

## RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

DE BEPALING VAN VLUCHTIGE VETZUREN VOLGENS DE  
DESTILLATIEMETHODE,

DOOR

J. VAN BEYNUM.

(Ingezonden 2 Februari 1933).

Het aantoonen en kwantitatief bepalen der vluchtige vetzuren heeft reeds sedert de eerste jaren der bacteriologie de belangstelling gehad van de onderzoekers, die zich bezighielden met de omzettingen, die door bacterien in cultuurvloeistoffen bewerkstelligd worden, of deze omzettingen zich nu afspeelden in kunstmatig samengestelde voedingsbodems of natuurlijke, voor bacteriënaantasting vatbare stoffen. In laatstgenoemde categorie valt b.v. de productie van vluchtige zuren in melk, wijn en kuilvoeder, waarbij vooral het kuilvoeder de laatste jaren de aandacht trekt wegens het groote gevaar dat deze soort voederstof heeft voor de kaasbereiding. Men heeft hier met meer of minder succes getracht de tijdroovende en moeilijke bacteriologische analyse te vervangen door de snelle en gemakkelijk uitvoerbare chemische onderzoekingsmethode, die uit het voorkomen van boterzuur zou moeten besluiten of al dan niet de voor de kaasmakerij zoo nadeelige boterzuurbacteriën in groot aantal aanwezig zijn. Men treft welhaast geen publicatie aan over een onderzoek betreffende kuil- of persvoeder of er wordt melding gemaakt van de aanwezigheid van vluchtige vetzuren, waarbij speciale aandacht aan het boterzuur wordt geschonken.

De kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van één of meer vluchtige vetzuren heeft groote moeilijkheden, daar geen typische reacties bekend zijn waardoor op gewone wijze een scheiding of kwantitatieve afzondering der zuren verkregen kan worden. Voor het kwalitatief onderzoek is men gedwongen zijn toevlucht te nemen tot het gefractionneerd laten uitkristalliseeren van zouten dezer zuren en de verschillende verkregen fracties te analyseeren op metaalgehalte. Voor enkele zuren zijn typische reacties bekend, zoo b.v. voor mierenzuur, waar men gebruik kan maken van het reductievermogen en voor azijnzuur de kakodylreactie, terwijl DYER <sup>1)</sup> een systeem ontworpen heeft om door het gedrag der koperzouten in verschillende oplosmiddelen te kunnen nagaan welke zuren aanwezig zijn.

<sup>1)</sup> DYER, *J. o. biolog. Ch.*, 28 (1916), 445.

Al deze methodes zijn echter niet in staat een inzicht te geven in de hoeveelheden der aanwezige zuren, met uitzondering dan van de mierenzuurbepaling.

Daar de gewone chemische bepalingswijzen niet in aanmerking kwamen voor de vluchtige zuren, heeft men algemeen de door DUCLAUX in 1895 gepubliceerde methode <sup>1)</sup> aanvaard, welke op fysieke-chemische principes berust en die voornamelijk door de beoefenaren der zuivelbacteriologie gebezigt en gepropageerd is. Vooral nu de laatste jaren de wetenschappelijke bacteriologie zich sterk ontwikkeld heeft in de richting van de ontleding der bacterieele processen in hun opvolgende stadia, is de bepaling van alle stoffen in een bacteriëncultuur van het grootste belang geworden, waardoor ook in de algemeene bacteriologie de bepaling der vluchtige vetzuren de aandacht heeft getrokken.

De door DUCLAUX uitgewerkte methode berust op de eigenschap dat ieder vluchtig zuur zijn eigen typische destillatiekromme heeft. Als men van ieder der vluchtige zuren eenzelfde hoeveelheid oplost in eenzelfde hoeveelheid water en men destilleert deze oplossingen af terwijl men gelijke porties destillaat titreert, dan vormen de aldus verkregen titreercijfers een voor ieder zuur karakteristieke reeks. Bovendien bleken bij niet te hooge concentraties (DUCLAUX beveelt aan niet boven een zuurconcentratie van 2% te gaan) de verkregen titreer- of destillatiegetallen evenredig te zijn met de zuurconcentratie in de oorspronkelijk af te destilleeren vloeistof, zoodat blijkbaar in dit gebied de electrolytische dissociatie verwaarloosd kan worden.

Men kan 2 manieren van opgave der zuurkarakteristieken toepassen: bij de eerste manier drukt men de verkregen destillatiecijfers uit in procenten van het oorspronkelijk in de destilleerkolf aanwezige zuur, bij de tweede manier drukt men deze cijfers uit in procenten van de na de beëindiging van de destillatie in totaal overgegane hoeveelheid zuur. Deze laatste methode heeft de voorkeur in die gevallen, waarin men onbekend is met de in de destillatiekolf gebrachte hoeveelheid zuur. Bij beide methodes worden getallenreeksen verkregen die voor ieder zuur karakteristiek zijn.

Voor de practische uitvoering destilleert DUCLAUX een hoeveelheid van 110 cm<sup>3</sup> der zuuroplossing continu af en vangt het destillaat in porties van 10 cm<sup>3</sup> op die getitreerd worden. De verkregen titreercijfers worden zoodanig in een tabel vereenigd, dat de titreercijfers bij elkander opgeteld worden, zoodat dus b.v. het destillatiecijfer achter de 3de portie voorstelt de hoeveelheid zuur die overgegaan is in de 1ste, 2de en 3de portie samen.

Men krijgt dan de volgende tabel, waarbij ik mij beperk tot Azijnzuur, Propionzuur en Boterzuur en de cijfers vermeld, welke door BOEKHOUT en

<sup>1)</sup> E. DUCLAUX, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895, 265. *Traité de Microbiologie* III, 385 (1900).

OTT DE VRIES werden gevonden bij hun onderzoek over de toepassing van de methode DUCLAUX <sup>1)</sup>.

TABEL I.

cc destillaat.	Azijnzuur.		Propionzuur.		Boterzuur.	
	Percent van totaal zuur in de kolf.	Percent van totaal zuur in destillaat.	Percent van totaal zuur in de kolf.	Percent van totaal zuur in destillaat.	Percent van totaal zuur in de kolf.	Percent van totaal zuur in destillaat.
10	5,9	7,4	11,8	12,4	19,1	19,4
20	12,2	15,3	23,2	24,4	35,4	36,0
30	18,7	23,4	34,2	35,9	50,0	50,8
40	25,6	32,0	44,7	47,0	62,3	63,3
50	32,7	40,9	54,9	57,7	72,9	74,1
60	40,4	50,5	64,4	67,6	81,5	82,8
70	48,7	60,9	73,4	77,1	88,3	89,7
80	57,5	71,9	81,5	85,6	93,3	94,8
90	67,5	84,4	89,0	93,5	96,6	98,2
100	80,0	100,0	95,2	100,0	98,4	100,0

Indien dus b.v. een propionzuuroplossing gedestilleerd wordt, gaat in de eerste 30 cm<sup>3</sup> destillaat 34,2% van het oorspronkelijk in 110 cm<sup>3</sup> der destillatiekolf aanwezige zuur over of 35,9% van het totaal in 100 cm<sup>3</sup> overgedestilleerde aandeel, onafhankelijk van de absolute waarde der concentratie, mits deze beneden 2% blijft.

