637.22:633.2:581.192
633.2:581.192:637.22
637.222.1:547.915
547.915:637.222.1

MEDEDELINGEN VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN, NEDERLAND **62** (9) 1-134 (1962)

HET VERBAND TUSSEN DE LIPIDEN IN HET GRAS EN DE CONSISTENTIE VAN DE BOTER

THE RELATION BETWEEN THE LIPIDS FROM GRASS AND THE CONSISTENCY OF BUTTER

door/*by*

G. F. BLOM

Laboratorium voor Fysiologie der Dieren van de Landbouwhogeschool, Wageningen, Nederland

(Ontvangen/Received 23-7-'62)

INHOUD

INLEIDING 4

HOOFDSTUK 1. CONSISTENTIE EN STEVIGHEID DER BOTER EN HUN OORZAKEN . . . 5

§ 1. Omschrijving van de consistentie en de stevigheid der boter 5

§ 2. Het verband tussen de consistentie der boter en de chemische samenstelling van het botervet 5

§ 3. Het verband tussen de stevigheid en de chemische samenstelling van de boter . 7

§ 4. De invloed van de voeding op de melkvetsynthese en op de chemische samenstelling van het melkvet 9

§ 5. Doel van het onderzoek 11

HOOFDSTUK 2. DE CHROMATOGRAFIE VAN LIPIDEN UIT GRAS 11

§ 1. Literatuur 11
a. Vroeger onderzoek van de lipiden uit gras 11
b. De chromatografie van vetachtige stoffen 14
c. Beschouwing van de literatuurgegevens 17

§ 2. Onderzoek van het adsorptiesysteem 18
Inleiding en doel van het onderzoek 18

A. De methodiek der bepalingen 18
a. Het adsorbens 18
b. De elutievloeistoffen 18
c. De modelstoffen 19
d. Het gereedmaken van de adsorptiekolom 19
e. Het opbrengen van de te onderzoeken stoffen 19
f. Het elueren 19
g. De verdere bewerking van de eluaten 20

h. Bepaling van het aantal milliequivalenten zuur, het zuurgetal en het equivalentgewicht 20
j. Bepaling van het aantal dubbele bindingen in meq uitgedrukt en het jood-additiegetal 20

B. De chromatografie van lipiden 20
I. De chromatografie van wasachtige stoffen 20
a. Inleiding 20
b. De chromatografie van wassen 21
c. De chromatografie van wasalkoholen 21
II. De chromatografie van enkelvoudige modelstoffen 22
a. Inleiding 22
b. Blanco-bepalingen 22
c. Petroleumaethergroep 26
d. Tetragroep 26
e. Benzeengroep 26
1. Glyceriden 27
2. Vetzuren 27
3. Verzepingsprodukten van glyceriden 28
f. Aethergroep 28
1. Sterolen 28
2. Di- en tricarbonzuren 28
g. Samenvatting der proeven met modelstoffen 28
III. De chromatografie van mengsels van stoffen uit meer dan één elutiegroep . 29
a. Uitvoering 29
b. Bespreking der uitkomsten 29
IV. Chromatografie van grasextract met toegevoegde modelstoffen . . . 33
V. De chromatografie van gras- en mestextracten 36
a. Inleiding 36
b. Chromatografie na verzeping van het grasextract 36
c. De verhouding van adsorbens tot adsorbaat 36
d. Chromatografie van mestextract 36

C. Overzicht der verkregen uitkomsten 37

§ 3. Toepassing van de chromatografie bij een verteringsproef 38
a. Algemene opzet 38
b. Het proefdier 38
c. Het gras 39
d. Het verloop der proef 40
e. De verwerking der monsters 41
f. Berekening van de verteringscoëfficiënten 42
g. De chromatografische bewerking van de verkregen gras- en mestextracten . 43
h. Uitkomsten 44
j. Bespreking der uitkomsten 46

§ 4. Eindconclusies 48

HOOFDSTUK 3. DE ISOLERING EN DE BEPALING VAN DE VETZUREN UIT GRAS EN MEST EN DE TOEPASSING HIERVAN OP EEN VERTERINGSPROEF MET KOEIEN 48

Inleiding 48

§ 1. Ontwikkeling der methodiek 49
Inleiding 49
a. De extractie van het uitgangsmateriaal 49
b. De behandeling van het extract vóór de verzeping 50
c. De verzeping van het extract en de verwijdering van de onverzeepbare stoffen 51
d. De hoeveelheid extract per chromatogram 53

§ 2. Werkwijze ter isolering en bepaling van de vetzuren in gras en mest . . . 54
A. Benodigdheden 54

I. Reagentia 54
II. Apparaten en glaswerk 54
B. Methodiek 55
I. Isolering van de vetachtige stoffen uit gras en mest 55
a. Inleiding 55
b. Voorbereiding van het analysemonster 55
c. Ontsluiting van het monster 55
d. Extractie van de vetachtige stoffen 55
II. Isolering van de vetzuren uit de geëxtraheerde vetachtige stoffen en bepaling van het joodadditiegetal en van het equivalentgewicht . . 56
a. Inleiding 56
b. Voortgezette verzeping van het extract 56
c. Scheiding van het verzeepte extract in onverzeepbare stoffen en zure verzepingsprodukten 56
d. Chromatografie van de zure verzepingsprodukten 57
e. Bepaling van het joodadditiegetal volgens Wijs 58
f. Bepaling van het equivalentgewicht 58
§ 3. Toepassing van de uitgewerkte analysemethode bij een verteringsproef met vers gras 58
a. Proefopzet 58
b. De proefdieren 58
c. De bemonstering van gras en mest 58
d. De analyse van gras en mest 59
e. Analyse der vetachtige stoffen 59
§ 4. Bespreking der uitkomsten van de verteringsproef 62
I. Verteringscoëfficiënten van de voornaamste groepen van nutriënten . . 62
II. Vetachtige stoffen 62
a. De benzeeneluaten 65
b. De aethereluaten 68
c. De absolute alkoholeluaten 69
§ 5. Beschouwingen naar aanleiding van de uitkomsten der verteringsproef . . 76
§ 6. Eindconclusies en samenvatting 76
HOOFDSTUK 4. STATISTISCHE BEWERKING VAN GEGEVENS OVER ENKELE FACTOREN, DIE MEDE DE CONSISTENTIE VAN DE BOTER BEPALEN 76
Inleiding 76
I. Vroegere onderzoekingen naar factoren, die de consistentie der boter bepalen . 77
Eigen onderzoek 83
I. Inleiding en doel van het onderzoek 83
II. Het cijfermateriaal 83
a. Het refractometergetal 83
b. De melkaanvoer 84
c. Het vetpercentage der melk 84
d. De melkvetaanvoer 84
e. Het aantal melkgevende koeien per fabriek 84
III. De grootheden waarmede de berekeningen zijn uitgevoerd 85
a. Het refractometergetal (R_w) 85
b. Het vetpercentage (V_w) 85
c. De vetproduktie per koe per dag in grammen (K_w) 85
IV. De statistische bewerking der gegevens 85
a. Verantwoording der gebruikte gegevens 85
b. Verdere bewerking van de basisgegevens 88
c. De statistische berekeningen 89
V. Beschouwing der uitkomsten 96
VI. Vergelijking van onze uitkomsten met literatuurgegevens 98

HOOFDSTUK 5. VERDER ONDERZOEK NAAR DE FACTOREN, WELKE HET REFRACTOMETERGETAL VAN HET MELKVET BEPALEN 101

Inleiding 101

§ 1. Het verband tussen het refractometergetal en het vetgehalte der melk . . . 102

A. Statistische bewerking van het cijfermateriaal 102

a. Verantwoording van het gebruikte cijfermateriaal 102

b. Berekening van het gemiddelde refractometergetal en het gemiddelde vetgehalte per fabriek 103

c. Statistische bewerking der gegevens 103

d. Bespreking der uitkomsten 110

B. Mogelijke andere factoren, welke het refractometergetal bepalen . . 113

a. Verwerking van het beschikbare cijfermateriaal 113

b. Bespreking van het bewerkte cijfermateriaal 114

§ 2. Overzicht van de refractometergetallen voor geheel Nederland 116

a. Het cijfermateriaal 116

b. De bewerking van het cijfermateriaal 116

c. Beschouwing der gegevens 117

§ 3. Samenvatting 119

SAMENVATTING 119

SUMMARY 123

LITERATUURLIJST 128

INLEIDING[1]

Gezien de belangrijke plaats die de boter inneemt in de agrarische sector van onze economie, is het noodzakelijk dat veel aandacht wordt geschonken aan een goede afzet van dit produkt. Het prijspeil en de afzetmogelijkheden zijn sterk afhankelijk van de kwaliteit. Zowel door de producenten als door de controle-instanties wordt steeds nauwkeurig op de kwaliteit toegezien. Aangezien de consistentie van de boter bij voortduring een bron van ernstige zorg is, leek het gewenst deze consistentie aan een nader onderzoek te onderwerpen.

Deze consistentie is niet alleen afhankelijk van de wijze waarop de boterbereiding in de fabriek plaats vindt (MULDER, 1940a, b; 1947a, b), maar ook in belangrijke mate van de samenstelling van het melkvet, dat voor de boterbereiding wordt gebruikt. De samenstelling van het vet kan zelfs van dien aard zijn, dat het niet mogelijk is er boter van een goede consistentie uit te bereiden. De meeste moeilijkheden ondervindt men in de nazomer en in de herfst; de boter is in die tijd veelal aanzienlijk weker dan met een goede kwaliteit verenigbaar is.

Over de factoren, die de samenstelling van het melkvet bepalen, is wel het een en ander bekend. Zo weet men van oudsher dat zowel de voeding der koeien alsook de grootte van de melk- en vetproduktie van veel belang zijn (zie o.a. ORTH, KAUFMANN, WEINERT, 1956), voorts zijn ook de individuele verschillen tussen de dieren van betekenis (BROUWER, 1932a). Omtrent zeer veel punten verkeert men echter nog in het onzekere, zodat een diepergaand onderzoek naar de zojuist genoemde factoren noodzakelijk leek.

[1]) Dit onderzoek werd verricht met steun van de Directie van de Landbouw in het kader van een der landbouwkundige projecten gefinancierd met MSA-gelden.

HOOFDSTUK I

CONSISTENTIE EN STEVIGHEID DER BOTER EN HUN OORZAKEN

§ 1. OMSCHRIJVING VAN DE CONSISTENTIE EN DE STEVIGHEID DER BOTER

In zijn boek over Zuivelbereiding geeft MULDER (1947b) de volgende omschrijving van de consistentie ener stof: "De consistentie van een stof geeft de vormveranderingen aan, die een gevolg zijn van uitwendig op die stof werkende krachten. Consistentie heeft dus geen betrekking op de samenstelling en de structuur van de stof (bij boter zegt de consistentie dus niets over b.v. vochtgehalte of de vochtverdeling). Wel kunnen de samenstelling en de structuur invloed hebben op de consistentie. *Onder de consistentie van boter moet worden verstaan het gehele complex van rheologische eigenschappen, zoals b.v. de smeerbaarheid, de stevigheid, de elasticiteit, de brokkeligheid.*"

Wat nu de meest gewenste consistentie der boter betreft, hiervan geeft MULDER de volgende beschrijving: "In het algemeen verlangt men van boter, dat ze een zekere stevigheid bezit; een kluit boter mag niet uitzakken of uitvloeien. Te stevig mag de boter echter ook niet zijn, want dan zou men haar niet kunnen smeren. Boter mag niet rekbaar, lang of taai zijn (b.v. als stroop). Ze mag echter evenmin de tegengestelde eigenschap hebben, nl. kruimelig, brokkelig of kort zijn. Ten slotte nog mag boter niet zalvig of kleverig zijn en mag ze bij het proeven niet een melige of zanderige indruk maken op de tong. De consistentie van boter is dus een ingewikkeld complex van eigenschappen."

§ 2. HET VERBAND TUSSEN DE CONSISTENTIE DER BOTER EN DE CHEMISCHE SAMENSTELLING VAN HET BOTERVET

De triglyceriden, die in het botervet voorkomen, zijn tot nu toe slechts voor een klein deel zuiver verkregen (door synthese of door isolering uit natuurlijke vetten). Door onderzoek van hun gedrag bij afkoeling en verwarming is gebleken, dat deze stoffen een sterke neiging hebben onderkoeld te geraken of in metastabiele modificaties, met een lager smeltpunt dan de stabiele modificatie, uit te kristalliseren. Slechts bij langzame en voorzichtige afkoeling of verwarming bleek het mogelijk de triglyceriden in de stabiele modificatie te doen kristalliseren.

De smeltpunten van zowel de stabiele als de metastabiele modificaties worden bepaald door de vetzuurresten welke in het triglyceride voorkomen. Bij toenemende ketenlengte van de vetzuurresten stijgen de smeltpunten der overeenkomstige modificaties. Zo is het smeltpunt van iedere modificatie van tristearine hoger dan het smeltpunt van de overeenkomstige modificatie van tripalmitine. Voorts dalen de smeltpunten der onderscheiden modificaties sterk bij vervanging van een verzadigde vetzuurrest door een onverzadigde vetzuurrest met dezelfde ketenlengte. Ook de neiging tot het optreden van onderkoeling neemt sterk toe bij vervanging van verzadigde door onverzadigde vetzuurresten. Het is waarschijnlijk, dat deze neiging tot onderkoeling nog toeneemt, wanneer het niet een triglyceride in zuivere toestand betreft, doch een mengsel van vele, zeer verschillend gebouwde triglyceriden.

Uit het voorafgaande wordt nu duidelijk waarom de temperatuur vóór, tij-

dens en nà het karnen en kneden, ook haar invloed doet gelden op de hoeveelheden vast en vloeibaar vet in de boter (MULDER, 1939, 1947b), al zijn de mogelijkheden, om door een juiste temperatuurbehandeling boter van goede consistentie te bereiden, vrij beperkt. Het blijkt in de praktijk namelijk niet mogelijk te zijn alle vetten in de stabiele modificatie te doen kristalliseren. Wij moeten dus ernstig rekening houden met het voorkomen van onderkoelde, vloeibare vetten en van metastabiele modificaties met een smeltpunt dat slechts weinig boven de normale gebruikstemperatuur ligt en die dus bij een kleine stijging van temperatuur in de vloeibare (onderkoelde) fase overgaan.

Wij kunnen de vetzuren, die in het botervet voorkomen, als volgt in drie groepen splitsen:

S: verzadigde vetzuren met korte koolstofketen, zoals boterzuur, capronzuur, caprylzuur, caprinezuur.

P: verzadigde vetzuren met lange koolstofketen, zoals laurinezuur, myristinezuur, palmitinezuur, stearinezuur, arachinezuur.

L: onverzadigde vetzuren, zoals oliezuur, linolzuur, linoleenzuur, vacceenzuur, palmitoleinezuur.

Aan de hand van deze indeling en de gemiddelde vetzuursamenstelling van het melkvet in Nederland (tabel 1) zullen wij nu de invloed van de chemische samenstelling op de kristallisatie-neiging van het botervet nog wat nader bezien.

