehouden), wordt tusschen filtreerpapier nog wat uitgeperst en dan in een mortier met zooveel uitgedroogd natriumsulfaat aangewreven, dat een droog poeder wordt verkregen.

Dit poeder wordt door eenige uren te schudden bij kamertemperatuur met 500 cm<sup>3</sup> chloroform of met een alcohol-aether-mengsel geëxtraheerd; door een BUCHNER-trechter wordt afgefiltreerd en het filtraat bij lage temperatuur (beneden 37° C) in vacuo in een koolzuurstroom ingedampt tot een klein volume, 20 à 30 cm<sup>3</sup>. Hieraan wordt dan de 6-voudige hoeveelheid aceton toegevoegd, waardoor de phospholipoiden en een gedeelte van het vet neerslaan. Om nu deze ruwe phospholipoiden van vet te zuiveren kan men ze eenige keeren uit aceton ompraecipiteeren, zooals wel gebruikelijk is; we hebben er echter de voorkeur aan gegeven ze te zuiveren door dialyse<sup>2)</sup> in dunne rubbermembranen. Hiertoe gaat men als volgt te werk: de ruwe phospholipoiden worden in aether opgelost en in een rubber huls gebracht. Deze wordt in een extractieapparaat gemonteerd en de vloeistof aan een doorlopende dialyse

<sup>1)</sup> GORTER en DE GRAAFF, *Klinische Diagnostiek* (1930), p. 118; ook GORTER en GRENDEL, *Biochem. Zeitschr.* 192, 431 (1928).

<sup>2)</sup> GIES, *Biochem. Bull.* 2, 55 (1912), Studies of diffusion through rubber membranes.

met aether onderworpen. Al het vet gaat door de rubbermembraan heen; de phospholipoiden blijven in de huls.

Ook een lecithinepreparaat „Kahlbaum”, dat waarschijnlijk nog vet bevatte, kon door dialyse goed worden gezuiverd. Het vet, dat door de membraan heen ging, was practisch vrij van phosphorus, het gezuiverde preparaat vertoonde een verhouding  $N : P = 1 : 1,08$ ; het ongezuiverde preparaat had een joodadditiegetal = 111, het gezuiverde 65,5. Driemaal ompraecipiteeren uit aceton leidde tot hetzelfde resultaat. Wanneer het bijgemengde vet een hoog smeltpunt heeft, zal de ompraecipitatie uit aceton minder effect hebben, terwijl de zuivering door dialyse, zooals ik heb opgemerkt, toch zeer vlot verloopt. Ook de, in de extracten aanwezige, cholesterine wordt door de dialyse geheel verwijderd.

Ten slotte worden de in de huls achtergebleven phospholipoiden (ze zijn gewoonlijk dan niet meer geheel in oplossing) weer in een overmaat aceton gebracht, een tijd in een koelkast geplaatst, het neerslag afgefiltreerd en in een vacuum-exsicator gedroogd naast phosphorpenoxyde en paraffine. Het zoo verkregen preparaat was gewoonlijk toch nog wel iets gekleurd; het was hygroscopisch, bij eenigen tijd aan de lucht laten staan werd het eenigszins kleverig. De samenstelling en de eigenschappen van uit verschillende producten bereide preparaten waren bevredigend overeenstemmend, zooals blijkt uit tabel V en de verhouding van phosphorus en stikstof wijst erop, dat in hoofdzaak een mono-amino-phospholipoid aanwezig moet zijn. Behalve uit zure karnemelk zijn de phospholipoiden bereid uit room en uit het vocht van de boter. In deze gevallen werd of  $\frac{1}{2}$  l room geheel gedroogd met  $Na_2 SO_4$  vóór de extractie of het vocht van de boter werd op dezelfde wijze behandeld. Bij de bereiding uit room was het preparaat sterk met vet verontreinigd; eenige keeren ompraecipiteeren uit aceton, gecombineerd met langdurige, voorzichtige dialyse leidde toch tot een preparaat, in hoofdzaak identiek met dat uit de karnemelk.