Bij het bepalen van de soort en de hoeveelheid van een onbekend vluchtig zuur worden volgens de oorspronkelijk door DUCLAUX aangegeven methode uit 110 cm<sup>3</sup> 100 cm<sup>3</sup> afgedestilleerd en deze in porties van 10 cm<sup>3</sup> getitreerd. De verkregen destillatiecijfers worden omgerekend als percentages van de totaal overgedestilleerde hoeveelheid en de aldus bepaalde getallenreeks vergeleken met de in tabel I in de 3de, 5de en 7de kolom vermelde reeksen.

Over de bruikbaarheid der Duclaux-methode is zeer veel literatuur verschenen, o.a. van ORLA JENSEN <sup>2)</sup>, FREUDENREICH <sup>3)</sup>, JAN SMIT <sup>4)</sup>, UPSON <sup>5)</sup>,

<sup>1)</sup> F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES, *Versl. van landb.k. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, XX, 79 (1917). *Versl. v. d. Vereen. tot Expl. eener Proefzuivelboerderij*, 1915, 86. *Centr. Bl. f. Bakteriologie* II, 46, 505 (1916).

<sup>2)</sup> ORLA JENSEN, *Landw. Jahrb. d. Schweiz*, 1904.

<sup>3)</sup> FREUDENREICH en ORLA JENSEN, *idem*, 1906.

<sup>4)</sup> JAN SMIT, *Diss. Amsterdam*, 1913.

<sup>5)</sup> UPSON, PLUM en SCHOTT, *J. Am. Ch. Soc.*, 39 (1917), 731.

LAMB <sup>1)</sup>, GILLESPIE & WALTERS <sup>2)</sup>. Deze laatste passen b.v. de algebraïsche berekeningsmethode toe en geven bovendien een grafisch berekensysteem aan. Ook wijzen zij bij hun berekeningen op het gebruik van de methode der kwadraten van GAUSS.

De hoeveelheid zuur kan berekend worden met behulp van de cijfers uit de 2de, 4de en 6de kolom, zoodat deze uit alle 10 destillatiecijfers berekend kan worden. Indien we b.v. werken met azijnzuur, waarvan de hoeveelheid bedraagt A cm<sup>3</sup> n/10 per 110 cm<sup>3</sup> en de destillatiecijfers zijn: t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub> . . . . . t<sub>10</sub>, dan is A te berekenen als:

$$A = 100 \frac{t_1}{5,9} = 100 \frac{t_2}{12,2} = 100 \frac{t_3}{18,7} \dots \dots \dots = 100 \frac{t_{10}}{80,0},$$

welke uitkomsten we kunnen vergelijken met de oorspronkelijke hoeveelheid zuur in de kolf. Als deze onbekend is, zooals in het geval dat uitgegaan wordt van de zouten der vluchtige zuren en gedestilleerd wordt met toevoeging van een niet-vluchtig zuur, waarvoor wijnsteenzuur werd aanbevolen, dan is dit de eenige manier om de concentratie van het zuur te berekenen.

De behandeling van het vraagstuk wordt moeilijker, wanneer twee of meer zuren in de te onderzoeken stof aanwezig zijn. Daar ieder der zuren onafhankelijk van de andere aanwezige zuren overdestilleert, kan men in die gevallen, waarin bekend is uit welke zuren het te onderzoeken mengsel bestaat, de hoeveelheden zuur door een soortgelijke berekening vinden.

Bij A cm<sup>3</sup> n/10 azijnzuur en B cm<sup>3</sup> n/10 boterzuur per 110 cm<sup>3</sup> is n.l.:

$$\begin{aligned} t_1 &= 0,059 A + 0,191 B \\ t_2 &= 0,122 A + 0,354 B \\ &\dots \dots \dots \\ t_{10} &= 0,800 A + 0,984 B. \end{aligned}$$

Uit deze vergelijkingen kan men de waarden van A en B op zeer veel wijzen berekenen, daar 10 vergelijkingen met 2 onbekenden beschikbaar zijn. Heeft men dit veel te doen, dan kan men hiervoor door uitwerking der vergelijkingen tabellen ontwerpen, die er als volgt uit zien:

<sup>1)</sup> LAMB, *J. Am. Ch. Soc.*, 39 (1917) 746.

<sup>2)</sup> GILLESPIE en WALTERS, *idem*, 2027.

TABEL II.

Ter bepaling van de hoeveelheden Azijnzuur en Boterzuur uit de destillatiegetallen DUCLAUX.

	B.	A.
Berekend uit:		
1e en 2e portie. . . . .	48,0 $t_1$ —24,4 $t_2$	110,0 $t_2$ —204,0 $t_1$
1e „ 3e „ . . . . .	30,1 $t_1$ — 9,5 $t_3$	30,7 $t_3$ — 80,4 $t_1$
1e „ 4e „ . . . . .	21,1 $t_1$ — 4,8 $t_4$	15,7 $t_4$ — 51,3 $t_1$
1e „ 5e „ . . . . .	16,8 $t_1$ — 3,0 $t_5$	9,8 $t_5$ — 37,5 $t_1$
enz.	enz.	enz.
1e en 10e „ . . . . .	8,5 $t_1$ — 0,6 $t_{10}$	2,0 $t_{10}$ — 10,4 $t_1$
Berekend uit:		
2e en 3e portie. . . . .	35,8 $t_2$ —23,5 $t_3$	68,0 $t_3$ — 96,1 $t_2$
2e „ 4e „ . . . . .	17,5 $t_2$ — 8,3 $t_4$	24,2 $t_4$ — 42,6 $t_2$
2e „ 5e „ . . . . .	12,2 $t_2$ — 4,5 $t_5$	13,2 $t_5$ — 27,1 $t_2$
enz.	enz.	enz.
2e en 10e „ . . . . .	4,9 $t_2$ — 0,75 $t_{10}$	2,1 $t_{10}$ — 5,9 $t_2$
	enz.	