TABEL 1. Gemiddelde vetzuursamenstelling van in Nederland geproduceerd melkvet volgens MULDER (1947a)

Vetzuur	gew. %	mol %	Vetzuur	gew. %	mol %	Vetzuur	gew. %	mol %
boterzuur	3,1	8,5	laurinezuur	3,2	3,9	oliezuur	41,3	35,5
capronzuur	1,7	3,6	myristinezuur	7,1	7,6	linolzuur	5,1	4,4
caprylzuur	0,7	1,2	palmitinezuur	22,8	21,6			
caprinezuur	1,8	2,5	stearinezuur	12,5	10,7			
			arachinezuur	0,7	0,5			
S	7,3	15,8	P	46,3	44,3	L	46,4	39,9

Joodadditiegetal van dit vet ± 39

Op welke wijze de vetzuren verdeeld worden over de triglyceriden is nog onvoldoende bekend (HILDITCH, 1956). Er zijn echter twee op de voorgrond tredende hypothesen, namelijk:

1. verdeling volgens de "regel der zo gelijkmatig mogelijke verdeling",
2. verdeling volgens de "wetten van het toeval".

Wij zullen geen voorkeur uitspreken, maar in ons betoog aan beide hypothesen aandacht schenken. Ter vereenvoudiging van het probleem veronderstellen wij, dat wij slechts te maken hebben met drie molecuulsoorten, namelijk de vetzuren S, P en L uit tabel 1. Berekent men nu de samenstelling volgens de eerste regel, dat vindt men:

$$\pm\ 33\%\ \text{PPL},\ \pm\ 20\%\ \text{PLL en}\ \pm\ 47\%\ \text{SPL}.$$

Volgens de tweede regel vindt men de gegevens in tabel 2.

In het eerstgenoemde geval zijn de triglyceriden PPL (33%) bij normale temperatuur vermoedelijk vast, de triglyceriden PLL (20%) vloeibaar en de triglyceriden SPL (47%) zullen vast of vloeibaar zijn, afhankelijk van de temperatuur

TABEL 2. Globale samenstelling der triglyceriden in het melkvet uit de gemiddelde vetzuursamenstelling berekend volgens de wetten van het toeval

Triglyceride	mol %	Triglyceride	mol %	Triglyceride	mol %
SPP	9,3	LLL	6,4	SSS	0,4
PPP	8,7	SLL	7,5	SSP	3,3
PPL	23,5	SPL	16,8	SSL	3,0
				PLL	21,2
groep A	41,5	groep B	30,7	groep C	27,9

Methode van berekening: stel S is de fractie van de vetzuren S, P is de fractie vetzuren P en L is de fractie vetzuren L. Uiteraard is $S + P + L = 1$. De percentages van de verschillende triglyceriden volgen nu uit de ontwikkeling van de macht $(S + P + L)^3$ vermenigvuldigd met 100.
$(S + P + L)^3 = S^3 + 3S^2P + 3SP^2 + P^3 + 3S^2L + 3SL^2 + 6SPL + 3P^2L + 3PL^2 + L^3$.
Bij voorbeeld: de hoeveelheid triglyceride PPL bedraagt in mol %: $100 \times 3P^2L = 100 \times 3 \times 0{,}443^2 \times 0{,}399 = 23{,}5$.

tijdens de boterbereiding en de gebruikstemperatuur. In het tweede geval zal de groep A (42%) vast zijn, de groep B (30%) vloeibaar en de groep C (28%) zal vast of vloeibaar zijn al naar gelang van omstandigheden en behandeling.

Indien wij dezelfde berekening nogmaals uitvoeren met een vetzuursamenstelling waarbij het gehalte aan onverzadigde vetzuren 5% hoger is (S = 13%, P = 42%, L = 45%, J-getal ± 43), dan vinden wij in het eerste geval:

$$\pm 26\%\ \text{PPL},\ \pm 35\%\ \text{PLL en}\ \pm 39\%\ \text{SPL}.$$

In het tweede geval vinden wij:

$$\pm 38\%\ \text{groep A},\ \pm 32\%\ \text{groep B en}\ \pm 30\%\ \text{groep C}.$$

Het voorafgaande wijst op de grote invloed van de onverzadigde vetzuren op het percentage vloeibaar vet. Immers een stijging van het gehalte aan onverzadigd vetzuur van 40% tot 45% (dus relatief 12%) doet het gehalte aan vaste triglyceriden dalen van resp. 33% en 42% tot resp. 26% en 38% (relatief resp. 20% en 10%).

De mogelijkheid tot het bereiden van boter met een goede consistentie hangt hiermede ten nauwste samen. Wanneer men dus de consistentie van de boter wenst te wijzigen, zal dit behalve door de wijze van boterbereiding, ook kunnen geschieden door een wijziging van de verhouding van de hoeveelheden der verzadigde en onverzadigde vetzuren waaruit de triglyceriden van het melkvet zijn opgebouwd.

Deze voorstelling van zaken is, zoals gezegd, zeer schematisch. Het zal pas mogelijk zijn een en ander nader uit te werken, wanneer de samenstelling van het melkvet nauwkeurig bepaald kan worden.

§ 3. HET VERBAND TUSSEN DE STEVIGHEID EN DE CHEMISCHE SAMENSTELLING VAN DE BOTER

Men heeft herhaaldelijk getracht de samenhang tussen consistentie en chemische samenstelling door een correlatie-coëfficiënt te karakteriseren. Zoals in het voorafgaande werd betoogd, is vooral de verhouding tussen vast en vloeibaar vet belangrijk. Deze verhouding nu is sterk gecorreleerd met het joodadditiegetal (J-getal) van het botervet, met dien verstande dat bij toeneming van de hoeveel-

heid vloeibaar vet het J-getal stijgt. De verhouding van de hoeveelheden vast en vloeibaar vet kan dus worden uitgedrukt in een cijfer, dat verband houdt met een bepaald facet van de chemische samenstelling, met name de onverzadigdheid van het botervet. Met het begrip consistentie is dit echter niet mogelijk, door het ingewikkelde samenspel van eigenschappen welke de consistentie bepalen. Nu is de stevigheid de belangrijkste van deze eigenschappen, mede doordat de smeerbaarheid, de elasticiteit en de brokkeligheid er vrij sterk mee samenhangen. De stevigheid kan wel in cijfers worden uitgedrukt, zodat een berekening van de correlatie met het J-getal mogelijk is. Echter schuilen ook hier moeilijkheden, omdat er verschillende soorten van stevigheid zijn, zoals "toonbankstevigheid" (vormverandering onder invloed van het eigen gewicht over lange tijd), "smeerstevigheid" (vormverandering door uitwendige min of meer tangentieel gerichte krachten) en "duimstevigheid" (vormverandering door uitwendige min of meer loodrecht op het oppervlak gerichte krachten; deze vorm van stevigheid houdt ongeveer het midden tussen de beide hiervoor genoemde). Deze vormen van stevigheid kunnen ieder voor zich weer op verschillende wijzen worden gemeten. Toch bestaat er een nauwe samenhang tussen hen, zodat men kan verwachten dat een verandering van de ene soort van stevigheid gewoonlijk met een gelijkgerichte verandering van de andere soorten van stevigheid gepaard zal gaan.

De correlatie tussen de een of andere vorm van stevigheid van de boter en het J-getal van het botervet is herhaaldelijk bepaald en vrij nauw bevonden (HANSEN e.a., 1930; HAGLUND e.a., 1930; KRUISHEER e.a., 1943; OLSSON, 1948; BALCH e.a., 1952; BERGMAN, JOOST, 1952; MULDER, 1953). Dit is eveneens het geval met de correlatie tussen de kristallisatie-neiging van het botervet en het J-getal (BROUWER, 1943a). Hieruit volgt, dat het J-getal van het botervet een grootheid is, welke ons in staat stelt de geschiktheid van dit vet voor de bereiding van boter met de gewenste stevigheid en dus waarschijnlijk ook van de gewenste consistentie te beoordelen.

Tussen het J-getal en de refractie $\left(n_t^D\right)$ van het botervet bestaat ook een vrij nauwe samenhang. De refractie van het botervet wordt meestal uitgedrukt in de zogenaamde boterrefractometergraden. Vele onderzoekingen (KRUISHEER, 1941; AAS, 1943; PLATON, OLSSON, 1942; KRUISHEER e.a., 1943) gaven een zeer sterke positieve correlatie tussen de refractie, uitgedrukt in boterrefractometergraden (refractometergetal) en het J-getal. Ook de directe samenhang tussen refractie en stevigheid is zeer sterk (KRUISHEER, 1940), evenals die tussen refractie en dilatometerwaarde (BROUWER, 1943). Het refractometergetal stelt ons dus eveneens in staat de geschiktheid van het botervet voor de boterbereiding te beoordelen.

Dit alles brengt voor het onderzoek een aanzienlijke vereenvoudiging mee, omdat voor de bepaling van het refractometergetal slechts een zeer geringe hoeveelheid botervet behoeft te worden afgescheiden (minder dan 1 g) en onderzocht, in tegenstelling tot de veel grotere hoeveelheid vet die nodig is voor de rechtstreekse bepaling van de stevigheid en de consistentie. Voorts vergt de bepaling van het refractometergetal aanzienlijk minder tijd dan de andere genoemde bepalingen, hetgeen uiteraard voor het routine-onderzoek van groot belang is.

Op grond van de hiervoor genoemde redenen zullen wij niet de consistentie van de boter in al haar aspekten beschouwen, maar ons beperken tot de J-getal-

len en (of) de refractometergetallen als maat voor de te verwachten stevigheid der boter.

§ 4. De invloed van de voeding op de melkvetsynthese en op de chemische samenstelling van het melkvet

Door tal van onderzoekingen is gebleken, dat het door wijzigingen in het voederrantsoen van het melkvee mogelijk is, invloed uit te oefenen op de chemische samenstelling van het melkvet, zoals die tot uitdrukking komt in het refractometergetal, het J-getal en de stevigheid van de boter (Mayer, 1892; Kellner, 1919; Hansen, Steensberg, 1930; Hansson, Olofsson, 1931; Brouwer, Frens, 1937; Brouwer, Dijkstra, Frens, 1943; Moghul e.a., 1948; Hilditch, 1956; Steensberg, Winther, 1950; Mattson e.a., 1951; Brouwer, 1952; Hostettler e.a., 1954). Brouwer en Frens (1937) gaven een samenvattend overzicht van de oudere proeven op dit gebied; Orth e.a. (1956) hebben in een uitvoerig overzicht ook de nieuwere literatuur samengevat.

Uit al deze proeven blijkt ten eerste, dat vetarme voedermiddelen in het algemeen een stevige boter doen produceren en ten tweede, dat vetrijke voedermiddelen zowel een zachtmakende als een hardmakende invloed kunnen hebben. Welke werking een vetrijk voedermiddel heeft, hangt af van de hoeveelheid en het J-getal van het voedervet. Hoe hoger het J-getal van het voedervet, bij gelijke hoeveelheid, hoe hoger het J-getal van het botervet en hoe slapper de boter die daaruit bereid kan worden. Brouwer e.a. (1937) voerden hierbij het begrip joodadditieprodukt (= hektogrammen vet in het opgenomen voeder × J-getal van dit vet) in. Het J-getal van het botervet vertoonde een vrij nauwe samenhang met het joodadditieprodukt van het voedervet.

De samenhang tussen de hoeveelheid en de hoedanigheid van het voedervet enerzijds en de stevigheid van de boter anderzijds vindt zijn verklaring in het feit, dat het rund vrijwel niet in staat is zelf onverzadigde vetzuren te synthetiseren. Het dier is dus voor de onverzadigde vetzuren bijna uitsluitend aangewezen op de onverzadigde vetzuren uit het voeder. De vetarme voedermiddelen, die zoals gezegd, boter met een laag J-getal geven, bevatten uiteraard weinig onverzadigd vetzuur. Daarentegen bevatten zij veel bestanddelen, die in de intermediaire stofwisseling acetaat leveren en daaruit kan slechts zeer weinig onverzadigd vetzuur worden gemaakt, doch wel veel verzadigd vetzuur. Voor een andere herkauwer, de geit, kon Popjak (1952) dit met behulp van isotopen bewijzen. Daarbij bleek, dat van de radioactieve melkvetzuren afgescheiden in de periode tussen 1 en 12 uur na de toediening van radioactief gemerkt acetaat, slechts $\pm$ 0,6% oliezuur was. Voor het tijdvak van 12 tot 24 uur na de toediening was dit $\pm$ 1,7%. Het is door deze proeven niet duidelijk geworden of dit radioactieve oliezuur geheel uit acetaat was opgebouwd of dat er slechts een verlenging van de koolstofketen van een reeds aanwezige onverzadigde verbinding had plaats gevonden.

Wat de meervoudig onverzadigde vetzuren betreft, hiervan staat vast, dat zij praktisch niet door het dierlijk organisme kunnen worden opgebouwd. Door vele proeven (Reiser, 1951; Hartmann e.a., 1955; Hoflund e.a., 1955; Shorland e.a., 1955, 1957) is gebleken, dat het organisme van het rund wel in staat is om meervoudig onverzadigde vetzuren partieel te hydreren. Bij voedering van grote hoeveelheden linoleenzuur (b.v. in de vorm van lijnolie), dat drie dubbele bindingen bevat, stijgt het gehalte aan dit zuur in het melkvet – nor-

maal zijn slechts sporen aanwezig – niet noemenswaard. Het gehalte aan het minder sterk onverzadigde oliezuur (één dubbele binding) daarentegen neemt aanzienlijk toe, terwijl het gehalte aan linolzuur (twee dubbele bindingen) eveneens een duidelijke stijging ondergaat (GOGOTIDSE, 1904; HILDITCH, THOMPSON, 1936).

Deze theorieën steunen alle de oude ervaring, dat het mogelijk is door een juiste voedering te allen tijde het gehalte aan onverzadigde vetzuren van het melkvet te verhogen of te verlagen en daardoor de stevigheid der boter binnen zekere grenzen te regelen. Dit wil echter niet zeggen, dat wij op grond van een analyse van de bestanddelen van het voeder nauwkeurig kunnen voorspellen hoe hoog het J-getal en welke de stevigheid zullen zijn van de boter, die uit het geproduceerde melkvet kan worden bereid (MAYER, 1892; KELLNER, 1919; HANSEN, STEENSBERG, 1930; HANSSON, OLOFSSON, 1931; BROUWER, FRENS, 1937; MOGHUL e.a., 1948; HILDITCH 1956; MATTSON e.a., 1951).

Er zijn talrijke pogingen ondernomen om de geringe stevigheid van de boter tijdens de weidegang te verhogen door het bijvoederen van hardmakende voedermiddelen (BROUWER, 1932b; BROUWER, DIJKSTRA, FRENS, 1943; SJOLLEMA, 1943). Op deze wijze boekte men wel enige successen, doch het bleek, dat het bijvoederen van consistentie-corrigerende voedermiddelen, anders dan in perioden waarin er een tekort aan gras is, op grote bezwaren stuit wegens de grote kosten van deze bijvoedering en wegens het tekort aan arbeidskrachten. Wij zijn dus gedwongen naar andere middelen te zoeken om de stevigheid van de zomer- en herfstboter in de gewenste richting te wijzigen. Daartoe is het noodzakelijk in de eerste plaats een verdergaand onderzoek in te stellen naar de oorzaken van de zachte boter in deze periode.