Wanneer de versch bereide phospholipoid-preparaten opgelost werden in gefiltreerd botervet, bleken ze de breking daarvan sterk te verhoogen; ook het joodadditiegetal van botervet zal in het algemeen door de aanwezigheid van phospholipoiden worden verhoogd (zie tabel V); bij de verschillende vetextracties, die in het reeds genoemde onderzoek over het karnproces<sup>1)</sup> zijn uitgevoerd, zal een gedeelte van de anomalien, daar somtijds gevonden, door de aanwezigheid van phospholipoiden verklaard kunnen worden. Echter vertoont cholesterine, wat betreft den invloed op joodadditiegetal en breking, dezelfde eigenschappen en men zal met aanwezigheid van deze stof in vet-extracten ook misschien rekening hebben te houden.

Zooals reeds werd gezegd, is het niet mogen gelukken uit ondermelk een

---

<sup>1)</sup> VAN DAM en HOLWERDA, I. c.

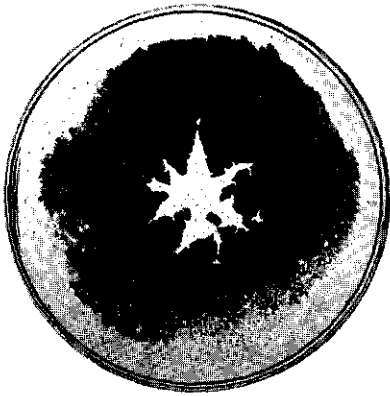
phospholipoidpreparaat te maken zooals dat uit room, karnemelk, botervocht en ook uit volle melk (in dit laatste preparaat werd slechts het P-gehalte bepaald en het is daarom in tabel V niet vermeld) steeds gelukte. Op verschillende wijzen is getracht dit te bereiken:

TABEL V.

Aard van het preparaat.	loodadditiegetal.	N in %.	P in %.	N : P-verhouding in mol.
uit karnemelk I . . . . .	60,5	1,7	3,74	1 : 1,02
„ „ II . . . . .	63,9	1,78	3,36	1,17 : 1
„ room . . . . .	58,8	1,54	3,33	1,03 : 1
„ boter . . . . .	61,2	1,63	3,80	0,91 : 1

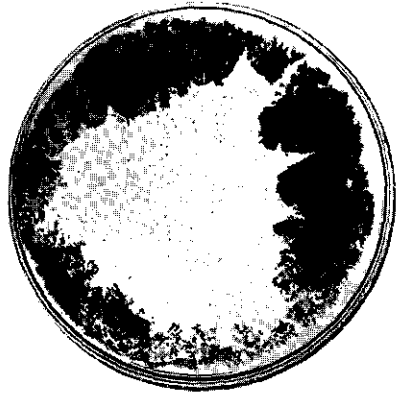
daar de extraheerbare organische-P ook aanwezig bleek te zijn in het filtraat, verkregen na zuring van de ondermelk, en affiltreeren van het neerslag, werd dit filtraat tot een klein volume ingedampt (in vacuo in koolzuurstroom), vervolgens gedroogd met  $\text{Na}^2\text{SO}_4$  en geëxtraheerd. Zoo werkende was het mogelijk van wat meer uitgangsmateriaal gebruik te maken. Phospholipoiden, zooals ze uit de andere melkproducten konden worden bereid, waren echter uit vetvrije ondermelk niet te verkrijgen, zooals was te verwachten. (Tabel I). We hebben toen getracht de organische-P-verbinding, aanwezig in ondermelk, in wat grootere hoeveelheid te bereiden, om wat van de eigenschappen ervan te leeren kennen.

Daartoe werd uitgegaan van versch bereid ondermelkpoeder „KRAUSE” (vetgehalte 1%), afkomstig van de Coöperatieve Zuivelfabriek te Bedum. Van 500 g werd telkens 100 g bij kamertemperatuur door schudden geëxtraheerd met 1 l van het alcohol-aether-mengsel, gefiltreerd en het filtraat bij lage temperatuur (niet boven  $37^\circ \text{C}$ ) in vacuo in  $\text{CO}_2$ -stroom ingedampt. Het bleek, dat men niet minder extractievloeistof kon nemen, daar in dat geval de opbrengst aan ester-P minder werd. De vereenigde en tot een klein volume ingedampde filtraten konden niet meer in aether worden opgenomen; er ontstonden bij toevoegen van aether twee lagen, die werden gescheiden. Uit de aetherische laag kon na dialyse een kleine hoeveelheid phospholipoid worden bereid ( $\pm 200 \text{ mg}$ ). De volkomen heldere, waterige oplossing bevatte geen anorganische P, doch een hoeveelheid organische P, die met  $\pm 600 \text{ mg}$  phospholipoid zou overeenkomen. De waterige oplossing was zeer slecht droog te krijgen (in vacuo naast  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), er ontstond dan een dik strooperig vocht; ze bevatte ook veel stikstof, n.l. 3 g, en vertoonde sterke reductie met



A

Verdriving van koolpoeder  
door phosphorzure ester,  
uit melk bereid.