Het voordeel van deze wijze van berekenen bestaat hierin, dat geen enkel cijfer uit de reeks destillatiecijfers boven andere bevoorreed wordt, hetgeen bij andere berekenmethodes wel het geval is. Vooral aan het 10de getal wordt vaak een doorslaggevend gewicht toegekend.

Men vindt aldus 45 oplossingen voor de samenstelling der vloeistof. Practisch blijve de tabel beperkt tot ongeveer 10 à 20 oplossingen daar de berekeningen uit twee te dicht bij elkaar liggende destillatiefracties te onnauwkeurig zijn, hetgeen duidelijk naar voren komt uit de groote vermenigvuldigfactoren in de tabel. Met opzet is overigens vermeden een volledige tabel te geven, daar gemeenlijk verschillende onderzoekers verschillende waarden voor de overgedestilleerde standaardpercentages der enkele zuren vinden. Voor zoover deze verschillende waarden niet te wijten zijn aan het gebruik van onzuivere zuren, worden zij veroorzaakt door de in onderdeelen van elkaar afwijkende apparatuur. De bruikbaarheid der methode wordt hierdoor echter niet in gevaar gebracht.

Voor het geval niet bekend is met welke zuren men te maken heeft, kan men aan de hand van de van te voren uitgerekende tabellen, type tabel II, met behulp van enkele berekeningen uitmaken in welke tabel de gevonden destillatiecijfers thuis behooren. Heeft men b.v. een mengsel van azijnzuur

en propionzuur en men berekent de hoeveelheden der aanwezige zuren volgens de tabellen, dan vindt men geen kloppende waarden, indien hiervoor de tabel Azijnzuur-Buterzuur wordt gebruikt, maar wel bij gebruik van de tabel Azijnzuur-Propionzuur. Daar slechts enkele berekeningen aantonen of al of niet kloppende waarden worden verkregen is dit procédé zeer eenvoudig.

Een andere methode is gebruikt door VAN NIEL<sup>1)</sup> voor Azijnzuur-Propionzuuranalyses. Algemeen bezien berekent deze uit de gevonden destillatiepercentages van zuivere zuren de destillatiecijfers voor een groote reeks mengsels der zuren en geeft deze tabellen in een zoodanigen vorm, dat in iedere reeks de cijfers omgerekend zijn als percentages van het totaal in 100 cm<sup>3</sup> destillaat overgedestilleerde zuur. Voor een mengsel van onbekende zuren worden dus de destillatiecijfers volgens DUCLAUX bepaald en deze omgerekend als percentages van het totaal overgedestilleerde zuur, waarna vergeleken wordt met welke reeks uit de vele verschillende tabellen deze cijfers het beste overeenstemmen. Daarbij wordt dus tegelijkertijd gevonden welke de zuren zijn en in welke verhouding zij aanwezig zijn. De absolute hoeveelheden worden door VAN NIEL uit deze verhouding en uit de totale hoeveelheid zuur bepaald. De zuren worden n.l. uit het gistingsmilieu afgedestilleerd en geneutraliseerd met gestelde baryt.

Bij een onderzoek naar de bruikbaarheid van de methode DUCLAUX vonden BOEKHOUT en OTT DE VRIES<sup>2)</sup>, dat aan de distillatiereeksen van DUCLAUX een wetmatigheid ten grondslag ligt. Bij een analyse der reeksen, die men bij de methode DUCLAUX met oplossingen der zuivere zuren krijgt, bleek hun, dat in een reeks van destillatiecijfers een onderling verband tusschen deze cijfers bestaat, dat zoodanig uitgedrukt kan worden, dat tijdens de geheele destillatie iedere fractie van het overgedestilleerde zuur in een bepaalde verhouding staat tot de op dat moment in de kolf heerschende zuurconcentratie. Hun conclusie luidt: „dat de methode DUCLAUX niet anders geeft dan een herhaalde bepaling van hetzelfde destillatiecijfer bij verschillende concentraties”. Daar tijdens de DUCLAUX-destillatie iedere fractie 10 cm<sup>3</sup> bedraagt en het volume in de kolf continu afneemt, waardoor dus niet steeds eenzelfde volumepercentage destillaat, berekend op het op dat moment in de kolf zich bevindende volume, getitreerd wordt, zijn de fracties niet direct vergelijkbaar en is van een verband tusschen de fracties onderling in de Duclaux-reeks op het eerste gezicht niets te bespeuren.

Hiervan gebruik makend voerden zij een verandering in, waarbij na afdestilleeren van iedere fractie het volume in de kolf via een vultrechttertje met

<sup>1)</sup> VAN NIEL, Dissertatie, Delft, 1928. Zie ook: J. B. VAN DER LEK, Dissertatie, Delft, 1930.

<sup>2)</sup> I. c.

kraan met 10 cm<sup>3</sup> gedestilleerd water weer op 110 cm<sup>3</sup> wordt gebracht. Aldus wordt de methode overzichtelijker en logischer doordat nu een eenvoudig verband tusschen de fractie onderling en het in de destillatiekolf aanwezige zuur ontstaat. Voor azijnzuur b.v. destilleert in iedere fractie 5,9% van het bij het begin van het overdestilleeren van deze fractie in de kolf aanwezige zuur over, waardoor de titers der achtereenvolgend overgaande fracties een meetkundige reeks vormen, waarvan de reden (1—0,059) is. Titreert men door, d.w.z. drukt men de destillatiecijfers, juist als bij de oorspronkelijke methode DUCLAUX zóó uit, dat de destillatiecijfers in de reeks aangeven wat na iedere fractie in totaal is overgedestilleerd, dan is ieder cijfer dus de som van deze meetkundige reeks en uit te drukken als  $A [1 - (1 - 0,01\gamma)^n]$ , waarin A de oorspronkelijk hoeveelheid zuur in de kolf,  $\gamma$  het zoogenaamde destillatiegetal (voor azijnzuur dus 5,9) en  $n$  het aantal overgegane fracties van 10 cm<sup>3</sup> is.

Bij aanwezigheid van slechts één zuur kan door het uitrekenen van de reden der meetkundige reeks beslist worden met welk zuur we te maken hebben, bij meer zuren zijn we gedwongen wederom onze toevlucht te nemen tot berekening op dezelfde wijze als hierboven voor de methode DUCLAUX werd aangegeven, d.w.z. volgens de formules (voor azijnzuur en boterzuur b.v.):

$$\text{Na de } p^e \text{ fractie overgegaan } t_p = A [1 - (1 - 0,01\gamma_A)^p] + B [1 - (1 - 0,01\gamma_B)^p].$$

$$\text{Na de } q^e \text{ fractie overgegaan } t_q = A [1 - (1 - 0,01\gamma_A)^q] + B [1 - (1 - 0,01\gamma_B)^q].$$

Ook deze berekening kan op dezelfde wijze in meer bruikbaren vorm overgebracht worden door tabellen samen te stellen.