BROUWER (1932a) stelde hieromtrent de volgende hypothesen op:

1. het gras bevat één of meer zachtmakende stoffen;
2. deze stoffen zijn de onverzadigde vetzuren uit het gras.

Inderdaad bezitten de vetzuren uit gras een hoog J-getal (SMITH e.a., 1932a; SHORLAND, 1941; BROUWER en VAN ALBADA, 1943; GARTON, 1960). Voorts toonde BROUWER (1932a) aan, dat een lagere vetproduktie bij de koe dooreengenomen samengaat met een hoger J-getal van het melkvet en dus met een zachtere boter. Dit verschijnsel verklaart ook grotendeels het verminderen van de stevigheid van de boter in de loop van de lactatieperiode ondanks kwalitatief onveranderde voeding. Immers, de melkproduktie en de melkvetproduktie nemen daarbij af (FRIIS, 1900; HOLLAND, BUCKLEY, 1918; RIDDETT e.a., 1941; BARTLEY e.a., 1951). Om dit verband tussen de vetproduktie en het J-getal van het geproduceerde vet te verklaren wees hij er allereerst op, dat bij afnemende produktie in de verhouding

$$\frac{\text{onderhoudsvoer} + \text{produktievoer}}{\text{geproduceerd melkvet}}$$

de term onderhoudsvoer steeds meer invloed krijgt en omgekeerd, bij toenemende produktie, steeds minder. Het is uiteraard vrijwel onmogelijk een scheiding te maken tussen onderhoudsvoer en produktievoer. Onder onderhoudsvoer dienen wij te verstaan dat gedeelte van het totaal opgenomen voeder, dat nodig is voor de instandhouding van alle levensprocessen, met uitzondering van die, welke betrokken zijn bij de melkproduktie. BROUWER stelt dus, dat de hoe-

veelheid voeder, welke nodig is voor het onderhoud van de levensprocessen onafhankelijk is van de hoeveelheid geproduceerde melk.

Zijn betoog houdt uiteraard de veronderstelling in, dat de onverzadigde vetzuren uit het voeder bij voorkeur gebruikt worden voor de melkvetsynthese en niet of in geringe mate voor onderhoud. ORTH e.a. (1956) spreken zich eveneens in deze zin uit. In de verhouding

$$\frac{\text{onverzadigd vetzuur in onderhoudsvoer} + \text{onverzadigd vetzuur in produktievoer}}{\text{geproduceerd melkvet}}$$

krijgt het onverzadigde vetzuur uit het onderhoudsvoer steeds meer invloed naarmate de melkvetproduktie afneemt. Daaruit volgt, dat de waarde van de verhouding groter wordt en dat de hoeveelheid onverzadigd vetzuur die per gram melkvet beschikbaar is, toeneemt. Het J-getal van dit vet zal dus stijgen en de stevigheid van de boter geringer worden, waarmede het hierboven genoemde verband tussen melkvetproduktie en J-getal van het melkvet althans in beginsel verklaard is.

§ 5. DOEL VAN HET ONDERZOEK

In de volgende hoofdstukken zullen deze theorieën nader worden onderzocht. Het eerste deel van het onderzoek richt zich op het verkrijgen van een dieper inzicht in de hoeveelheid en de aard van de vetzuren in het gras en hun vertering door de koe. Tevens zal worden getracht uit te maken in welke verbindingen de vetzuren daarin voorkomen en in hoeverre deze verbindingen voor de spijsvertering van het rund toegankelijk zijn (hoofdstuk 2 en 3).

Het tweede deel van het onderzoek behelst een studie van de samenhang tussen de per koe geproduceerde hoeveelheid melkvet en de stevigheid van boter, bereid in een groot aantal fabrieken over het gehele land verspreid (hoofdstuk 4 en 5).

HOOFDSTUK 2

DE CHROMATOGRAFIE VAN DE LIPIDEN UIT GRAS

§1. LITERATUUR

a. Vroeger onderzoek van de lipiden uit gras. De eerste poging tot het bepalen van de samenstelling van de vetachtige stoffen uit gras is gedaan door CHIBNALL en medewerkers (POLLARD e.a., 1931; SMITH, CHIBNALL, 1932a, 1932b). Tabel 3 geeft een overzicht van de uitkomsten van deze onderzoekingen. Hierbij werd het verse gras na drogen met aether geëxtraheerd en vervolgens werden de wasachtige stoffen en de fosfolipiden door aceton geprecipiteerd.

SHORLAND (1941) beschrijft de bepaling van de samenstelling van de vetachtige stoffen in een monster weidegras. Bij deze bepaling werd de extractie uitgevoerd met petroleumaether; overigens werd dezelfde behandeling toegepast als door CHIBNALL e.a. De eerste regel van tabel 4 geeft een overzicht van de uitkomst van deze analyse. Uit de gepubliceerde gegevens berekenden wij $\pm$ 130 voor het J-getal der glyceride-vetzuren. Een tweede onderzoek (SHOR-

TABEL 3. Samenstelling van de vetachtige stoffen uit gras volgens CHIBNALL e.a.

Grassoort	Aether-extract % van ds	Oplosbaar in koude aceton			Onoplosbaar in koude aceton		Literatuur
		Glyceride-vetzuren		Onverzeep-baar % van ds	Wassen % van ds	Fosfatiden % van ds	
		% van ds	J-getal				
Kropaar, *Dactylus glomerata*	5,8	2,2	170	2,78	–	–	SMITH, CHIBNALL, (1932a)
„ „ „	6,5	2,3	184,8	–	–	–	ibid.
Raaigras, *Lolium perenne*	4,5	1,7	175	–	–	–	ibid.
Kropaar, *D. glomerata*	5,65	–	–	–	1,2	–	POLLARD, CHIBNALL, PIPER, (1931)
Raaigras, *L. perenne*	3,8	–	–	–	0,38	–	ibid.
Kropaar, *D. glomerata*	–	–	–	–	–	0,25	SMITH, CHIBNALL, (1932b)

TABEL 4. Samenstelling van de vetachtige stoffen uit gras in procenten van de droge stof volgens SHORLAND

Grassoort	Totaal vetachtige stof %	Oplosbaar in koude aceton				Totaal onverzeep-baar %	Sterolen %	Onoplosbaar in koude aceton		Literatuur
		Totaal %	Glyceride-vetzuren		Onver-zeepbaar %			Wassen %	Fosfa-tiden %	
			%	J-getal						
Gemengd weidegras (1 monster)	5,59	3,70	2,52	± 130	1,18	1,63	0,18	0,58	0,13	SHORLAND, (1941)
Kropaar, *D. glomerata* (10 monsters)	6,12	5,06	3,13	± 185	0,96	–	–	0,86	0,20	SHORLAND, (1944)
Standaardafwijking	1,05	0,83	0,70	–	0,17	–	–	0,09	0,07	

LAND, 1944) strekte zich uit over 10 monsters *Dactylis glomerata*, welke op verschillende tijdstippen waren genomen (tabel 4, regel 2 en 3). Helaas zijn de uitkomsten der afzonderlijke monsters niet gepubliceerd, doch slechts de gemiddelden van 10 monsters, alsmede de standaardafwijkingen van deze gemiddelden. Voorts geeft WEENINK (1961) nog een analyse van de lipiden uit rode klaver.

Ondanks het waarschijnlijk zeer grote belang van de vetachtige stoffen uit het gras voor de voeding van het rundvee is er verder tot op heden weinig aandacht aan deze stoffen geschonken. De uitkomsten van de hier genoemde onderzoekingen blijken vrij goed met elkaar overeen te stemmen.

Ook de vetzuren, welke in het gras vrij of gebonden voorkomen, zijn nog weinig onderzocht. SMITH en CHIBNALL (1932a) vonden in de droge stof van kropaar (*D. glomerata*) 2,2% vetzuur met J-getal 170 en equivalentgewicht 278. De totale hoeveelheid verzadigde vetzuren werd door hen op drie wijzen bepaald, namelijk volgens LEVENE en ROLF (1922), volgens TWITCHELL (1921, gewijzigd volgens HILDITCH, PRIESTMAN, 1931) en volgens BERTRAM (1927). De uitkomsten waren resp. 6,2%, 11,0% en 15,2% van de totale hoeveelheid vetzuur. Alleen de laatste uitkomst is volgens de auteurs betrouwbaar. Door middel van gefractioneerde destillatie der aethylesters vonden zij in de verzadigde vetzuren 60% palmitinezuur, 20% stearinezuur en 20% hogere vetzuren.

De "onverzadigde" vetzuren, verkregen volgens LEVENE en ROLF (1922) uit de glyceride-vetzuren van kropaar, werden eveneens nader geanalyseerd; hierin werden gevonden: α-linoleenzuur, α-linolzuur, β-linoleenzuur, β-linolzuur en een aantal verzadigde vetzuren.

In tabel 5 zijn de cijfers van de gehele analyse der vetzuren opgenomen, evenals die van de onvolledige analyses van een tweede monster kropaar en een monster Engels raaigras (*Lolium perenne*).

TABEL 5. Samenstelling van de vetzuren uit gras volgens SMITH en CHIBNALL (1932a)

Vetzuur	Vetzuur in % van totaal vetzuur		
	Dactylus glomerata	*Dactylus glomerata*	*Lolium perenne*
Verzadigde vetzuren (TWITCHELL)	11,1	10,6	11,9
Verzadigde vetzuren (BERTRAM)	15	–	16,8
Oliezuur	–	–	<1
α–Linolzuur	29,5	–	–
α-Linoleenzuur	16	19,5	16,6
β-Linolzuur	16	–	–
β-Linoleenzuur	6	–	–
Totaal bepaald	82,5*	–	–
Totaal in % van droge stof gras	2,2	2,3	1,7
J-getal der vetzuren	170	185	175

* 17,5% verlies door onbekende oorzaak

BROUWER en VAN ALBADA (1943) vonden met CHIBNALL's werkwijze (enigszins gewijzigd) voor de vetzuren uit vers gras een J-getal tussen 185 en 189, voor die uit hooi was dit 97–116. Met een vereenvoudigde werkwijze, eveneens berustende op aetherextractie van het gedroogde materiaal, vonden zij in vers gras 1,29–2,41% vetzuren berekend op de droge stof. Het J-getal lag tussen 177 en 192

en het equivalentgewicht (eqgew.) tussen 277 en 290. Voor hooi waren de uitkomsten resp. 0,65–0,93%, 125–145 en 278–314, voor rode klaver resp. 2,20–2,26%, 195–203 en 282–286. Het bleek echter (BROUWER, 1944), dat door koken met alkoholische loog na de aetherextractie nog meer vetzuren uit het gedroogde gras konden worden vrijgemaakt. Hierbij gaf aetherextractie 1,40–1,44% vetzuur met J-getal 163–187 en eqgew. 267–296; de loogextractie gaf daarna nog 0,95–1,31% vetzuur met J-getal 144–160 en eqgew. 271–300. Voor de beide bewerkingen tezamen was dit 2,18–2,75%, J-getal 153–174, eqgew. 269–297.

BROUWER (1944) onderzocht ook de invloed van het groeistadium van het gras op de eigenschappen der vetzuren. De hoeveelheid dezer zuren bleek af te nemen van gemiddeld 3,65% bij ca. 5 cm lang gras omstreeks midden april, tot 1,62% voor uitgegroeid gras omstreeks eind juni. Het J-getal daalde in deze tijd van gemiddeld 194 tot 164; het equivalentgewicht steeg van 285 tot 298.

Gebruik makende van esterfractionering vond SHORLAND (1944) voor de vetzuren van 10 monsters kropaar de in tabel 6 vermelde samenstelling.

TABEL 6. Samenstelling van de vetzuren uit 10 monsters kropaar (*D. glomerata*) volgens SHORLAND (1944)

Verzadigde vetzuren		Onverzadigde vetzuren		
Aantal C-atomen	% van totaal vetzuur	Aantal C-atomen	% van totaal vetzuur	Aantal H-atomen per molecuul voor totale hydrering
14	1,4	14	0,4	2,0
16	11,2	16	6,4	2,0
18	2,6	18	76,5	5,1
>18 als C26	1,5			

Uit de hoeveelheid dihydroxystearinezuur, verkregen na oxydatie van de onverzadigde C_{18}-zuren, volgde, dat slechts 0,6% oliezuur aanwezig was. Uit het aantal H-atomen, dat nodig was voor de volledige verzadiging van de dubbele bindingen van de onverzadigde C_{18}-zuren volgde, dat de verhouding linolzuur–linoleenzuur ongeveer 1:1 bedroeg. SMITH en CHIBNALL (1932a) vonden ongeveer 2:1.

GARTON (1960) vond bij een analyse van de vetzuren uit een monster gemengd weidegras 15,5% verzadigde vetzuren, 3,4% oliezuur, 13,2% linolzuur en 61,3% linoleenzuur. Voorts publiceerden SHORLAND (1953, 1961) en WEENINK (1961) analyses van de vetzuren van bepaalde groepen van lipiden uit gras of klaver.

De tot nu toe beschikbare gegevens over de samenstelling van de vetachtige stoffen uit gras zijn dus vrij onvolledig. Door hun bewerkelijkheid leveren de genoemde bepalingen ook grote moeilijkheden op voor het uitvoeren van serieanalyses.

b. De chromatografie van vetachtige stoffen. Bij de opzet van dit onderzoek hebben wij ons gerealiseerd, dat wij in de eerste plaats moesten zoeken naar een analysemethode, die ons in staat zou stellen de lipiden volledig en zuiver te isoleren. Wij meenden, dat de toepassing van één of meer chromatografische werkwijzen wellicht tot ons doel zou voeren. Deze werkwijze zou de vetachtige stoffen in een aantal groepen van nauw verwante verbindingen moeten scheiden, waar-

door wij de gelegenheid zouden krijgen deze groepen ieder voor zich aan een nader onderzoek te onderwerpen. In de literatuur zijn inderdaad enkele, wellicht geschikte methoden beschreven.

TRAPPE (1940a, 1940b, 1940/41) bepaalde de zogenaamde adsorptiewaarden voor een aantal lipiden in verschillende adsorptiesystemen. Onder adsorptiewaarde verstaat deze auteur de hoeveelheid ener stof in procenten, die in een adsorptiesysteem onder standaardomstandigheden aan het adsorbens is geadsorbeerd. Hierbij bleken zeer kleine verschillen in het vochtgehalte van het adsorbens of kleine verontreinigingen van het oplosmiddel grote invloed uit te oefenen op de adsorptiewaarden. Bij het onderzoek van 28 adsorbentia, 30 oplosmiddelen en 16 lipiden kon, onafhankelijk van adsorbens en lipide, een reeks van oplosmiddelen worden opgesteld met afnemende elutiesterkte; d.w.z. bij een willekeurig adsorbens is een term uit deze reeks in staat een willekeurig lipide beter en sneller te elueren dan een volgende term uit deze reeks. Een verkort overzicht van deze zogenaamde "eluotrope" reeks met de adsorptiewaarden voor enkele adsorptiesystemen is opgenomen in tabel 7.