B

Verdriving van koolpoeder  
door phospholipoid, uit  
melk bereid.

Fehling (lactose) Het is ons niet gelukt de phosphorzure esters uit deze waterige vloeistof nog verder te isoleeren. Dialyse tegen aether leverde, zooals te verwachten was, geen resultaat.

We hebben echter van deze organische-P-verbinding of phosphorzure ester, zooals we deze in het vervolg zullen noemen, de volgende eigenschappen geconstateerd en deze vergeleken met die van het phospholipoïde (uit de aetherische oplossing dus verkregen), uit hetzelfde melkpoedermonster bereid.

De verzeeping van de phosphorzure ester met alcoholische kali gaat zeer langzaam, evenals de hydrolyse door zuur. Dit heeft deze phosphorzure ester dan gemeen met glycerophosphorzuur <sup>1)</sup>.

Bij de hydrolyse van de phosphorzure ester ontstaat geen vetzuur, dat zich bij die van het phospholipoïde wel vormt.

De phosphorzure ester is volkomen helder in water oplosbaar, doch niet in petroleumaether, chloroform en andere organische oplosmiddelen, waarin het phospholipoïde uitstekend oplost.

De phosphorzure ester vertoont geen of practisch geen uitbreiding over een met koolpoeder of talk bestrooid wateroppervlak. Het phospholipoïde verbreidt zich sterk daarover en verdringt de kool- of talkdeeltjes. De figuur geeft het beeld van een dergelijke proef met kool. Tot dat doel werd het ronde uiteinde van een staaf in de waterige oplossing met de phosphorzure ester gedoopt en bij kamertemperatuur gedroogd. Hetzelfde werd met een oplossing van phospholipoïde in petroleumaether gedaan. Op het wateroppervlak van een goed gereinigde en met water gedeeltelijk gevulde Petrischaal werd koolpoeder gestrooid, zóó, dat het oppervlak bijna geheel bedekt was en vervolgens in het midden één à twee seconden met de bovengenoemde staven aangeraakt. Het verschil in gedrag is duidelijk: de phosphorzure ester verdrijft de kool weinig of niet van het oppervlak (A), het phospholipoïde wèl (B). Ook bij beweging van de schalen was duidelijk op te merken, dat bij B een oppervlaktevlies van vrij groote stevigheid was gevormd, bij A niet. Met talk werden dezelfde soort uitkomsten verkregen.

Deze phosphorzure esters zijn herhaaldelijk uit ondermelkpoeder bereid kunnen worden; de eigenschappen ervan waren steeds dezelfde.

### CONCLUSIE EN SAMENVATTING.

De zeer uiteenlopende waarden, die in de literatuur gevonden worden voor het phospholipoïdegehalte van melk en haar producten zijn voor een groot deel daaraan toe te schrijven, dat in de melk een phosphorzure ester

---

<sup>1)</sup> Zie MALENGREAU en PRIGENT, l.c.



voorkomt, waarmede bij de phospholipoidbepaling geen rekening is gehouden en die van invloed is op de uitkomsten.

Het is niet gelukt om in melk direct tot een bepaling van het gehalte aan phospholipoiden te komen; het is noodig om zoowel van de volle melk als van de ondermelk een alcohol-aetherisch extract te maken en in deze extracten de organische P te bepalen; het verschil tusschen beide waarden is dan de lipoid-P.

De genoemde ester-P is oorzaak, dat de meeste waarden, die voor het phospholipoidgehalte der melk worden genoemd te hoog zijn; het bedrag is slechts 0,7—0,8 mg lipoid-P per 100 cm<sup>3</sup> melk, terwijl bij verwaarloozing van den invloed van den ester P drie- tot vijfmaal meer gevonden wordt.

De phospholipoiden zijn in de melk ten nauwste verbonden met de vetbolletjes; in de karnemelk is de toestand klaarblijkelijk anders. Het niet voorkomen van lipoid-P in vetvrije ondermelk wijst er op, dat van normale adsorptie van phospholipoid aan de vetbolletjes geen sprake kan zijn. Deze worden blijkbaar met de phospholipoidhoudende membranen als een eenheid door de melkklier afgescheiden.