TABEL III.

*Voor berekening van de hoeveelheden azijnzuur en boterzuur bij de methode BOEKHOUT en OTT DE VRIES.*

	A.	B.
Berekend uit:		
1e en 2e portie . . . . .	140,3 $t_2 - 254 t_1$	83,8 $t_1 - 43,4 t_2$
1e „ 3e „ . . . . .	46,5 $t_3 - 114 t_1$	40,3 $t_1 - 14,4 t_3$
1e „ 4e „ . . . . .	25,4 $t_4 - 76,2 t_1$	28,8 $t_1 - 7,8 t_4$
1e „ 5e „ . . . . .	16,6 $t_5 - 56,7 t_1$	22,8 $t_1 - 5,1 t_5$
enz.	enz.	enz.
1e „ 9e „ . . . . .	6,3 $t_9 - 28,2 t_1$	14,0 $t_1 - 2,0 t_9$
enz.	enz.	enz.

	A.	B.
Berekend uit:		
2e en 3e portie . . . . .	84,6 $t_3$ —115 $t_2$	40,8 $t_2$ —27,9 $t_2$
2e „ 4e „ . . . . .	36,3 $t_4$ — 60,1 $t_2$	22,6 $t_2$ —12,0 $t_4$
2e „ 5e „ . . . . .	21,3 $t_5$ — 40,3 $t_2$	16,1 $t_2$ — 7,0 $t_5$
enz.	enz.	enz.
2e en 9e „ . . . . .	7,1 $t_9$ — 17,8 $t_2$	8,7 $t_2$ — 2,3 $t_9$
enz.	enz.	enz.
	enz.	

In nog veel sterker mate dan bij de oorspronkelijke methode DUCLAUX geldt hier, dat men voor de calculatie slechts niet te dicht bij elkaar liggende fracties mag gebruiken, waardoor voor het practische gebruik de tabel sterk beperkt kan blijven en daardoor zeer handig in de toepassing is. Bij onbekendheid met den aard der aanwezige zuren zijn enkele berekeningen uit verschillende fracties voldoende om te beslissen of het te onderzoeken mengsel klopt op een bepaalde tabel of niet.

Bij het bestudeeren der grondslagen, waarop de destillatiemethode DUCLAUX berust, kwam WIEGNER<sup>1)</sup> tot de conclusie, dat op ieder moment tijdens de destillatie, m.a.w. bij iedere concentratie van het zuur (mits deze niet te groot zij) de verhouding van de zuurconcentraties in den damp en de vloeistof dezelfde is. Voor de grootten dezer destillatieconstanten vond hij:

Azijnzuur 0,66;  
 Propionzuur 1,21;  
 n. Boterzuur 1,91;

terwijl zich uit de cijfers van BOEKHOUT en OTT DE VRIES laat berekenen:

Azijnzuur 0,65;  
 Propionzuur 1,31;  
 Boterzuur 2,14.

Op de bepaling van deze waarden is ook weder de gebruikte apparatuur van invloed.

Ten slotte kan men deze wijze van behandeling beschouwen als een theoretische uitbreiding van de door BOEKHOUT en OTT DE VRIES geformuleerde wetmatigheid. Het voordeel ervan is gelegen in de mogelijkheid, dat men niet meer gebonden is aan het initialvolume van 110 cm<sup>3</sup>, doch ieder volume

<sup>1)</sup> WIEGNER, Die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene (Schweiz. Gesundheitsamt, 1919, X).



als uitgangspunt voor de destillatie kan nemen. Door integratie van de aan de destillatie ten grondslag liggende differentiaalvergelijking  $\frac{dz}{dv} = K \frac{z}{v}$  waarin  $z$  de hoeveelheid zuur is, op een willekeurig moment tijdens de destillatie aanwezig in een vloeistofvolume  $v$  in de destillatiekolf, vindt men

$$\log \frac{z}{Z} = K \log \frac{v}{V} + \text{constante},$$

waaruit men kan berekenen hoeveel zuur er na overdestilleeren van iedere volumefractie, die men kan kiezen zoo men wil, in de kolf moet zijn achtergebleven, resp. hoeveel moet zijn overgedestilleerd. Deze logatithmische analyse brengt ons niet verder bij de destillatie van een onbekende hoeveelheid van een onbekend zuurmengsel in de kolf, doch stelt ons in de mogelijkheid tabellen van te voren te berekenen voor destillatiereeksen met andere fractiehoeveelheden en uitgangsvolumina als bij de methode DUCLAUX. We komen dan weer tot dezelfde wijze van oplossing van het probleem als hierboven, d.w.z. door het oplossen van algebraïsche vergelijkingen, die te vereenvoudigen zijn door tabellen. De uitvoering kan geschieden op twee wijzen, n.l. volgens het principe van DUCLAUX (de continu destillatie) en volgens dat van BOEKHOUT en OTT DE VRIES (discontinu en aanvulling na afdestilleeren van iedere fractie tot het oorspronkelijk volume).

Er moge hier vermeld worden dat KNETEMANN <sup>1)</sup> in 1928 eenzelfde theoretische beschouwing publiceerde en op deze wijze tabellen volgens het type der Duclaux-reeksen berekende voor een aanvangsdestillatiehoeveelheid van 400 cm<sup>3</sup> en fracties van 50 cm<sup>3</sup>.

Hoe men de bepaling der vluchtige zuren volgens de destillatiemethode ook doet, we hebben hier een voorbeeld van een algebraïsche analyse, waaraan de voor een algebraïsche analysemethode bekende fouten kleven. Zeer duidelijk komt dit tot uiting als wij de zuurconcentraties berekenen uit slechts enkele en dan dicht bij elkaar liggende fracties. Destilleert men volgens de gemodificeerde methode (van BOEKHOUT en OTT DE VRIES), dan wordt het azijnzuurgehalte uit de eerste twee fracties berekend als 140  $t_2$ —254  $t_1$  (zie tabel III), hetgeen bij een nauwkeurigheid in de bepaling van  $t_2$  en  $t_3$  van 0,05 cm<sup>3</sup> n/10 een fout kan geven van 20 cm<sup>3</sup> n/10 in de uitkomst.