TABEL 7. Adsorptiewaarden volgens TRAPPE (1940a, b, 1940/41)

Adsorbens	Aluminiumsilicaat			Kiezelzuurhydraat			Al_2O_3 (BROCKMAN)		Kaolin
Opgeloste stof / Eluens	Oliezuur	Cholesterol	Cholesteryl-stearaat	Oliezuur	Trioleine	Cholesteryl-palmitaat	Cholesterol	Cholesteryl-acetaat	Cholesterol
Methanol	0,0	–	–	0,0	–	–	0,0	–	–
Aethanol	32,3	–	–	0,0	0,0	–	4,4	–	–
Aceton	46,8	–	–	0,0	0,0	–	3,8	–	–
Aether	80,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,8	0,0	1,3
Chloroform	88,9	0,0	0,0	69,7	42,8	0,0	24,5	0,0	1,9
Benzeen	98,2	75,7	0,0	88,2	76,5	0,0	95,1	11,2	40,0
Tetrachloorkoolstof	98,8	96,4	21,6	98,6	100,0	74,6	98,0	53,1	82,1
Petroleumaether	100,0	100,0	94,0	100,0	100,0	99,0	100,0	97,9	98,1

TRAPPE zocht daarna een adsorbens, waarbij het mogelijk was achtereenvolgens verschillende groepen van geadsorbeerde stoffen te elueren. Aan deze eis voldeed Al_2O_3 (gestandaardiseerd volgens Brockman). Helaas werden de triglyceriden ten dele verzeept en de vetzuren werden gedeeltelijk geoxydeerd.

Kiezelzuurhydraat (Schering) voldeed in iets mindere mate aan de gestelde eis, wanneer het volledig geactiveerd was. Als het gedeeltelijk gedeactiveerd werd door plaatsing boven 50% NaOH verliep de scheiding beter. Tevens bleek dit adsorbens in beide activiteitsgraden op generlei wijze de geadsorbeerde lipiden aan te tasten. In tabel 8 wordt een overzicht gegeven van deze onderzoekingen.

TISCHER e.a. (1947) gebruikten voor een analyse van *Perilla*-olie Al_2O_3 als adsorbens en benzine (kpt. 50°–70°) als oplosmiddel. Hierbij bleek, evenals bij het hiervoor genoemde onderzoek, dat de vetzuren niet volledig konden worden geëlueerd (wellicht door gedeeltelijke ontleding) en dat de triglyceriden ten dele werden gehydroliseerd. Wel is Al_2O_3 volgens deze auteurs in staat een scheiding tussen mono-, di- en tri-glyceriden te weeg te brengen.

Bij een door SPENGLER en WÖLLNER (1954) verricht onderzoek van 13 verschillende adsorbentia met behulp van modelmengsels bleek, dat vetzuren, wasalkoholen, wasesters en lactonen, opgelost in zwavelkoolstof, volledig en vrijwel

TABEL 8. Chromatografische scheidingen van lipiden in groepen met enkele adsorbentia volgens TRAPPE (1940/41)

Al_2O_3		Kiezelzuurhydraat (actief)		Kiezelzuurhydraat (gedeactiveerd)	
Eluens	Geëlueerde groep	Eluens	Geëlueerde groep	Eluens	Geëlueerde groep
Petroleum-aether	Koolwater-stoffen	Petroleum-aether	Koolwater-stoffen	Petroleum-aether	Koolwater-stoffen
Tetrachloor-koolstof	Sterol-esters	Trichloor-aethyleen	Sterol-esters	Tetrachloor-koolstof	Sterol-esters
Benzeen	Triglyceriden			Benzeen	Triglyceriden
Chloroform	Sterolen	Aether	Triglyceriden		
HCl-aethyl-acetaat	Vetzuren		Sterolen	Aether	Sterolen
			Vetzuren		Vetzuren

reversibel door ontwaterde silicagel werden geadsorbeerd. De koolwaterstoffen werden niet geadsorbeerd en werden voor 98–100% geëlueerd. De geadsorbeerde stoffen konden door amylalkohol–zwavelkoolstof-mengsels worden geëlueerd.

Bij chromatografie over "Aktivkohle" met CS_2 als eluens traden achtereenvolgens uit: koolwaterstoffen (98–100%), wasesters (98–100%) en wasalkoholen (50–70%).

Bij actief Al_2O_3 bleek de wijze van vulling van de adsorptiekolom (welke uiteraard moeilijk reproduceerbaar is) grote invloed uit te oefenen op het verloop der elutie. De koolwaterstoffen werden bij chromatografie over dit adsorbens kwantitatief geëlueerd, doch de wasesters en vetzuren werden afgebroken en waren vrijwel niet te elueren.

Al_2O_3, met water op activiteit III (Woelm) gebracht, gaf goede uitkomsten voor koolwaterstoffen en wasesters (resp. 96 en 100%). Met vetzuren en alkoholen werden ook hier slechte en wisselende uitkomsten verkregen.

"Hostaflon" (polytrifluormonochlooraethyleen) gaf onduidelijke uitkomsten, waarbij opviel, dat wasesters niet werden geëlueerd, vetzuren, wasalkoholen en koolwaterstoffen echter wel.

De auteurs geven tenslotte enkele schema's aan, waarmede een analyse van technische en natuurlijke wassen mogelijk zal zijn, mits de juiste wijze van elueren van de geadsorbeerde stoffen kan worden gevonden. Enkele scheidingen, uitgevoerd met modelmengsels, gaven voor koolwaterstoffen en wasesters vrijwel kwantitatieve opbrengsten, voor de wasalkoholen en de vetzuren waren de uitkomsten echter veel te laag. Zij schreven deze verliezen ten dele toe aan de monsternemingen tijdens de elutie voor de bepaling van de refractie van het eluaat, welke monsternemingen nodig waren om de fracties gescheiden te kunnen opvangen. Voor het grootste deel moeten de verliezen echter worden toegeschreven aan afbraak en irreversibele adsorptie aan de actieve kool, welke bij alle scheidingen werd gebruikt.

Met silicagel als adsorbens konden SPENGLER en HAUF (1955) een scheiding van de lipiden in vijf groepen teweegbrengen door met verschillende elutievloeistoffen na elkaar te elueren. Zij elueerden de koolwaterstoffen met petroleumaether, de wasesters en de ketonen (van elkaar gescheiden) met tetrachloorkoolstof, daarna de wasalkoholen met chloroform en tenslotte de vetzuren met

methanol. Het werken met verschillende eluentia na elkaar heeft volgens deze auteurs enkele bezwaren, en wel *a.* men kan tijdens de proef niet vaststellen wanneer een component uit de kolom treedt, zodat men dit in een voorlopige proef dient te bepalen; *b.* men moet grote hoeveelheden oplosmiddelen afdampen; *c.* eventueel achtergebleven oplosmiddel leidt tot fouten in de gewichtsbepaling.

In verband met deze bezwaren hebben zij verder gewerkt aan een methode met één enkel elutiemiddel, die volgens de auteurs veelbelovend schijnt; zij publiceerden evenwel geen nadere bijzonderheden. Aangezien de vetzuren bij deze methode niet rechtstreeks bepaald konden worden, werd hiervoor een afzonderlijk chromatogram uitgevoerd over een "vorbelegte" silicagel. Hiervoor werd een kolom van ontwaterde silicagel doorstroomd met CS_2 met 1% azijnzuur, totdat de refractie van het eluaat constant bleef. Daarna werd het te onderzoeken mengsel, opgelost in CS_2 met 1% azijnzuur, opgebracht en met hetzelfde oplosmiddel ontwikkeld. Koolwaterstoffen, wasesters, wasalkoholen en lactonen braken gezamenlijk door en werden gevolgd door de zuren, welke hiermede dus afzonderlijk waren gewonnen.

Ook GARTON en DUNCAN (1957) gebruikten silicagel voor de scheiding van lipiden in een aantal groepen. Met petroleumaether, gemengd met toenemende hoeveelheden aether, werd een goede scheiding verkregen. Hierbij werden met 1% aether de sterolesters geëlueerd, met 3% de triglyceriden en met 10% aether de sterolen; tenslotte werden de fosfolipiden uitgedreven met een mengsel van aether en methanol.

c. Beschouwing van de literatuurgegevens. Uit het literatuuroverzicht blijkt, dat de analyse van de vetachtige stoffen uit gras zeker niet eenvoudig is. In de eerste plaats is het isoleren van de vetachtige stoffen moeilijk, slecht reproduceerbaar en zeer tijdrovend. Het aantal analyses, dat in de literatuur wordt vermeld, is dan ook zeer klein. Extractie van het gedroogde en gemalen materiaal met aether schijnt echter goede mogelijkheden te bieden, hoewel er aanwijzingen zijn, dat na behandeling van het geëxtraheerde materiaal met alkoholische loog nog vetzuren kunnen worden geëxtraheerd.

In de tweede plaats is men er niet in geslaagd een snelle en betrouwbare methode te ontwikkelen om het door extractie van gras verkregen mengsel van vetachtige stoffen te analyseren. De een of andere chromatografische methode is hiervoor waarschijnlijk wel het meest geschikt. Ten aanzien van de adsorbentia kan worden opgemerkt, dat Al_2O_3 als adsorbens vermoedelijk ongeschikt is, omdat het chemische veranderingen in de stoffen teweegbrengt en verschillende lipiden irreversibel adsorbeert. Adsorptiekool heeft eveneens de neiging stoffen irreversibel te adsorberen, terwijl "Hostaflon" geen duidelijke scheidingen geeft. Bij silicagel (kiezelzuurhydraat) treedt geen aantasting van de lipiden op, terwijl evenmin irreversibele adsorptie is waargenomen.

Het werken met verschillende adsorbentia na elkaar verdient geen aanbeveling, gezien de verliezen, veroorzaakt door een onregelmatig verloop van de adsorptie in de grenslaag tussen adsorbens en glaswand en de verliezen bij het concentreren en overbrengen van de geëlueerde oplossingen op het volgende adsorbens.

Ook het gebruik van één adsorbens met een reeks ontwikkelvloeistoffen geeft moeilijkheden. De door SPENGLER en HAUF genoemde bezwaren zijn weliswaar reëel, maar kunnen bij zorgvuldig werken worden vermeden. Het bezwaar, dat

men tevoren zou moeten bepalen wanneer een groep componenten doorbreekt, vervalt uiteraard indien de te verrichten analyses betrekking hebben op mengsels van lipiden, die slechts weinig in samenstelling verschillen. Hierbij geschiedt het doorbreken van een groep steeds na het uitstromen van ongeveer dezelfde hoeveelheid elutievloeistof. Wellicht kunnen ook de activiteit van het adsorbens en de elutiemiddelen zodanig worden gekozen, dat één groep componenten door een eluens volledig wordt geëlueerd, terwijl de andere groepen zich in het geheel niet of slechts zeer langzaam door de kolom voortbewegen.

§ 2. Onderzoek van het adsorptiesysteem

Inleiding en doel van het onderzoek. Na beschouwing van de literatuur hebben wij ons onderzoek gericht op de mogelijkheden, welke het gebruik van silicagel als adsorbens met een opeenvolgende reeks van eluentia zou bieden. Bij dit onderzoek zal men rekening moeten houden met de samenstelling van het mengsel van lipiden, dat in gras wordt aangetroffen. Dit mengsel bestaat uit vele componenten en bevat o.a.:

1. koolwaterstoffen, wasesters, wasalkoholen en waszuren (hogere monocarbonzuren $>C_{24}$), afkomstig uit de waslaag op de oppervlakte van bladeren en stengels;
2. vetzuren (monocarbonzuren $<C_{24}$), glyceriden, sterolesters, sterolen, fosfolipiden en galactolipiden;
3. chlorophyllen, carotenoïden, flavonen en in vet oplosbare vitaminen.

Deze opsomming is allerminst volledig, omdat nog vele andere stoffen geheel of gedeeltelijk door aether uit het gras zullen worden opgelost. De mogelijkheid bestaat, dat een deel dezer stoffen een storende invloed zal hebben op het verloop van de chromatografische scheiding.

A. De methodiek der bepalingen

a. Het adsorbens. Bij het onderzoek van het thans in de handel verkrijgbare silicagel bleek geen der beproefde soorten de gewenste eigenschappen te bezitten. Het geringe adsorptievermogen was wel het grootste bezwaar, daar hierdoor de kolommen zeer lang zouden moeten zijn om een goede scheiding te kunnen verkrijgen. De uitkomsten van oriënterende proeven met een door Nijkamp (1951, 1954) in dit laboratorium ontwikkeld, uiterst actief silicagel waren zeer bemoedigend en wij hebben het onderzoek dan ook verder geheel met dit adsorbens verricht.

Het adsorbens wordt volgens Nijkamp (1954) verkregen uit natronwaterglas door hieruit het kiezelzuurhydraat met zoutzuur neer te slaan. Nadat men het gel in verdund zoutzuur heeft laten "rijpen", wordt het eerst met water en daarna met aldehyd-vrije alkohol 96% gewassen. Hierna wordt achtereenvolgens gedroogd bij 80°, 110° en 150 °C. Het aldus verkregen silicagel is zeer fijn verdeeld en heeft een groot adsorptievermogen. Dit adsorbens werd steeds in hoeveelheden van $\pm$ 80 g bereid en in luchtdicht gesloten flessen bewaard.

b. De elutievloeistoffen. Bij de eerste proeven (tabel 10 en 11) werden de elutievloeistoffen na destillatie op Na geplaatst en onmiddellijk vóór het gebruik hiervan afgefiltreerd. Zoals later zal worden beschreven (zie dit hoofdstuk BIIb), verkregen wij hierbij te hoge uitkomsten voor de geëlueerde stoffen. Dit

kon worden voorkomen door de eluentia voor het gebruik nogmaals te destilleren.

1. Petroleumaether. Deze werd achtereenvolgens uitgeschud met verdunde loog, verdund zuur en gedestilleerd water, vervolgens gedroogd en gedestilleerd en daarna op Na geplaatst. Nadat de gasontwikkeling was geëindigd, werd nogmaals gedestilleerd door een korte Vigreux-opzet en de fractie met een kookpunt tussen 42° en 58 °C opgevangen.
2. Tetrachloorkoolstof. Als onder 1. Kpt 76,5 °–77,5 °C.
3. Chloroform. Als onder 1. Kpt 60,5 °–61,5 °C.
4. Benzeen. Als onder 1. Kpt 79,5 °–80,5 °C.
5. Aether. Als onder 1. Kpt 34,0 °–35,0 °C.
6. Absolute alkohol. Deze werd op de gebruikelijke wijze bereid door destillatie over ongebluste kalk.

De onder 1, 2, 4 en 5 genoemde vloeistoffen werden na gebruik op dezelfde wijze opgewerkt. Dit kon slechts een beperkt aantal malen geschieden, omdat na ongeveer vijf maal de blancowaarden bij de proeven begonnen te stijgen.

c. De modelstoffen. Bij onze proeven is gebruik gemaakt van de volgende modelstoffen.