Er is in de melk voldoende phospholipoid aanwezig om een monomoleculaire laag om de vetbolletjes te vormen.

Uit melk, karnemelk en het vocht van de boter kan een mono-amino-phospholipoid bereid worden, dat vrij constant is van samenstelling.

Uit ondermelkpoeder is (niet in zuiveren toestand) een in water oplosbare organische phosphorverbinding bereid; deze vertoont esterachtige, doch volstrekt geen lipoidachtige eigenschappen en veroorzaakt het bovengenoemde surplus bij de meeste methoden voor phospholipoidbepalingen.

Het bipolaire karakter der phospholipoiden is oorzaak, dat ze uit melk niet volledig extraheerbaar zijn zonder gelijktijdig de hydrophiele esters uit te trekken. Om deze reden was het niet mogelijk de bepaling van de lipoid-P in één bewerking uit te voeren; men moet zich met een verschilmethode behelpen, die trouwens bevredigende uitkomsten geeft.

#### *Naschrift.*

Na het beëindigen van dit artikel namen we nog kennis van een studie van LOBSTEIN en FLATTER<sup>1)</sup> over de lipoid-P en phosphatiden van de koemelk. Ze komen tot de conclusie, dat deze slechts gemiddeld 0,03 % phosphatiden bevat en wijzen tevens op de noodzakelijkheid de extracten van verontreinigende P-verbindingen vrij te maken; ze wijzen vooral op P-houdende eiwitverbindingen en meenen ook uit hun onderzoek te mogen concludeeren, dat de

---

<sup>1)</sup> *Le Lait*, 15, 946 (1935).

phospholipoiden in de melk aan eiwit zijn gebonden. Deze meening gronden ze o.a. hierop, dat de phospholipoiden door aether slecht, door alcohol beter uit melk worden geëxtraheerd. Men kan dit echter ook uit het bipolaire karakter en den colloidalen toestand der phospholipoiden verklaren, deze toch zijn van invloed op de meerdere of mindere mate van extraheerbaarheid. Een zeer sterk dehydrateerende stof, zooals droge aether, zal de in de melk in gehydrateerden toestand aanwezige phospholipoiden niet gemakkelijk in oplossing brengen. Zoo bleek ons b.v. ook anderzijds, dat uit karnemelk bereide, zeer sterk gedroogde (naast  $P_2O_5$  in vacuo) phospholipoiden in het alcohol-aethermengsel, waaruit ze waren verkregen, niet of zeer moeilijk oplostten, doch zeer snel en volkomen helder in petroleumaether en chloroform.

### CONCLUSIONS AND SUMMARY.

A review of the literature concerning the quantitative determination of phospholipins in milk and milkproducts shows contradictory and confusing data; it was found that the phosphoric ester content of the milk is one of the chief reasons thereof, being the source of a possible error in the phospholipin figures.

It was not found possible to devise a direct method for the quantitative determination of phospholipins in milk; it is necessary to make an alcohol-ether extract of the milk as well as one of the skim milk and to estimate the quantity of organic P present in both extracts, the difference between the two values may be considered as lipin P.

The ester P, mentioned above, is the reason that most figures mentioned in the literature are too high; the lipin P varies from 0,7—0,8 mgr per 100 m.l. milk, if the effect of ester P is neglected figures 3 till 5 times as high may be expected. The phospholipins in milk are closely associated with the fatglobules; in buttermilk the situation appears to be different. The absence of an appreciable amount of lipin P in the fatfree skimmilk indicates that a normal adsorption of phospholipins on the surface of the fatglobules has not taken place. It is more probable that the fatglobules are secreted by the mammary gland provided with the ready membranes, containing phospholipin. The phospholipin content of milk is sufficient to form a monomolecular layer on the fatglobules.

A mono-amino phospholipin of fairly constant composition has been isolated from milk, from buttermilk and from the non-fat phase of the butter.

From powdered skim milk a water soluble organic phosphorus compound could be isolated; it could not be obtained in a pure state; it shows the proper-

ties of an organic ester, it could certainly not be classified as a phospholipin and has been the source of errors in phospholipin determinations.

The bipolar character of the phospholipins is the cause that they cannot be extracted from milk without extracting a considerable amount of hydrophylic phosphoric ester. Consequently it was found not to be possible to estimate the lipin P of milk directly, the lipin P of milk may fairly accurately be found as the difference of two quantities of organic P.