Bij het gebruik van een der destillatiemethodes dient men zich daarom van te voren rekenschap te geven van de omstandigheden en eerst na overweging der verschillende factoren te bepalen hoe men de destillatie zal uitvoe-

<sup>1)</sup> A. KNETEMANN, *Rec. des Tr. ch. des Pays-Bas*, 1928, 47, 950.

ren. Hieraan is in de tot nu toe verschenen verhandelingen niet of weinig aandacht geschonken.

De methode zal nauwkeuriger uitkomsten geven, naarmate bij de bepaling meer van het beschikbare analysemateriaal wordt gebruikt, waardoor vollediger aansluiting verkregen wordt bij de gewone gravimetrische of tritrimetrische analyse, die de geheele beschikbare hoeveelheid te analyseeren stof verwerkt. Voor zoover dit mogelijk is, voldoet hieraan de oorspronkelijke methode DUCLAUX wel, waar van de gegeven 110 cm<sup>3</sup> de grootst mogelijke hoeveelheid, n.l. 100 cm<sup>3</sup>, afgedestilleerd wordt. Hierbij worden dus voor azijnzuur, propionzuur en boterzuur resp. 80%, 95,2% en 98,4% in de destillatiefracties getitreerd. Hier is de methode BOEKHOUT-OTT DE VRIES in het nadeel, daar hier bij destilleeren van 10 fracties, dus ook 100 cm<sup>3</sup>, slechts resp. 45,6%, 71,5% en 88,0% zuur in de bepaling wordt betrokken. De onnauwkeurigheid der bepaling neemt toe naarmate het betreffende zuur lager in de homologe reeks voorkomt.

Toch mag dit geen reden zijn de modificatie der Duclaux-methode volgens BOEKHOUT en OTT DE VRIES te verlaten. Deze modificatie heeft onmiskenbare voordeelen, waarvan de voornaamste wel is, dat alle fracties onder volkomen gelijke omstandigheden afgedestilleerd worden, waardoor verschillende invloeden, die bij de oorspronkelijke Duclaux-bepaling werkzaam zijn, geëlimineerd worden. Te noemen valt b.v. het vermijden van iedere concentratietoename tijdens de destillatie, welke vooral optreedt bij de destillatie van de zouten der vluchtige zuren met toevoeging van een niet-vluchtig zuur en het constant blijven van de verhittingsomstandigheden, die sterk veranderen indien men van een groot volume van 110 cm<sup>3</sup> tot een zoo klein volume als 10 cm<sup>3</sup> in dezelfde kolf destilleert. Bovendien is een directe bepaling van de vluchtige zuren in het eigenlijke te analyseeren milieu in plaats van een ingedampt stoomdestillaat bij de methode DUCLAUX onmogelijk, juist door de sterke concentratietoename van de niet-vluchtige stoffen als eiwitten, suikers en zouten, die aanleiding geeft tot aanbranden, ontledingen en moeilijk koken. De methode BOEKHOUT-OTT DE VRIES laat deze directe bepaling, althans gezien uit een oogpunt van deze omstandigheden, wel toe, hetgeen in het vervolg ook praktisch blijkt.

Om dan ook de voordeelen der gemodificeerde methode niet prijs te geven en de nadeelen te omgaan kan men aan deze methode een algemeene uitbreiding geven door zich niet meer aan de traditioneel geworden fracties à 10 cm<sup>3</sup> te houden, doch fractievolumina te kiezen naar behoefte.

Kiest men deze anders dan destilleert over:

TABEL IV.

Zuur:	Azijnzuur.					Propionzuur.					Boterzuur.					
	10 cm <sup>3</sup> .	20 cm <sup>3</sup> .	30 cm <sup>3</sup> .	40 cm <sup>3</sup> .	50 cm <sup>3</sup> .	10 cm <sup>3</sup> .	20 cm <sup>3</sup> .	30 cm <sup>3</sup> .	40 cm <sup>3</sup> .	50 cm <sup>3</sup> .	10 cm <sup>3</sup> .	20 cm <sup>3</sup> .	30 cm <sup>3</sup> .	40 cm <sup>3</sup> .	50 cm <sup>3</sup> .	
Percentage overgedestilleerd zuur na afdestilleeren van aantal fracties:	2	11,4	22,9	33,9	44,6	54,7	22,2	41,0	56,7	69,4	79,7	34,6	58,3	75,0	85,8	92,7
	3	16,7	32,2	46,3	58,8	69,5	31,4	54,7	71,5	83,1	90,8	47,1	73,0	87,5	94,6	—
	4	21,6	40,6	56,3	69,4	79,5	39,5	65,2	81,3	90,6	—	57,2	82,6	93,8	—	—
	5	26,2	47,8	64,5	77,2	86,1	46,6	73,3	87,7	—	—	65,3	88,8	—	—	—
	6	30,6	54,2	71,1	83,0	90,7	52,9	79,5	91,9	—	—	72,0	92,7	—	—	—
	8	38,5	64,7	80,9	90,6	—	63,4	87,9	—	—	—	81,7	—	—	—	—
	10	45,6	72,8	87,4	—	—	71,5	92,9	—	—	—	88,0	—	—	—	—

alles berekend uit de algemeene formule  $t = Z [1 - (1 - 0,01 \gamma)^n]$ .

Indien men steeds voortdestilleert is met iedere fractiegrootte te voldoen aan den eisch. dat zooveel mogelijk van de vluchtige zuren afgedestilleerd wordt. Voor de nauwkeurigheid der berekening is het evenwel van voordeel, dat de verschillen der opvolgende fracties zoo groot mogelijk zijn, dus kieze men het volume der fracties zoo groot mogelijk als toelaatbaar is. Men kan echter van dit standpunt beschouwd de fracties ook te groot nemen. Vooral bij de meer vluchtige zuren moet men zich hiervoor hoeden, daar men dan vervalt in te kleine titerverschillen in de latere fracties.

Uit tabel IV kan men afleiden, hoe men in een gegeven geval de destillatiebepaling op de beste wijze kan uitvoeren.

In het geval dat b.v. alleen azijnzuur aanwezig is, zal het aangewezen zijn om door afdestilleeren van een aantal fracties van 50 cm<sup>3</sup> of 40 cm<sup>3</sup> de grootste nauwkeurigheid te bereiken. Bij de enkele aanwezigheid van boterzuur daarentegen zijn fracties van 10 of 20 cm<sup>3</sup> aan te bevelen.

De keuze wordt dus bepaald door de volgende overwegingen:

1°. In de analyse worde zooveel mogelijk van het vluchtige zuur betrokken.