Wassen: cera flava (Ph. Ned. V).
Wasalkoholen: enkele door ons uit cera flava bereide preparaten.
Koolwaterstoffen: paraffinum liquidum.
Sterolesters: cholesterylstearaat, cholesteryloleaat.
Glyceriden: tristearine, tripalmitine, rundvet, reuzel.
Vetzuren: stearinezuur, oliezuur en een mengsel van linol- en linoleenzuur.
Sterolen: cholesterol.

d. Het gereedmaken van de adsorptiekolom. Het adsorbens werd droog in een glazen buis met G2-filterplaatje gebracht (Jena, 6bG2, ⌀ 30 mm) en aangestampt. Teneinde het opwervelen van het adsorbens tegen te gaan werd dit afgedekt met een laagje geprecipiteerd $BaSO_4$ ter dikte van 2 tot 3 mm. Vervolgens werd het eerste eluens (petroleumaether) met behulp van een waterstraalpomp langzaam door het adsorbens gezogen, waarbij het adsorbens doorschijnend werd. Zonodig werd het vacuum enkele malen plotseling verbroken ten einde ingesloten lucht te verwijderen. Zodra het adsorbens gelijkmatig melkachtig doorschijnend was, werd het doorzuigen van het eluens beëindigd op het ogenblik, dat de vloeistofmeniscus nog 2–3 mm boven het $BaSO_4$ stond. De kolom was dan voor gebruik gereed.

e. Het opbrengen van de te onderzoeken stoffen. Het te scheiden mengsel werd in ± 15 ml petroleumaether opgelost (eventueel door verwarmen) en op het adsorbens gebracht, waarna de vloeistof weer werd doorgezogen, totdat de meniscus juist het deklaagje bereikte. Het gebruikte glaswerk en de wand van de buis boven het adsorbens werden twee maal gewassen met ± 5 ml petroleumaether en de vloeistof werd weer doorgezogen.

f. Het elueren. Bij het opbrengen stroomde al ca. 25 ml elutievloeistof uit, die werden opgevangen in een platbodemkolfje van 50 ml. Deze hoeveelheid vloeistof werd beschouwd als het eerste eluaat. De verdere eluering geschiedde door telkenmale 25 ml eluens door te zuigen met een snelheid van ongeveer 25 ml per 15 minuten en afzonderlijk op te vangen. In het algemeen werd het elueren voortgezet totdat het residu in 25 ml eluaat minder dan 1 mg bedroeg, waarna werd overgegaan op het volgende eluens.

De gekleurde stoffen waren als banden in het adsorbens zichtbaar, doch ook

de kleurloze stoffen waren veelal als meer of minder doorschijnende banden te zien. Bij de overgang van het ene eluens op het andere was het grensvlak tussen de beide vloeistoffen op de kolom zichtbaar, doordat de mate van doorschijnendheid van de kolom afhankelijk was van de vloeistof, die zich tussen de deeltjes van het adsorbens bevond. Hierdoor konden wij opmerken, dat de geadsorbeerde stof, welke door het nieuwe eluens werd uitgedreven, zich veelal vlak vóór of in het grensvlak tussen de beide eluentia voortbewoog. Dit kan er op wijzen, dat deze chromatografie, althans voor een deel van de componenten van het te onderzoeken mengsel, meer het karakter had van een verdringingsanalyse dan van een elutieanalyse.

g. De verdere bewerking van de eluaten. De eluaten werden op het waterbad van het elutiemiddel bevrijd, waarna gedurende enkele minuten een krachtige luchtstroom over de achtergebleven stof werd geleid. Hierna werd het eluaat gedurende een uur in de droogstoof bij 100 °C nagedroogd en vervolgens gewogen. Bij langer verblijf in de droogstoof nam het gewicht van het eluaat weer toe.

h. Bepaling van het aantal milliequivalenten zuur, het zuurgetal en het equivalentgewicht. Aan een kolfje met eluaat werd 10 ml geneutraliseerde alkohol (96%) toegevoegd, welke 3 druppels phenolphtaleineoplossing (1%) bevatte. Het eluaat werd door koken opgelost en vervolgens getitreerd met 0,1 n NaOH. Uit de verkregen uitkomsten werden het aantal meq zuur, het zuurgetal en het eqgew. van het eluaat berekend.

j. Bepaling van het aantal dubbele bindingen in meq uitgedrukt en het jood-additiegetal. In beginsel werd hiervoor de methode van WIJS gevolgd, zoals die omschreven is in het NORMBLAD N1046–50 (1950). Deze methode werd op twee punten gewijzigd: de hoeveelheden van de reagentia werden aangepast aan de hoeveelheden eluaat en voorts werd afgezien van het gebruik van gesloten kolfjes bij de bepaling.

Met de methode volgens het normblad vonden wij voor het J-getal van een monster oliezuur 81,15 $\pm$ 0,19. Met onze methode (1/5 der hoeveelheden reagentia) vonden wij 80,40 $\pm$ 0,79 voor hoeveelheden oliezuur tussen 5 en 60 mg. Bij de kleinste hoeveelheden oliezuur bedroeg de afwijking van het gemiddelde ca. 5%, welke spreiding vooral veroorzaakt werd door de invloed van de weegfouten. De berekening van het aantal meq dubbele bindingen, aanwezig in een eluaat, zal aanzienlijk nauwkeuriger kunnen geschieden, daar hiervoor het gewicht niet wordt gebruikt.

B. De chromatografie van lipiden

I. De chromatografie van wasachtige stoffen

a. Inleiding. Zoals in de inleiding van deze paragraaf is gezegd, bestaat de oppervlaktelaag van de bladeren en stengels van gras voor een groot deel uit wasachtige stoffen. Ten einde een geschikte analysemethode te kunnen ontwikkelen, is het dus noodzakelijk onder andere echte wassen en wasalkoholen in het onderzoek te betrekken. Aangezien de literatuur omtrent de chromatografie van wassen minder uitvoerig was dan die betreffende de andere vetachtige stoffen, hebben wij eerst enkele oriënterende proeven met wasachtige stoffen verricht.

b. De chromatografie van wassen. Van de modelstof *cera flava* werden twee chromatogrammen gemaakt. De uitkomsten van deze chromatogrammen zijn verzameld in tabel 9.

Na de elutie werd het zuurgetal van elk der eluaten bepaald, waarna de inhoud van de kolfjes onder het doorleiden van stikstof werd drooggedampt. Vervolgens werden aan ieder kolfje 2 ml benzeen en 2 ml 0,5 n alkoholische KOH toegevoegd en daarna werd de inhoud gedurende 1 uur verzeept op het kokende waterbad. Het estergetal werd berekend uit het aantal meq loog, dat bij deze verzeping werd verbruikt.

Het bleek ons, dat de zuren voor ruim 90% door benzeen werden geëlueerd, maar dat de esters zich in alle eluaten bevonden. Voor *cera flava* wordt aangegeven, dat het meestal 12–17% koolwaterstoffen bevat, 12–14% vrij cerotinezuur en verder in hoofdzaak miricylpalmitaat en homologen. Aannemende, dat het vrije vetzuur inderdaad cerotinezuur (molgew. ± 400) is en dat de koolwaterstoffen (15%) geheel door petroleumaether werden geëlueerd, berekenden wij voor het eqgew. van de esters in de achtereenvolgende eluaten 710, 430, 450 en 290. Deze eqgew. komen ongeveer overeen met esters waarvan de formules luiden $C_{48}H_{96}O_2$, $C_{29}H_{58}O_2$, $C_{30}H_{60}O_2$ en $C_{18}H_{36}O_2$. Deze laatste esters zouden eventueel glyceriden van de vetzuren kunnen zijn. Hiermede is dus enigermate aannemelijk gemaakt, dat de esters met de laagste equivalentgewichten het sterkst werden geadsorbeerd.

De uitkomsten van de zuurbepaling en de verzeping zijn in goede overeenstemming met die in de modelstof zelve. Dit bewijst, dat er door het adsorbens geen grote veranderingen in de samenstelling van de was werden gebracht. Er vond geen verzeping plaats en de zuren werden niet irreversibel geadsorbeerd of geoxydeerd. De in totaal geëlueerde hoeveelheid stof bevestigde dit.

c. De chromatografie van wasalkoholen. De wasalkoholen werden verkregen

TABEL 9. De chromatografie van wassen

Eluens	Proef-nummer	Aantal fracties	Eluaat		Vrij zuur			Verzeping		
			mg	%van gewicht	ml loog 0,1 n	zuur-getal	%van meq	ml loog 0,1 n	ester-getal	%van meq
Petroleum-aether	1	7	90,2	45	0,00	0	0	0,86	53	30
	2	7	95,9	47	0,00	0	0	0,91	53	32
Tetrachloor-koolstof	1	6	24,7	12	0,00	0	0	0,60	119	21
	2	6	31,9	16	0,03	11	4	0,68	120	23
Benzeen	1	10	74,6	37	0,73	57	101	1,01	76	35
	2	10	66,9	33	0,64	53	89	0,90	72	31
Aether	1	3	12,2	6	0,05	37	7	0,35	154	12
	2	3	11,0	6	0,05	41	7	0,31	151	11
Totaal	1	26	201,7	100	0,78	23	108	2,82	77	98
	2	26	205,5	101	0,72	22	100	2,80	77	97
Adsorbaat*					0,72	21		2,89	80	

Adsorbens: 6,7 g silicagel; kolom: hoog 75 mm, ⌀ 20 mm; adsorbaat: 202,4 mg cera flava.
* Uitkomsten van de bepalingen rechtstreeks uitgevoerd op het adsorbaat.

door verzeping van *cera flava* en isolering van de "onverzeepbare" stoffen, welke in dit geval in hoofdzaak uit wasalkoholen en koolwaterstoffen bestaan. Na enkele malen omkristalliseren uit aceton werden twee fracties verkregen, namelijk I (smpt. 78°–81 °C) en II (smpt. 68°–70 °C).

Bij deze proeven werd tevens gezocht naar mogelijkheden om het verloop der chromatografie te wijzigen door verandering van de activiteit van het adsorbens of van de gewichtsverhouding adsorbens–adsorbaat. In drie chromatogrammen werd silicagel gebruikt, die met 80% alkohol was bereid in plaats van met 96% alkohol.

Bezien wij de som der gewichten van de eluaten (tabel 10), dan valt op, dat er meer en soms veel meer is geëlueerd dan er was opgebracht (uitgezonderd chromatogram 4 en 5). De oorzaak hiervan werd gevonden in de voorbehandeling van de eluentia, zoals in § 2BIIb zal worden beschreven. In deze serie proeven was deze oorzaak echter nog niet duidelijk geworden. Bij chromatogram 6 werden benzeen en tetra ververst; dit gaf geen verbetering. Bij de chromatogrammen 7 en 8 werd tevoren met aether gewassen silicagel gebruikt. Ook hiermede werd geen vermindering van het te veel geëlueerde materiaal verkregen.

Ten einde te kunnen beoordelen of de chromatografie van de wasalkoholen niettemin met enige nauwkeurigheid kon worden uitgevoerd, hebben wij aangenomen dat de stoffen die te veel werden geëlueerd, gelijkmatig over alle fracties waren verdeeld, hetgeen, gezien de uitkomst van het blanco-chromatogram (tabel 11-1) wel ongeveer juist zal zijn. Wij kunnen dan de som van de eluaten gelijk 100% stellen en zo het aandeel bepalen, dat door iedere elutievloeistof werd geëlueerd.

Bezien wij tabel 10 nader, dan wordt het duidelijk, dat de uitkomsten, verkregen met de silicagel bereid met 80% alkohol, sterk wisselen. De verklaring ligt vermoedelijk in de grove structuur van dit gel, waardoor de vulling van de kolom zeer onregelmatig was. Uit de cijfers van de chromatogrammen 6, 7 en 8 blijkt, dat de uitkomsten met silicagel bereid met 96% alkohol redelijk reproduceerbaar zijn, ondanks grote verschillen in het aantal fracties per elutiemiddel.

II. De chromatografie van enkelvoudige modelstoffen

a. Inleiding. Nadat uit de voorafgaande proeven was gebleken, dat de chromatografie van wassen met silicagel mogelijk was, hebben wij een aantal proeven met modelstoffen uitgevoerd. Wij zullen deze proeven bespreken aan de hand van de zogenaamde elutiegroepen, d.w.z. groepen van stoffen, welke zich chromatografisch vrijwel gelijk gedragen en die onder de gekozen omstandigheden door eenzelfde eluens worden geëlueerd. Wij onderscheiden de volgende elutiegroepen: 1. petroleumaether-groep, 2. tetra-groep, 3. benzeen-groep, 4. aether-groep en 5. absolute alkohol-groep. Onder de stoffen welke voor ons onderzoek van belang zijn, komen er geen voor die pas door absolute alkohol worden geëlueerd. Wij hebben in het inleidende onderzoek de elutie met absolute alkohol dan ook vrijwel steeds achterwege gelaten.

b. Blanco-bepalingen (tabel 11 - 1, 2, 3). Chromatogram 1 werd uitgevoerd onmiddellijk na het laatste chromatogram van de wasalkoholen (tabel 10–8); in alle eluaten werden enkele milligrammen residu aangetroffen. Uit verdampingsproeven met de eluentia werd ons duidelijk, dat dit niet uitsluitend stoffen

TABEL 10. De chromatografie van wasalkoholen uit *cera flava* bereid

Chromatogram	Adsorbens			Was-alkohol		Petroleum-aethereluaat				Tetrachloor-koolstofeluaat				Benzeen-eluaat				Aether-eluaat				Totaal eluaat			
	g	hoogte × doorsnede mm	alkohol d) %	soort	mg	fracties	mg	van opgebrachte stof %	van totaal eluaat %	fracties	mg	van opgebrachte stof %	van totaal eluaat %	fracties	mg	van opgebrachte stof %	van totaal eluaat %	fracties	mg	van opgebrachte stof %	van totaal eluaat %	fracties	mg	van opgebrachte stof %	opmerkingen
1	7,5	65 × 24	96	I	100,8	7	19,0	18,8	18,4	4	−0,3	–	–	9	80,9	80,2	78,3	4	3,7	3,7	3,6	24	103,3	102,4	
2	10,0	68 × 27	80	I	150,3	6	34,3	22,8	18,3	7	18,2	12,2	9,8	16	126,5	84,3	67,7	3	8,2	5,5	4,4	32	187,2	124,6	a)
3	10,0	70 × 27	80	I	151,0	6	22,8	15,1	12,7	6	3,8	2,5	2,1	15	136,5	90,4	75,9	5	16,7	11,1	9,3	32	179,8	119,1	
4	5,0	42 × 24	80	I	150,6	4	19,2	12,8	14,3	3	6,0	2,0	2,2	15	104,4	69,3	77,3	5	8,3	5,5	6,1	27	134,9	89,6	a)
5	3,5	27 × 24	96	I	150,4	4	16,0	10,6	12,4	4	1,1	0,7	0,8	9	83,4	55,5	65,1	6	27,7	18,4	21,6	23	128,2	85,2	
6	4,5	40 × 24	96	II	101,1	5	40,9	40,5	35,9	4	2,4	2,4	2,1	8	55,5	54,9	48,7	4	15,2	15,0	13,3	21	114,0	112,8	b)
7	4,5	35 × 24	96	II	103,6	5	45,2	43,6	41,8	4	1,3	1,3	1,3	8	50,1	48,4	46,4	4	11,4	11,0	10,5	21	108,0	104,3	c)
8	4,5	37 × 24	96	II	102,2	3	44,5	43,6	39,7	3	1,6	1,6	1,5	11	51,8	50,7	46,2	5	14,9	13,9	12,7	22	112,1	109,8	c)

a) wasalkohol in vaste toestand op het adsorbens gebracht
b) voor deze en volgende chromatogrammen werden vers gedestilleerde benzeen en tetrachloorkoolstof gebruikt
c) adsorbens tevoren gewassen met absolute peroxyd-vrije aether en opnieuw gedroogd bij 150°C
d) sterkte van de alkohol waarmede het adsorbens is bereid

TABEL 11. De chromatografie van enkelvoudige stoffen en eenvoudige mengsels

Chromatogram	Adsorbens		Opgebrachte stof		Petroleumaethereluaat					Tetrachloorkoolstofeluaat				
	g	hoogte × doorsnede mm		mg	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	% meq	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	% meq
1	4,5	41 × 24	blanco	0,0	3	3,4				3	3,4			
2	4,5	40 × 24	blanco	0,0	3	0,5				3	0,5			
3	4,5	40 × 24	blanco	0,0	2	0,1				2	0,9			
4	4,5	40 × 24	paraffinum liq.	96,1	4	93,9	97,7			2	0,2	0,2		
5	4,5	44 × 24	paraffinum liq.	107,9	4	102,5	95,0			2	0,5	0,5		
6	4,5	40 × 24	cholesteryloleaat cholesterylstearaat	43,9 59,7	2	1,2	1,2			4	91,5	88,3		
7	4,5	40 × 24	cholesterylstearaat	62,9	2	0,0	0,0			4	62,0	98,6		
8	4,5	48 × 24	cholesterylstearaat	104,6	2	1,4	1,3			4	99,0	94,6		
9	4,5	47 × 24	idem (ex 8)	80,0	2	0,4	0,5			4	78,9	98,6		
10	4,5	40 × 24	cholesteryloleaat	40,4	2	0,7	1,7			4	32,8	81,2		
11	4,5	38 × 24	idem (ex 10 en 10a)	56,4	2	0,5	0,9			4	48,4	86,4		
12	4,5	40 × 24	idem (ex 11)	32,0	2	−0,4	–			4	28,9	90,3		
13	4,5	40 × 24	tristearine tripalmitine	63,0 39,7	2	0,6	0,6			2	1,3	1,3		
14	4,5	46 × 24	tristearine	121,8	2	0,1	0,1			2	0,9	0,7		
15	4,5	47 × 24	idem (ex 14)	75,1	2	0,0	0,0			2	0,1	0,1		
16	20,0	107 × 30	idem	1004,4	6	6,0	0,6			3	1,2	0,1		
17	20,0	106 × 30	idem	1003,1	6	0,1	0,0			5	4,5	0,4		
18	4,5	45 × 24	idem (B1)	145,2	2	2,3	1,6			2	0,6	0,4		
19	4,5	43 × 24	idem (B1)	147,8	2	1,0	0,7			3	3,3	2,2		
20	4,5	43 × 24	rundvet	183,1	2	0,2	0,1			2	−0,5	–		
21	4,5	45 × 24	reuzel	192,1	2	−1,2	–			2	0,0	0,0		
22	4,5	45 × 24	oliezuur	158,6	2	2,5	1,6	0,02	0,3	2	0,0	0,0	0,00	0
23	4,5	45 × 24	stearinezuur	148,7	2	−0,4	–	0,02	0,4	2	−0,3	–	0,02	0
24	4,5	44 × 24	oliezuur	179,6	2	1,8	1,0	0,00	0,0	2	0,6	0,5	0,00	0
25	4,5	44 × 24	linolzuur	129,1	2	0,7	0,5			2	0,2	0,2		
26	4,5	43 × 24	idem	145,9	2	0,4	0,3			2	0,1	0,1		
27	4,5	42 × 24	tristearine (verz.)	87,0	2	7,3	8,4	0,00	0,0	2	0,6	0,7	0,00	0
28	4,5	42 × 24	idem (verz.)	83,9	2	2,4	2,9	0,00	0,0	2	0,8	1,0	0,00	0
29	4,5	47 × 24	cholesterol	115,1	2	0,8	0,7			2	0,4	0,3		
30	7,0	49 × 30	dicarbonzuren tricarbonzuren	272,4	4	4,8	1,8	0,00	0,0	2	2,0	0,7	0,00	0

Verklaring: ex 8: tetraeluaat van chromatogram 8
ex 10 en 10a: verzamelde tetraeluaten van de chromatogrammen 10 en 10a
ex 11: tetraeluaat van chromatogram 11
ex 14: benzeeneluaat van chromatogram 14
B1: tristearine door synthese verkregen
C: chloroform i.p.v. benzeen
A: elutie met alkohol na de aetherelutie

Benzeeneluaat				Aethereluaat					Totaal eluaat					Chromatogram
mg	%	0,1 n loog ml	% meq	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	% meq	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	% meq	
7,6				5	5,3				22	19,7				1
0,9				5	28,5				22	30,4				2
0,3				3	0,4				11	1,7				3
0,8	0,8			3	1,5	1,6			12	96,4	100,3			4
0,7	0,6			3	1,9	1,8			12	105,6	97,9			5
5,3	5,1			3	10,2	9,8			13	108,2	104,4			6
1,5	2,4			3	2,6	4,1			13	66,1	105,1			7
3,5	3,3			3	2,5	2,4			13	106,4	101,7			8
2,0	2,5			3	1,8	2,2			13	83,1	103,9			9
4,9	12,1			3	7,2	17,8			13	45,6	112,9			10
6,7	12,0			3	4,5	8,0			13	60,1	107,3			11
3,6	11,2			3	4,2	13,1			13	36,3	113,4			12
81,4	79,3			5	28,6	27,8			14	111,9	109,0			13
92,1	75,6			4	30,7	25,2			13	123,8	101,6			14
76,7	102,1			4	3,6	4,8			13	80,4	107,1			15
702,6	70,0			5	288,5	28,7			30	998,3	99,3			16
735,3	73,3			5	280,5	27,9			30	1020,1	101,7			17
145,1	99,9			3	0,2	0,1			13	148,2	102,1			18
140,7	95,2			2	0,2	0,1			11	145,0	98,1			19
161,8	88,4			2	6,9	3,8			10	168,7	92,1			20
136,2	70,9			2	47,6	24,8			10	182,6	95,1			**21**
146,7	92,5	5,41	99,0	5	5,5	3,5	0,39	7,1	17	154,7	97,5	5,81	106,6	22
144,8	97,4	4,95	94,5	4	2,9	2,0	0,05	1,0	16	147,0	98,6	5,04	96,2	23
165,3	92,0	5,83	92,4	4	12,3	6,8	0,26	4,1	14	180,0	100,2	6,09	96,5	24
115,4	89,4			4	19,5	15,1			12	135,8	105,2			25
132,9	91,1			4	19,4	13,3			12	152,8	104,7			26
65,7	75,5	2,35	73,7	3	12,9	14,8	0,37	11,6	11	86,5	99,4	2,73	85,6	27
62,5	74,5	2,16	70,3	3	22,3	26,6	0,45	14,7	11	88,0	104,9	2,62	85,2	28
0,5	0,4			5	116,4	101,1			11	118,1	102,6			29
7,5	2,8	0,00	0,0	5	248,2	91,1	35,75	87,0	23	279,1	102,5	37,05	90,1	30
				A4	16,7	6,1	1,30	3,2						

konden zijn, die reeds in de eluentia aanwezig waren. Ten slotte bleek het noodzakelijk de elutievloeistoffen na het drogen op Na nogmaals te destilleren.

Hierna werden de chromatogrammen 2 en 3 gemaakt. Deze gaven bevredigende uitkomsten met uitzondering van het aethereluaat van chromatogram 2, dat niet minder dan 28,5 mg bedroeg. Dit werd echter veroorzaakt door een verontreiniging van de aether tijdens het elueren.

c. Petroleumaethergroep (tabel 11 - 4, 5). Als modelstof voor deze groep gebruikten wij paraffinum liquidum. Zoals uit de uitkomsten blijkt, werd dit koolwaterstofmengsel voor ruim 95% door petroleumaether geëlueerd. De hoeveelheden eluaat in de andere elutiegroepen waren niet groter dan bij de blancochromatogrammen.

d. Tetragroep (tabel 11 - 6 t/m 12). Chromatogram 6 werd uitgevoerd met een mengsel van cholesterylstearaat en cholesteryloleaat (beide van BDH). Hiervan werd door petroleumaether (PAe) vrijwel niets geëlueerd en 88% door tetra. Door benzeen en aether werden resp. nog 5% en 10% geëlueerd. Vermoedelijk bestond het benzeeneluaat uit vetzuren, hoewel dit door de spreiding over vier fracties titrimetrisch niet was aan te tonen. De grootste hoeveelheid residu in één fractie bedroeg nl. slechts 2 mg, hetgeen overeenkomt met 0,05 ml 0,1 n loog, welke hoeveelheid niet aantoonbaar was naast de normale blancotitratie, die schommelde tussen 0,01 en 0,06 ml. In het aethereluaat kon vrij cholesterol worden aangetoond.

Uit de chromatogrammen 7 en 8 met cholesterylstearaat en chromatogram 9 met het tetraeluaat van chromatogram 8 bleek, dat deze stof voor meer dan 95% door tetra werd geëlueerd. De aetherfracties van deze chromatogrammen gaven slechts een zeer zwakke reactie op vrij cholesterol.

Bij chromatogram 10 werd een belangrijke hoeveelheid stof in de benzeen- en aethereluaten aangetroffen. Wanneer men nu de benzeen- en aethereluaten van dit chromatogram (met 40,4 mg cholesteryloleaat) samentelt met de overeenkomstige eluaten van chromatogram 7 (met 62,9 mg cholesterylstearaat) komt men ongeveer uit op de cijfers voor chromatogram 6 (met 43,9 mg cholesteryloleaat en 59,7 mg cholesterylstearaat). De oorzaak van de te grote benzeen- en aethereluaten van chromatogram 6 ligt dus in het gebruikte cholesteryloleaat.

De tetraeluaten van chromatogram 10 en van een overigens mislukt chromatogram, eveneens van cholesteryloleaat (10a), werden gebruikt voor chromatogram 11, waarvan de uitkomst ongeveer overeenkomt met die van chromatogram 10. Hetzelfde kan gezegd worden van chromatogram 12 van het tetraeluaat van het voorafgaande chromatogram. In de aethereluaten van de chromatogrammen 10, 11 en 12 was cholesterol duidelijk aan te tonen. Wij hebben van een verder onderzoek afgezien; maar wij vermoeden, dat een deel van het cholesteryloleaat door het adsorbens werd ontleed, in tegenstelling met cholesterylstearaat. Gezien de geringe hoeveelheid sterolesters, welke in het door ons te onderzoeken materiaal kunnen worden verwacht, zal deze ontleding geen ernstige bezwaren opleveren.

e. Benzeengroep (tabel 11 - 13 t/m 28). Het onderzoek van deze groep valt uiteen in drie delen, namelijk het onderzoek naar de gedragingen 1. van de glyceriden, 2. van de vetzuren en 3. van de verzepingsprodukten der glyceriden.

1. Glyceriden (tabel 11 - 13 t/m 21). Het chromatogram 13 van een mengsel van tristearine en tripalmitine (beide van BDH) gaf een opbrengst van 79% in de benzeeneluaten en 28% in de aethereluaten, zodat ook hier een nader onderzoek noodzakelijk was. Bij chromatogram 14 van tristearine alleen deed zich hetzelfde verschijnsel in ongeveer gelijke mate voor. Bij chromatogram 15 van de verzamelde benzeeneluaten van chromatogram 14, bedroeg de opbrengst in de benzeeneluaten daarentegen 102%; in de andere eluaten was geen verhoging t.o.v. de blancowaarden. Dit wijst er reeds op, dat zuivere tristearine geheel door benzeen geëlueerd wordt, zodat het bovengenoemde aethereluaat van chromatogram 13 en 14 door verontreiniging zou worden veroorzaakt. Om voor verder onderzoek over gezuiverd tristearine te kunnen beschikken, werden de chromatogrammen 16 en 17 gemaakt. De uitkomsten zijn in overeenstemming met elkaar en met de uitkomsten van chromatogram 14.

Bij nader onderzoek van het "tristearine", dat voor deze proeven werd gebruikt, bleek ons, dat het bij verzeping 50 mol% stearinezuur, 35 mol% palmitinezuur en 15 mol% myristinezuur leverde (chromatografisch volgens NIJKAMP, 1954). Voorts bevatte het ongeveer 2% vrij vetzuur en een grote hoeveelheid mono- en di-glyceriden, namelijk ongeveer 15% als diglyceride berekend. Het benzeeneluaat van de chromatogrammen 16 en 17 bevatte minder vrij vetzuur en minder mono- en di-glyceriden, namelijk resp. minder dan 1% en 5%. Deze stoffen waren echter in het aethereluaat in veel grotere hoeveelheden aanwezig, namelijk ca. 9% en 43%. Het gebruikte preparaat was dus zeer onzuiver, waardoor het aanzienlijke aethereluaat van de chromatogrammen 13, 14, 16 en 17 wellicht kan worden verklaard.

Ten einde na te gaan of zuiver tristearine geheel door benzeen zou worden geëlueerd, bereidden wij tristearine uit chromatografisch zuiver stearinezuur. Hiervan bedroeg het verzepingsgetal 189,0, berekend 188,7. De uitkomsten van chromatogram 18 en 19, waarbij resp. 100% en 95% in het benzeeneluaat kwamen, bevestigen, dat het zuivere triglyceride geheel door benzeen werd geëlueerd.

Twee chromatogrammen (20 en 21) van natuurlijke vetten (rundvet en reuzel) gaven ons een indruk van het verloop van de chromatografie van natuurprodukten. De benzeeneluaten bevatten resp. 88% en 71% en de aethereluaten resp. 4% en 25% van de opgebrachte stof. De uitkomst van het chromatogram van reuzel (21) wekt de indruk, dat triglyceriden welke zijn opgebouwd uit onverzadigde vetzuren, sterker werden geadsorbeerd dan triglyceriden opgebouwd uit verzadigde vetzuren; reuzel bevat namelijk veel meer onverzadigde glyceriden dan rundvet. Helaas werden geen J-getalbepalingen uitgevoerd, zodat dit niet kon worden bevestigd.

2. Vetzuren (tabel 11 - 22 t/m 26). Deze chromatogrammen gaven voor alle gebruikte vetzuren een elutie van 89%–97% door benzeen, zowel voor de gewichtshoeveelheid als voor het aantal meq zuur. Bij chromatogram 25 werd chloroform i.p.v. benzeen gebruikt; dit gaf dezelfde uitkomsten als elutie door benzeen. Zowel het gebruikte oliezuur als het linolzuur waren bereid uit natuurlijke oliën; het linolzuur bevatte ook nog vrij veel linoleenzuur en enig oliezuur. De uitkomsten wijzen, evenals bij de triglyceriden, in de richting van een sterkere adsorptie van de onverzadigde vetzuren, welke daardoor niet geheel door benzeen werden geëlueerd en ten dele pas door aether werden uitgewassen (ca. 10%).