2°. De fracties moeten zoo groot gekozen worden, dat een practisch bruikbare reeks destillatiecijfers gevonden wordt, hetgeen noodig is om te kunnen

constateeren of één of meer vluchtige zuren aanwezig zijn en in dit laatste geval om met behulp der destillatievergelijkingen de hoeveelheden der zuren te kunnen berekenen.

3°. Het aantal te destilleeren fracties moet liefst zoo gering mogelijk zijn om onnoodig werk te vermijden. Als men een boterzuuroplossing destilleert in fracties à 20 cm<sup>3</sup>, heeft het geen zin om meer dan 4 à 5 fracties op te vangen.

Voor de berekening van de hoeveelheden der in het mengsel voorkomende zuren, eventueel ook voor het nagaan, welke zuren aanwezig zijn, kan het bovenbeschreven procédé van reeds te voren klaargemaakte tabellen dienen. Door juist zooveel mogelijk van het vluchtige zuur in zoo groot mogelijke fracties af te destilleeren, worden de destillatievergelijkingen gunstiger voor de berekeningen, zoodat in de tabellen niet meer zulke groote coëfficiënten figureeren.

De nauwkeurigheid der methode wordt op deze wijze grooter, daar kleine fouten in het volume der opgevangen fractie en dat der toegevoegde hoeveelheid water niet zoo'n grooten invloed hebben. Bovendien, als wij de destillatie met kleine fracties en die met grootere fracties met elkaar vergelijken, blijkt dat eenzelfde hoeveelheid zuur bij grootere fracties in een in totaal kleiner hoeveelheid destillaat overgaat. Destilleert men b.v. azijnzuur volgens de 10 cm<sup>3</sup> methode, dan is na 15 fracties van 10 cm<sup>3</sup> overgaan 59,8%, terwijl in 3 fracties van 40 cm<sup>3</sup> 58,8% overgaat, d.w.z. dat om hetzelfde te bereiken, 30 cm<sup>3</sup> minder behoeft overgedestilleerd te worden.

Verder wordt als voordeel gewonnen, dat de bepaling, vooral voor de lagere zuren uit de vetzuurreeks, minder toezicht behoeft, daar niet bij iedere 10 cm<sup>3</sup> gewisseld en aangevuld behoeft te worden, zoodat men ander werk er naast kan verrichten.

Zooals reeds opgemerkt is, kan men met behulp van de logarithmische functies (WIEGNER) de voordeeligste methode op dezelfde wijze bepalen voor andere uitgangsvolumina als 110 cm<sup>3</sup>.

Om te bewijzen dat de aanvullingsmethode zeer nauwkeurige uitkomsten geeft, volgt hier de destillatie van 110 cm<sup>3</sup> azijnzuuroplossing, die 10 cm<sup>3</sup> 0,98 normaal azijnzuur bevatte, volgens de methode 110/60, d.w.z. dat na afdestilleeren van iedere 50 cm<sup>3</sup>, het volume in de destillatiekolf weer op 110 cm<sup>3</sup> werd gebracht. De aandacht moge er op gevestigd worden, dat hiervoor kokend gedestilleerd water moet worden gebruikt om de destillatie zoo min mogelijk te onderbreken.

De destillatiecijfers waren in cm<sup>3</sup>  $n/10$ :

32,1	53,4	68,0	77,8	84,5	89,0.
------	------	------	------	------	-------

Hieruit berekent men:

Overgegaan is n.l.  
volgens tabel IV:

uit 1e fractie . . . . .	100	cm <sup>3</sup> n/10	32,7%
„ 2e „ . . . . .	97,6	„	54,7%
„ 3e „ . . . . .	97,8	„	69,5%
„ 4e „ . . . . .	97,9	„	79,5%
„ 5e „ . . . . .	98,0	„	86,2%
„ 6e „ . . . . .	98,1	„	90,7%

Het is dikwijls nuttig om het eerste destillatiegetal uit de berekeningen te elimineeren. Hieraan kleven meestal fouten, gedeeltelijk doordien deze eerste destillatie niet normaal verloopt (begin van het koken, schuimen, b.v.), gedeeltelijk door een soms hoog koolzuurgehalte van de te destilleeren vloeistof. Daar een fout in de eerste destillatiefractie zich ook doet gelden in de volgende fracties, kan men de eliminatie van deze fout uitvoeren door aftrekking:

$$\begin{array}{l} \text{1e fractie } t_1 = 0,327 A + \text{fout} \\ \quad \quad \quad t_2 = 0,547 A + \text{fout} \\ \hline t_2 - t_1 = 0,220 A. \end{array}$$

Ook deze nieuwe factoren (waarvan 0,220 er eene is) kan men in een tabel ter beschikking houden.

In bovenstaand voorbeeld vinden wij volgens deze correctiewijze:

Uit

1e en 2e fractie . . . . .	97,0	3e en 4e fractie . . . . .	98,0
1e „ 3e „ . . . . .	97,5	3e „ 5e „ . . . . .	98,8
1e „ 4e „ . . . . .	97,6	3e „ 6e „ . . . . .	99,0
1e „ 5e „ . . . . .	98,0	4e „ 5e „ . . . . .	100
1e „ 6e „ . . . . .	98,0	4e „ 6e „ . . . . .	100
2e „ 3e „ . . . . .	98,6	5e „ 6e „ . . . . .	100
2e „ 4e „ . . . . .	98,3		
2e „ 5e „ . . . . .	98,7		
2e „ 6e „ . . . . .	98,8		

Ook hier geldt weer, dat men voor de meest nauwkeurige berekening slechts de niet te dicht bij elkaar liggende fracties moet gebruiken. In bovenstaand voorbeeld, waar weinig storende invloeden aanwezig geweest zijn, is de nauwkeurigheid zóó groot, dat men zelfs met tamelijke nauwkeurigheid kan be-

rekenen uit de ongunstigste fracties (5e en 6e). De fout is daar nog slechts  $2 \text{ cm}^3 \text{ n}/10$ , d. i. 1,2 mg azijnzuur.

Wat de uitvoering der destillatie betreft, indien men een oplossing van vetzure zouten wensch te analyseeren, dan gebruike men, om de vetzuren in de destillatiekolf in vrijheid te stellen, hiervoor geen wijnsteenzuur, phosphorzuur of eenig ander niet-vluchtig zwak zuur, zooals in de oudere literatuur wordt voorgeschreven, doch zwavelzuur in overmaat, daar men slechts dan zeker is, dat practisch alle vetzuur in ongedissocieerden toestand aanwezig is.

Bij destilleeren van een hoeveelheid Na-acetaat, aequivalent met  $4 \text{ cm}^3$  0,98 n. azijnzuur, volgens de methode 110/60, waarbij het azijnzuur in vrijheid gesteld werd met  $46,4 \text{ cm}^3 \text{ n}/10$  wijnsteenzuur, werd een reeks verkregen:

10,75      18,85      23,9      27,9      30,8      32,9

waaruit blijkt dat het destillatiegetal  $\gamma$  (zie BOEKHOUT en OTT DE VRIES, l. c.), hetwelk 32,7 bedraagt, hier berekend wordt als 30,3 uit 2e en 5e fractie en 29,2 uit 2e en 6e.

Bij een hoeveelheid wijnsteenzuur van  $80 \text{ cm}^3 \text{ n}/10$  was de reeks:

   12,3      20,8      26,7      30,7      33,5  
 en bij  $120 \text{ cm}^3 \text{ n}/10$     12,75      21,55      27,35      31,2      33,8,

hetgeen bij deze tweevoudige overmaat pas goed benadert.

Bij gebruik van zwavelzuur werd met  $47 \text{ cm}^3 \text{ n}/10$  de reeks:

   12,85      21,55      27,4      31,3      34,0

verkregen, die zeer nauw aansluit bij de berekende reeks:

   12,8      21,5      27,3      31,2      33,8.

Om een inzicht te krijgen in de vergroote nauwkeurigheid volgt hier nog de analyse van het vluchtige zuur in een cultuur van zg. Boekelscheurbacteriën. Deze bacteriën, die de oorzaak kunnen zijn van het voorkomen van ronde gaatjes en/of boekelscheurtjes in Edammer- en Goudsche kaas en welke overeenkomst vertoonen met de door FREUDENREICH en ORLA JENSEN uit Emmentalerkaas geïsoleerde propionzuurbacteriën zijn in 1915 door BOEKHOUT en OTT DE VRIES beschreven<sup>1)</sup>. Bij de analyse der vluchtige zuren in de cultuur werd azijnzuur gevonden, waarbij gebruik gemaakt werd van de oorspronkelijke methode DUCLAUX.

<sup>1)</sup> BOEKHOUT en OTT DE VRIES, *Jaarverslag der Vereen. tot expl. eener proefzuivelboerderij te Hoorn*, 1915, blz. 73.

*Verslagen van landb.k. onderz. d. Rijkslandbouwproefstations*, 21 (1917), 14.

Dat bij de vergisting van Calciumlactaat evenwel bovendien propionzuur ontstaat blijkt uit onderstaande analyse.

41. van een 5 weken oude cultuur van deze bacteriën in Pepton-Calciumlactaat-vloeistof werd in vacuo gedestilleerd met wijnsteenzuur. 1840 cm<sup>3</sup> destillaat titreerde 295 cm<sup>3</sup> n/10. Na indampen tot 200 cm<sup>3</sup> werden hieruit na zuurmaken met 60 cm<sup>3</sup> n/1 zwavelzuur de vluchtige zuren overgestoomd in 4 fracties à 500 cm<sup>3</sup>, die respectievelijk titreerden: 138, 68, 37 en 12 cm<sup>3</sup> n/10, met de bedoeling het melkzuurgehalte van het te onderzoeken mengsel te verminderen.

De geneutraliseerde fracties à 500 cm<sup>3</sup> werden ingedampt en met een geringe overmaat zwavelzuur gedestilleerd volgens de aangegeven aanvulmethode (110/80 beteekent dus, dat na iedere destillatie van 30 cm<sup>3</sup> met gedestilleerd heet water het volume weer op 110 cm<sup>3</sup> werd gebracht).

Fractie . . . . .	I	II	III + IV
Totaal zuurgehalte . . . . .	138	68	49
Methode . . . . .	110/80	110/90	110/90
Destillatiecijfers . . . . .	29,6	8,8	6,2
	52,2	16,3	11,4
	70,35	22,8	16,0
	84,1	28,5	20,0
	95,0	33,4	23,6
	103,75	37,7	26,7
	110,8	41,5	29,45
	—	44,8	—

waaruit nu met behulp van tabellen gevonden wordt:

Berekend uit de destillatiecijfers:	I.			II.			III + IV.		
	P.	A.	P + A.	P.	A.	P + A.	P.	A.	P + A.
1e en 5e . . . . .	24	115	139	6,4	60,5	67	4,0	44	48
1e „ 7e . . . . .	24	117	141	5,8	59,4	65	3,4	43	46
1e „ 8e . . . . .	—	—	—	5,5	61,5	67	—	—	—
2e „ 6e . . . . .	23,5	119	142,5	5,1	62,0	67	1,7	47	49
3e „ 6e . . . . .	23	114,5	137,5	5,5	62,5	68	2,0	47	49
3e „ 8e . . . . .	—	—	—	4,8	64,2	69	—	—	—
4e „ 7e . . . . .	20	117,5	137,5	0,8	53,0	54	—2	41,5	(39)
4e „ 8e . . . . .	—	—	—	3,8	64,0	68	—	—	—

Uit deze cijfers blijkt voldoende, dat de methode 110/80 zeer nauwkeurige analyseuitkomsten geeft en dat zelfs in het veel ongunstiger mengsel II de methode 110/90, die onnauwkeuriger is, nog met vrij groote zekerheid de hoeveelheid propionzuur in het mengsel aangeeft. In het derde destillaat (III + IV) voldoet 110/90 niet meer en ware een destillatie 110/80 of 110/70 beter op zijn plaats geweest.

De hierboven beschreven methode, die in verschillende modificaties toegepast zal kunnen worden, naar gelang van de aanwezige zuren en de vereichte nauwkeurigheid, maakt het door het principe der aanvulling met water mogelijk, om directe analyses van vluchtige zuren te maken in de te onderzoeken vloeistoffen, dus zonder de voorafgaande tijdroovende waterdampdestillatie of overdestillatie in vacuo, welke bovendien de nauwkeurigheid der uitkomsten beïnvloedt, doordat (vooral bij de lagere homologen) groote volumina overgestoomd moeten worden om alle vluchtig zuur uit de vloeistof te verwijderen.

Bij de directe bepaling van zelfs geringe hoeveelheden vluchtig zuur in melk b.v. wordt daartoe 50 cm<sup>3</sup> melk met 50 cm<sup>3</sup> water en 10 cm<sup>3</sup> zwavelzuur-oplossing in fracties gedestilleerd, onder toevoeging van puimsteenkorreltjes om stooten te vermijden en oliezuur (ontdaan van vluchtige bestanddeelen) om schuimen te verhinderen. Na iedere fractie, waarvan de grootte wederom bepaald wordt door de omstandigheden, wordt wederom tot 110 cm<sup>3</sup> aangevuld met water (eventueel heet water).