3. Verzepingsprodukten van glyceriden (tabel 11 - 27, 28). De chromatogrammen 27 en 28 werden gemaakt van de vetzuren, die werden geïsoleerd na de verzeping van resp. het benzeen- en het aethereluaat van chromatogram 16 betreffende "tristearine". De geringe verhoging van het PAe-eluaat werd veroorzaakt door koolwaterstoffen afkomstig uit het kranenvet, waarmede het oplosmiddel voor de vetzuren tijdens het uitschudden voortdurend in contact kwam. Door benzeen werd zowel aan gewicht als aan aantal meq zuur $\pm$ 75% geëlueerd. Door aether werden echter ook nog aanzienlijke hoeveelheden stof geëlueerd, nl. resp. 15% en 27%. Het percentage meq zuur, dat werd geëlueerd, is hiermede niet in overeenstemming; dit bedroeg resp. 12% en 15%, dus aanzienlijk minder. De reden van deze afwijkende uitkomsten ten opzichte van de chromatogrammen 22 t/m 26 werd ons niet duidelijk, tenzij de afwijkende samenstelling van het "tristearine" ook hier van invloed is geweest.

f. Aethergroep (tabel 11 - 29, 30). Hiervoor diende cholesterol als modelstof. Daar men kan verwachten, dat ook in aether slecht oplosbare stoffen bij de langdurige extracties van het uitgangsmateriaal in de aether kunnen overgaan, hebben wij ook enkele di- en tricarbonzuren in ons onderzoek betrokken, omdat hiervan de meeste invloed op de uitkomsten van de chromatografie kon worden verwacht. Als modelstof voor dit onderzoek gebruikten wij een mengsel van appelzuur, barnsteenzuur, oxaalzuur en citroenzuur.

1. Sterolen (tabel 11 - 29). Uit dit chromatogram bleek, dat cholesterol volledig door aether werd geëlueerd. In de andere eluaten konden wij geen cholesterol aantonen.

2. Di- en tricarbonzuren. Uit chromatogram 30 bleek, dat deze zuren voor het grootste deel door aether werden geëlueerd, namelijk voor 91% volgens het gewicht en voor 87% volgens de zuurtitraties. Door de hierna volgende elutie met absolute alkohol (zie de regel beginnende met A4) werd nog 6% resp. 3% geëlueerd. De totale opbrengst bedroeg 102,5% voor het gewicht en 90% voor de meq. Bij de titraties werden de eluaten niet zoals gewoonlijk opgelost in neutrale alkohol, doch in gedestilleerd water.

g. *Samenvatting der proeven met modelstoffen.* Er werden chromatogrammen van verschillende modelstoffen gemaakt met silicagel als adsorbens, waarbij achtereenvolgens met petroleumaether, tetrachloorkoolstof, benzeen, aether en één enkele maal met absolute alkohol werd geëlueerd.

In overeenstemming met hetgeen de literatuur vermeldt, werden de koolwaterstoffen in het PAe-eluaat aangetroffen, de sterolesters in het tetraeluaat en de sterolen in het aethereluaat.

De uitkomsten voor de mono-carbonzuren zijn, afgezien van die voor de verzepingsprodukten van het onzuivere tristearine, eveneens gunstig. Deze zuren werden in hoofdzaak teruggevonden in het benzeeneluaat. De uitkomsten wijken echter af van die welke in de literatuur zijn beschreven, daar de genoemde zuren bij onze proeven sneller werden geëlueerd dan door anderen werd gevonden (TRAPPE, 1940b; SPENGLER, HAUF, 1955). Voor de bestudering van de vetzuren zullen de di- en tri-carbonzuren geen moeilijkheden opleveren, omdat ze pas door aether werden geëlueerd.

De chromatografie van glyceriden verliep niet geheel naar wens. Het staat echter vast, dat zuiver tristearine geheel door benzeen werd geëlueerd. De gly-

ceriden, die niet door benzeen, doch wel door aether werden geëlueerd, zijn althans ten dele di- en monoglyceriden. Voor de bepaling van de verteerbaarheid van de verschillende vetzuur-bevattende stoffen zou het voordeel bieden, wanneer wij deze afwijkende glyceriden konden scheiden van de sterolen, die eveneens in het aethereluaat komen. Helaas is het ons niet gelukt deze scheiding tot stand te brengen. Voor de bepaling van de invloed van de vetzuren uit het voedsel op de melkvetsamenstelling is het echter niet noodzakelijk de vertering der afzonderlijke stoffen te kennen. Wij kunnen het gehele samenstel van geextraheerde stoffen namelijk hydrolyseren, waardoor de vetzuren vrijkomen. Zoals in hoofdstuk 3 zal worden beschreven is het dan mogelijk de vetzuren te isoleren en nader te onderzoeken.

III. De chromatografie van mengsels van stoffen uit meer dan één elutiegroep

a. Uitvoering. Tabel 12 bevat de uitkomsten van twaalf chromatogrammen van mengsels, waarbij voor elk der samenstellende stoffen, alsmede voor hun som, een afzonderlijke regel is opgenomen. Telkens is het gewicht van de opgebrachte stof aangegeven en voorts zijn de hoeveelheden vermeld, die door de verschillende eluentia werden geëlueerd.

Voor de koolwaterstoffen en de sterolesters volgde de hoeveelheid geëlueerde stof uit het gewicht van resp. het PAe- en het tetraeluaat; in het laatste geval moest een correctie voor vrij vetzuur worden aangebracht. Voor de cholesterolesters kon de juistheid van deze berekeningswijze worden bevestigd, doordat in de overige eluaten geen sterolesters waren aan te tonen. Voor de vetzuren kon het gewicht worden berekend uit de hoeveelheid loog, die nodig was voor de neutralisatie van deze zuren. Het verschil tussen dit gewicht en het totale gewicht van het tetraeluaat werd als sterolester berekend; indien geen sterolester was opgebracht doch wèl triglyceride, werd het verschil als triglyceride berekend. Voor het benzeeneluaat werd dit verschil als triglyceride beschouwd en voor het aethereluaat als cholesterol.

Voor koolwaterstoffen, glyceriden, cholesterol en cholesterolesters werden geen andere kwantitatieve bepalingen uitgevoerd, daar deze, door de verspreiding van deze stoffen over een aantal fracties ternauwernood aanspraak kunnen maken op een groter nauwkeurigheid dan de hiervóór aangegeven wijze van bepaling. Wel werd in alle gevallen de aanwezigheid of afwezigheid van cholesterol of cholesterolesters kwalitatief onderzocht.

b. Bespreking van de uitkomsten. Een mengsel van tristearine en oliezuur (chromatogram 1) werd voor 95% door benzeen geëlueerd. Uit de titratiecijfers volgde, dat van het oliezuur 86% werd teruggevonden en van het tristearine 104%.

Bij verhoging van de activiteit van het silicagel, hetgeen werd bereikt door het gel kort voor het gebruik nog 7 uur op 105°C te verhitten, werd het oliezuur sterker geadsorbeerd, zodat het slechts ten dele door benzeen kon worden geelueerd (chromatogram 2).

De chromatografie van een mengsel van oliezuur en cholesterol leverde ernstige moeilijkheden op, namelijk door wederzijdse beïnvloeding, waardoor een gedeelte van het oliezuur werd vastgehouden en pas door aether werd geelueerd (chromatogram 3). Van het cholesterol werd daarentegen een deel reeds door benzeen geëlueerd. Tevens was de overgang tussen de beide elutie-

TABEL 12. Overzicht van de chromatografie van mengsels van stoffen uit meer dan één elutiegroep

Chromatogram	Adsorbens		Opgebrachte stof		Petroleumaethereluaat					Tetrachloorkoolstofelua			
	g	hoogte × doorsnede mm		mg	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	meq %	fracties	mg	%	0,1 n loog ml
1	4,5	45 × 24	oliezuur	73,6				0,00	0,0				0,00
			tristearine	70,6									
			totaal	144,2	1	0,1	0,1	0,00	0,0	1	0,9	0,6	0,00
2	4,5	36 × 24	oliezuur	81,9				0,00	0,0				0,00
			tristearine	71,9									
			totaal	153,8	1	0,8	0,5	0,00	0,0	1	0,9	0,6	0,00
3	7,0	50 × 30	oliezuur	153,0				0,00	0,0				0,00
			cholesterol	146,3									
			totaal	299,3	4	4,7	1,6	0,00	0,0	3	4,1	1,4	0,00
4	7,0	41 × 30	oliezuur	153,4				0,00	0,0		*20,3*		0,70
			cholesterol	160,6									
			totaal	314,0	3	2,7	0,9	0,00	0,0	4	20,1	6,4	0,70
5	7,0	52 × 30	monocarbonzuren	120,5		*1,8*		0,06	1,5		*36,0*		1,30
			tristearine	55,7		*2,2*	*3,9*				*17,2*	*30,9*	
			di- en tricarbonzuren	123,8									
			totaal	300,0	4	4,0	1,3	0,06		3	53,2	17,7	1,30
6	7,0	53 × 30	monocarbonzuren	105,2				0,00	0,0		*9,6*		0,35
			tristearine	49,3							*0,5*		
			di- en tricarbonzuren	109,3									
			totaal	263,8	4	3,1	1,2	0,00	0,0	3	10,1	3,8	0,35
7	4,5	43 × 24	paraffinum liquidum	47,9		47,9	100,0						
			cholesterylstearaat	40,9							41,2	100,7	
			tristearine	44,1									
			cholesterol	37,6									
			totaal	170,5	4	47,9	28,1			3	41,2	24,1	
8	7,0	39 × 30	paraffinum liquidum	56,3		56,4	100,2						
			cholesterylstearaat	38,5							39,0	101,3	
			tristearine	41,1									
			cholesterol	40,6									
			totaal	176,5	4	56,4	32,0			4	39,0	22,1	
9	15,0	107 × 30	paraffinum liquidum	73,5		76,5	104,1						
			cholesterylstearaat	87,3							90,4	103,6	
			tristearine	73,7									
			oliezuur	88,0				0,00	0,0				0,00
			cholesterol	171,0									
			totaal	493,5	9	76,5	15,5	0,00	0,0	5	90,4	18,3	0,00
10	15,0	92 × 30	paraffinum liquidum	76,0		76,3	100,4						
			cholesterylstearaat	35,1							34,1	97,2	
			tristearine	72,2									
			oliezuur	83,4				0,00	0,0				0,00
			cholesterol	93,8									
			totaal	360,5	6	76,3	21,2	0,00	0,0	4	34,1	9,5	0,00
11	15,0	107 × 30	paraffinum liquidum	113,1		101,5	89,7						
			cholesterylstearaat	16,7							14,3	85,6	
			tristearine	74,6									
			oliezuur	127,6				0,00	0,0				0,00
			cholesterol	83,9									
			totaal	415,9	6	101,5	24,4	0,00	0,0	6	14,3	3,4	0,00
12	15,0	80 × 30	tristearine	173,4									
			oliezuur	176,0				0,00	0,0				0,00
			cholesterol	144,9									
			totaal	494,3	3	–0,3	–	0,00	0,0	2	–2,0	–	0,00

Cursief gedrukte cijfers zijn berekend met behulp van de titratiecijfers en de gemiddelde equivalentgewichten van de gebruikte zuren

a) silicagel 7 uur gedroogd op 150°C; zeer actief

b) silicagel 3 dagen boven 50 % NaOH gedeactiveerd

Benzeneluaat				Aethereluaat					Absolute alkoholeluaat					Totaal eluaat					Chromatogram
mg	%	0,1 n loog ml	meq %	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	meq %	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	meq %	fracties	mg	%	0,1 n loog ml	meq %	
63,4		2,19	86,2				0,00	0,0							*63,5*		2,19	86,2	1
73,4	*104,0*														*73,4*	*104,0*			
136,8	94,9	2,19	86,2	3	3,7	2,6	0,00	0,0						19	141,5	98,1	2,19	86,2	
53,9		1,86	65,9		*19,2*		0,66	23,4							*73,1*		2,52	89,3	2
78,0	*108,6*														*78,0*	*108,6*			a)
131,9	85,8	1,86	65,9	2	23,9	15,5	0,66	23,4						16	157,5	102,4	2,52	89,3	
140,1		4,83	91,4		*11,3*		0,39	7,4							*151,6*		5,23	99,0	3
9,6	*6,6*				*138,6*	*94,7*									*148,2*	*101,3*			
149,7	50,2	4,83	91,4	5	149,9	50,2	0,39	7,4	3	6,4	2,1	0,00	0,0	22	314,8	105,3	5,23	99,0	
121,8		4,20	79,3		*14,8*		0,51	9,6							*156,9*		5,41	102,3	4
114,9	*71,6*				*42,9*	*26,7*									*157,8*	*98,3*			b)
236,7	75,4	4,20	79,3	7	57,7	18,4	0,51	9,6						20	317,2	100,9	5,41	102,3	
76,2		2,75	63,2												*114,0*		4,11	93,1	5
37,8	*67,9*														*57,2*	*98,8*			c)
					115,7	93,5	14,23	74,9		9,1	7,3	0,69	3,7		124,8	100,8	14,92	78,6	
114,0	38,0	2,75		5	115,7	38,0	14,23		4	9,1	3,0	0,69		22	296,0	98,7	19,03		
86,6		3,15	82,3												*96,2*		3,50	91,5	6
49,5	*100,5*														*49,5*	*100,5*			
					108,3	99,1	12,98	87,7		9,2	8,4	0,43	2,9		117,5	107,4	13,41	90,5	
136,1	51,6	3,15		5	108,3	41,0	12,98		4	9,2	3,5	0,43		23	266,8	101,1	16,91		
															47,9	100,0			7
															41,2	100,7			
60,5	137,2														60,5	137,2			
					29,4	78,2									29,4	78,2			
60,5	35,5			3	29,4	17,2								13	179,0	105,0			
															56,4	100,2			8
															39,0	101,3			
56,6	133,7														56,6	133,7			
					31,2	76,8									31,2	76,8			
56,6	32,1			4	31,2	17,7								17	183,2	103,8			
															76,5	104,1			9
															90,4	103,6			
79,3	*107,6*														*79,3*	*107,6*			
50,1		1,72	56,9		*32,3*		1,11	36,7							*82,4*		2,83	93,6	
					154,4	*90,2*									*154,4*	*90,2*			
129,4	26,2	1,72	56,9	6	186,7	37,8	1,11	36,7						29	483,0	97,2	2,83	93,6	
															76,3	100,4			10
															34,1	97,2			
77,6	*107,5*														*77,6*	*107,5*			
15,1		0,52	18,1		*64,4*		2,22	77,1							*79,5*		2,74	95,3	d)
					93,2	*99,4*									*93,2*	*99,4*			
92,7	25,7	0,52	18,1	4	157,6	43,7	2,22	77,1						20	360,7	100,1	2,74	95,3	
															101,5	89,7			11
															14,3	85,6			
76,0	101,9														76,0	101,9			e)
		0,00	0,0		*118,9*		4,10	93,2							*118,9*		4,10	93,2	
					82,5	*98,3*									*82,5*	*98,3*			
76,0	18,3	0,00	0,0	5	201,4	48,4	4,10	93,2						22	393,2	94,6	4,10	93,2	
163,9	*94,5*														*163,9*	*94,5*			12
123,8		4,27	70,3		*40,0*		1,38	22,7							*163,8*		5,65	93,1	
					152,9	*105,5*									*152,9*	*105,5*			
287,7		4,27	70,3	9	192,9		1,38	22,7						25	478,9	96,9	5,65	93,1	

silicagel 10 dagen boven 50 % NaOH gedeactiveerd
silicagel 2 uur gedroogd op 150°C; iets actiever dan normaal bereide silicagel
silicagel 4 uur gedroogd op 150°C; actiever dan normale silicagel

toppen zeer onduidelijk. Door deactivering van het silicagel gedurende drie dagen boven 50% NaOH werd geen verbetering verkregen (chromatogram 4).