De hoeveelheid zwavelzuur, die voor een juiste bepaling noodig is, is minder afhankelijk van de hoeveelheid vluchtig zuur dan wel van de eigenschappen van de cultuurvloeistof. Is in een waterige oplossing van vetzure zouten slechts een geringe overmaat zwavelzuur noodig, hier moet zorg gedragen worden voor een sterk zuur milieu, gelijk blijkt uit de onderstaande cijfers:

Sterkte van het toegevoegde zwavelzuur	0,25 n	0,5 n	0,75 n	1 n
Titer 1e destillatiefractione . . . . .	12,7	14,05	14,4	14,4

Om aan te toonen met welken graad van nauwkeurigheid deze methode gebruikt kan worden volgt hier de bepaling van het vluchtig zuur in een melk-cultuur van aromabacteriën .

50 cm<sup>3</sup> melkcultuur werd gedestilleerd met 50 cm<sup>3</sup> water en 10 cm<sup>3</sup> n/1 zwavelzuur (met puimsteen en oliezuur), waarbij fracties van 50 cm<sup>3</sup> werden opgevangen. Na overgaan van iedere fractie werd met kokend water het volume in de destillatiekolf weer hersteld. De fracties werden getitreerd met n/50 loog.



De destillatiecijfers waren:

13,45    22,0    27,7    31,55    34,15    36,05

Nemen we aan, met azijnzuur te doen te hebben, dan wordt hieruit voor de hoeveelheid azijnzuur gevonden, resp.:

41,1    40,2    39,9    39,7    39,7    39,7,

welke cijfers alleszins weinig genoeg varieeren om deze aanname te rechtvaardigen.

Zooals reeds opgemerkt is, verdient het eerste destillatiecijfer niet altijd volledig vertrouwen, zoodat een eliminatie van de (onbekende) fout hierin dikwijls noodig zal zijn volgens de wijze als boven besproken. In dat geval vinden we voor de hoeveelheid azijnzuur in de 50 cm<sup>3</sup> melkzuur:

Berekend uit:

Ie en 4e . . . . .	38,5	2e en 5e . . . . .	38,6
Ie en 5e . . . . .	38,7	2e en 6e . . . . .	38,9
Ie en 6e . . . . .	38,9	3e en 6e . . . . .	38,8

waaruit dus berekend kan worden dat de hoeveelheid azijnzuur per 100 cm<sup>3</sup> 15,5 cm<sup>3</sup> n/10 bedraagt, terwijl vroeger met de indirecte methode <sup>1)</sup> slechts 3,5 cm<sup>3</sup> werd gevonden.

Dat bij de langdurige destillatie van de melk met zwavelzuur geen azijnzuur ontstaat blijkt uit een blancoproef, waarbij b.v. de zeer lage destillatiegetallen.

1,15    1,95    2,6    3,15    3,75  
1,05    1,7

gevonden worden, voor welke getallen men eventueel in de analysecijfers een correctie kan aanbrengen. Soms is het ook nuttig een correctie aan te brengen voor in de destillatiekolf aanwezig melkzuur.

Dat het azijnzuur op de beschreven wijze kwantitatief bepaald wordt blijkt uit de analyse van melk, waaraan per 200 cm<sup>3</sup> 4 cm<sup>3</sup> n/1 azijnzuur werd toegevoegd.

Destillatiecijfers melk + azijnzuur:	17,95	29,35	37,05	42,4	46,15	
Idem            melk		1,15	1,95	2,6	3,15	3,75

Berekende hoeveelheid azijnzuur:    51    50    50    49    49  
in cm<sup>3</sup> n/50 per 50 cm<sup>3</sup>, waarbij correctie in aanmerking genomen is.

<sup>1)</sup> BOEKHOUT en OTT DE VRIES, Aromavormers bij de roomzuring. *Verlag proefzuivelboerderij*, 1918, 48.

*Verl. v. landb.k. onderz. d. Rijkslandbouwproefstations*, 24 (1920), 1.

## SUMMARY.

*Estimation of volatile fatty acids with the distillation method.*

After a discussion of the original method of Duclaux (based on his discovery, that the series of titrating figures of ten fractions of 10 cm<sup>3</sup> each, distilled from 110 cm<sup>3</sup> of a solution of a pure fatty acid, is typical for the kind of volatile acid) and of the modification of this method, introduced by Boekhout and Ott de Vries (restoration of the initial volume of 110 cm<sup>3</sup> after removal of each fraction with 10 cm<sup>3</sup> of distilled water) it is mentioned how by means of the well-known equations:

$$\begin{aligned} a_1 A + b_1 B &= t_1 \\ a_n A + b_n B &= t_n \end{aligned}$$

the quantities of the acids, present in the original 110 cm<sup>3</sup> of liquid, may easily be calculated with the aid of previously arranged tables (Tables II, III are examples of this calculation method). These tables can also be used for the qualitative determination of mixtures of acids.

The logarithmical functions of Wiegner may have practical value for the calculation of the distilling percentages of acid in the subsequent fractions when distilling from any other initial volume and titrating fractions, larger or smaller than 10 cm<sup>3</sup>.

The method of Boekhout and Ott de Vries has an important advantage over the method of Duclaux, viz. the avoiding of great changes in the concentration of other substances present (e.g. salts, when the determination is made with a solution of salts of the fatty acids, in which the fatty acids have been liberated with non-volatile acids, of which sulfuric acid can be used best). All fractions are distilled under exactly the same conditions. However it is not a very accurate method, concluding from table III.

The accuracy can be increased by distilling the largest possible amount of the volatile acid(s), whilst the number of fractions ought to be kept as small as possible to form a series, allowing conclusions about the kind(s) of acid(s) present. This can be obtained by distilling larger fractions and by restoration of the initial volume with boiling water after distillation of each fraction. From table IV we may conclude how to choose the number and the volumina of the fractions for any given acid.

This method has been applied to the analysis of the volatile acids in a culture of „boekelscheur bacteria”.

A method is given for the estimation of the volatile acids in the culture medium itself (i.e. without previous steamdistillation). The determination

in a milkculture of bacteria forming acetic acid is made by distilling a mixture of 50 cm<sup>3</sup> of the culture medium, 50 cm<sup>3</sup> water and 10 cm<sup>3</sup> n/1 sulphuric acid, titrating fractions of 50 cm<sup>3</sup> and filling up with 50 cm<sup>3</sup> of hot water after distillation of each fraction.

This permits the estimation of small quantities of volatile acid with great accuracy.