Uit de uitkomsten der chromatogrammen 5 en 6 met monocarbonzuren, tristearine, di- en tricarbonzuren bleek de sterke invloed van de activiteit van het adsorbens op het verloop van de chromatografie. De opgebrachte stoffen werden eerder geëlueerd uit het gedeactiveerde silicagel dan uit het op normale wijze bereide gel. Uit het feit, dat bij ouder gel het oliezuur voor een groter deel door benzeen werd geëlueerd, bleek, dat de activiteit van het normale gel tijdens de bewaring terugloopt (vergelijk chromatogram 9 met vers bereid silicagel en 3 met wat ouder gel). De scheiding tussen de vetzuren en de di- en tricarbonzuren was zeer goed. De percentages van de opgebrachte stoffen die werden teruggevonden, zijn alleszins redelijk.

Bij de bewerking van de chromatogrammen 7 en 8 werden de koolwaterstoffen en cholesterolesters voor 100% door resp. PAe en tetra geëlueerd. In het PAe-eluaat en het benzeeneluaat konden geen sterolesters worden aangetoond. Cholesterol werd door de aanwezigheid van de andere stoffen reeds ten dele in de laatste twee benzeenfracties geëlueerd, zoals door kwalitatieve reacties kon worden aangetoond. De opbrengst van de gehele elutie bedroeg resp. 105% en 104%.

De chromatogrammen 9, 10 en 11 gaven hetzelfde beeld als de vorige. Koolwaterstoffen en cholesterylstearaat werden goed gescheiden; maar cholesterol, tristearine en oliezuur werden ten dele gemengd geëlueerd. Voor chromatogram 9 werd vers bereid silicagel gebruikt, waarvan de activiteit vrij groot was. Verdere verhoging van de activiteit (chromatogram 10 en 11) had tot gevolg, dat zowel cholesterol als oliezuur steeds sterker werden geadsorbeerd. In chromatogram 9 kon in de laatste twee benzeenfracties cholesterol worden aangetoond; in de chromatogrammen 10 en 11 waren deze fracties vrij van cholesterol. In chromatogram 11, waarvoor het silicagel sterk geactiveerd was, werd tristearine geheel vrij van cholesterol en oliezuur verkregen en werden de beide laatste stoffen, met elkaar gemengd, door aether geëlueerd. Bij dit actieve silicagel trad echter ook irreversibele adsorptie op, zoals o.a. blijkt uit de verlaging van het percentage geëlueerde koolwaterstoffen en cholesterylstearaat en voorts uit het lage totaalgewicht van de eluaten (95%).

Chromatogram 12 (tristearine, oliezuur, cholesterol) werd gemaakt met hetzelfde gel als dat van chromatogram 9, echter ongeveer een week later. Hierdoor was de activiteit enigszins teruggelopen. Het oliezuur werd weer iets meer door benzeen geëlueerd; maar er was nog geen cholesterol in het benzeeneluaat aan te tonen; geheel bevredigend was de scheiding echter ook hier nog niet.

De percentages oliezuur, die volgens de berekening uit de titratiecijfers werden teruggevonden, blijken gemiddeld 90% te bedragen. Toch werd bij de chromatografie van enkel oliezuur (tabel 11 - 22, 24) de opgebrachte hoeveelheid vrijwel geheel teruggevonden (98% en 100%). Het verschil tussen deze uitkomsten wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de aftrek van de gemiddelde waarde (0,03 ml 0,1 n loog) van de blancotitraties. Deze aftrek is vermoedelijk te groot voor die titraties waarbij werkelijk vetzuren aanwezig zijn, omdat hierdoor de CO_2-opname in de vloeistof wordt verminderd. Dit verklaart dus waarom de titratie vrijwel steeds een opbrengst van minder dan 100% aangeeft. De berekende hoeveelheden oliezuur moeten dan ook als minimumwaarden worden beschouwd.

Proeven met meervoudig onverzadigde zuren werden niet uitgevoerd daar wij

niet over zuivere stoffen konden beschikken. Het valt te verwachten, dat deze zuren nog sterker zullen worden vastgehouden dan het oliezuur, zodat men hiermede terdege rekening zal moeten houden (zie ook tabel 11 - 25, 26).

IV. Chromatografie van grasextract met toegevoegde modelstoffen (tabel 13)

Bij de chromatogrammen 1 t/m 10 werd steeds hetzelfde grasextract gebruikt, dat was verkregen door aetherextractie van vers gras, gedroogd bij 105°C. Na 36 uur extraheren was de aanvankelijk diepgroene vloeistof, die uit het extractievat afliep, kleurloos. Bij deze extractie werden geen voorzorgsmaatregelen genomen tegen de oxydatie van de onverzadigde verbindingen door luchtzuurstof.

De chromatogrammen 1 en 2 van grasextract gaven redelijk overeenstemmende uitkomsten. De PAe- en benzeeneluaten waren kleurloos, het tetra-eluaat was lichtgeel (caroteen) en de aether- en alkohol-eluaten waren donkergroen.

De berekening van de chromatogrammen 3 tot en met 10 is geschied in de veronderstelling, dat de toegevoegde stof slechts door één elutiemiddel werd geëlueerd. Slechts cholesterol vormde hierop een uitzondering; hierbij is aangenomen, dat het zowel door benzeen als door aether werd geëlueerd. Op grond van deze veronderstelling is het mogelijk uit de chromatogrammen 1 tot en met 10 een gemiddelde te berekenen van het percentage grasextract, dat door elk der vijf eluentia werd geëlueerd. Voor PAe bedroeg dit 0,6% (gemiddelde van alle chromatogrammen, uitgezonderd 3 en 4), voor tetra 1,3% (uitgezonderd 5 en 6), voor benzeen 7,0% (uitgezonderd 7, 8, 9 en 10), voor aether 21,4% (uitgezonderd 9 en 10) en voor alkohol 47,6% (over alle chromatogrammen). Deze gemiddelden werden gebruikt om, wanneer een stof uit een elutiegroep was toegevoegd, voor het betrokken eluens de hoeveelheid eluaat afkomstig van het grasextract te berekenen. Het verschil tussen deze hoeveelheid en de totale hoeveelheid eluaat werd dan beschouwd als toegevoegde stof. Voor cholesterol strekte deze berekening zich uit over het benzeen- en het aethereluaat. De aldus verkregen cijfers zijn in tabel 13 cursief gedrukt.

De uitkomsten zijn zeer hoopgevend; wij vonden namelijk gemiddeld van de koolwaterstoffen 94%, van de sterolesters 105%, van tristearine 93% en van cholesterol 100% terug.

Voor cholesterol herhaalden wij de proef met een ander grasextract (chromatogrammen 11, 12 en 13). Van de blancobepaling 12 ging helaas het aethereluaat verloren, zodat hiervoor geen gemiddelde kon worden berekend; de uitkomsten voor de andere eluaten kloppen echter zeer goed. Het percentage teruggevonden cholesterol is in redelijke overeenstemming met de chromatogrammen 9 en 10.

Van het opgebrachte grasextract werd gemiddeld slechts 78% teruggevonden. Op de kolom bleven o.a. gekleurde stoffen achter, die bij voortzetting van de elutie met alkohol-water- en water-azijnzuur-mengsels konden worden geëlueerd. De hierdoor verkregen hoeveelheden eluaat bedroegen ongeveer 15%. De elutie was echter moeilijk uitvoerbaar en in het geheel niet reproduceerbaar. Voorts trad er van niet nader gedefiniëerde stoffen ongetwijfeld irreversibele adsorptie op. Zo werd het adsorbens, dat eerst diepgroen was, door elutie met 50% azijnzuur-water diepblauw gekleurd. Wij hebben van een verder onderzoek naar deze stoffen afgezien, omdat het hier zeer waarschijnlijk gaat om niet-vetachtige stoffen.

TABEL 13. De chromatografie van grasextract met toegevoegde stoffen

Chromatogram	Adsorbens		Opgebrachte stof		Petroleum-aethereluaat		
	g	hoogte × doorsnede mm		mg	fracties	mg	
1	4,5	47 × 24	grasextract	157,1	2	1,0	(
2	4,5	46 × 24	idem	160,3	2	0,4	(
3	4,5	48 × 24	idem	129,5		*0,8*	(
			paraffinum liq.	47,4		*44,7*	9
			totaal	176,9	4	45,5	
4	4,5	44 × 24	grasextract	168,1		*1,0*	(
			paraffinum liq.	49,9		*46,6*	9
			totaal	218,0	4	47,6	
5	4,5	47 × 24	grasextract	153,8		0,7	(
			cholesterylstearaat	41,4			
			totaal	195,2	2	0,7	
6	4,5	42 × 24	grasextract	155,4		2,2	1
			cholesterylstearaat	49,3			
			totaal	204,7	2	2,2	
7	4,5	46 × 24	grasextract	157,9		1,0	(
			tristearine	53,4			
			totaal	211,3	2	1,0	
8	4,5	44 × 24	grasextract	149,2		0,5	(
			tristearine	55,6			
			totaal	204,8	2	0,5	
9	4,5	47 × 24	grasextract	155,7		1,3	(
			cholesterol	51,3			
			totaal	207,0	2	1,3	
10	4,5	45 × 24	grasextract	168,6		0,7	(
			cholesterol	54,7			
			totaal	223,3	2	0,7	
			gemiddeld grasextract				(
			standaard afw. ±				0,
11	4,5	43 × 24	grasextract	253,9	2	–0,3	
12	4,5	45 × 24	grasextract	259,8	2	2,5	(
13	4,5	44 × 24	grasextract	133,1		1,7	1
			cholesterol	39,3			
			totaal	172,4	2	1,7	

Voor de betekenis van de gecursiveerde getallen zij naar de tekst verwezen. De vet gedrukte getallen geven het gewicht e percentage van de geëlueerde stoffen, welke van het gras afkomstig zijn. Het gewicht werd verkregen door het gewicht va gehele eluaat te verminderen met het berekende gewicht der teruggevonden toegevoegde stof. Het percentage geeft het dee dat dit gewicht uitmaakt van de opgebrachte hoeveelheid grasextract.

Tetrachloor-koolstofeluaat		Benzeen-eluaat			Aether-eluaat			Absolute alkoholeluaat			Totaal eluaat			Chromatogram
mg	%	fracties	mg	%	fracties	mg	%	fracties	mg	%	fracties	mg	%	
1,1	0,7	4	10,8	6,9	3	37,9	24,1	2	80,5	51,2	13	131,3	83,6	1
1,8	1,1	4	9,5	5,9	3	29,9	18,7	3	77,5	48,3	14	119,1	74,3	2
0,7	0,5		8,1	6,3		26,2	20,2		52,5	40,5		**88,3**	**68,2**	3
												44,7	*94,3*	
0,7		4	8,1		4	26,2		3	52,5		17	133,0		
4,3	2,6		14,2	8,4		41,6	24,7		85,0	50,6		**146,1**	**86,9**	4
												46,6	*93,4*	
4,3		4	14,2		4	41,6		3	85,0		17	192,7		
2,0	*1,3*		9,6	6,2		30,7	20,0		74,2	48,2		**117,2**	**76,2**	5
42,0	*101,4*											*42,0*	*101,4*	
44,0		4	9,6		4	30,7		2	74,2		16	159,2		
2,0	*1,3*		12,9	8,3		40,0	25,7		77,9	50,1		**135,0**	**86,9**	6
54,1	*109,7*											*54,1*	*109,7*	
56,1		4	12,9		4	40,0		3	77,9		17	189,1		
2,1	1,3		*11,1*	*7,0*		29,1	18,4		78,0	49,4		**121,3**	**76,8**	7
			50,3	*94,2*								*50,3*	*94,2*	
2,1		6	61,4		4	29,1		3	78,0		17	171,6		
1,7	1,1		*10,4*	*7,0*		28,6	19,2		65,7	44,0		**106,9**	**71,6**	8
			51,2	*92,1*								*51,2*	*92,1*	
1,7		6	61,2		4	28,6		3	65,7		17	158,1		
2,7	1,7		*10,9*	*7,0*		*33,3*	*21,4*		69,6	44,7		**123,2**	**79,1**	9
			5,4	*10,5*		*44,0*	*85,8*					*49,4*	*96,1*	
2,7		4	16,3		4	77,3		3	69,6		15	167,2		
1,8	1,1		*11,8*	*7,0*		*36,1*	*21,4*		82,2	48,8		**134,6**	**79,9**	10
			2,0	*3,7*		*55,3*	*101,1*					*57,3*	*104,8*	
1,8		4	13,8		4	91,4		3	82,2		15	189,9		
	1,3			7,0			21,4			47,6			78,5	
	0,23			0,57			1,04			1,08			2,07	
6,6	2,3	5	35,2	13,8	2	17,4	6,8	4	120,3	46,9	15	179,2	69,8	11
8,1	3,1	4	35,7	13,7	5	–	–	3	114,9	44,2	–	–	–	12
3,1	2,3		*18,2*	*13,7*		*9,0*	*6,8*		54,9	40,4		**89,8**	**67,4**	13
			2,8	*7,1*		*33,9*	*86,3*					*36,7*	*93,4*	
3,1		4	21,0		4	42,9		3	54,9		15	123,6		

Bij de hiervóór besproken proeven is ons voorts gebleken, dat het niet eenvoudig is een homogeen monster van een grasextract te verkrijgen. Dit werd veroorzaakt doordat een deel van het extract zich tot een taaie massa verenigde, terwijl de rest een zalfachtige consistentie had. Zoals in het volgende hoofdstuk zal worden beschreven, kan deze moeilijkheid wel worden voorkomen.

V. De chromatografie van gras- en mestextracten

a. Inleiding. Alvorens kon worden overgegaan tot de toepassing van de uitgewerkte analysemethode bij een verteringsproef, werden nog enkele proeven uitgevoerd met gras- en mestextracten, verkregen door extractie van het gedroogde materiaal met aether (zie IV). De punten, waarnaar een onderzoek werd ingesteld, hadden betrekking op de mogelijkheid het extract na verzeping te chromatograferen en op de meest geschikte verhouding van adsorbens tot adsorbaat.

b. Chromatografie na verzeping van het grasextract. Een afgewogen hoeveelheid van het grasextract A werd gedurende 1 uur op het kokende waterbad verzeept met 5 ml 0,5 n alkoholische KOH-oplossing. Hierna werden achtereenvolgens 2 ml H_2SO_4 10% en 2 ml warm gedestilleerd water toegevoegd, waarna met kleine porties PAe werd uitgeschud, totdat deze kleurloos bleef (ca. 10 maal). Na afdampen van de PAe werden de verzepingsprodukten op de in § 2A beschreven wijze gechromatografeerd. In tabel 14 wordt een overzicht gegeven van de uitgevoerde proeven (1, 2, 3). Bij de proeven 1 en 2 werden alle kolfjes getitreerd met 0,1 n loog en met thymolblauw als indicator.

Uit de uitkomsten blijkt, dat de hoeveelheid verzepingsprodukten, uitgedrukt in procenten van het grasextract A, nogal wisselde. Bezien wij echter de percentages eluaat in de verschillende elutiegroepen, berekend op de opgebrachte verzepingsprodukten, dan blijkt dat deze vrij goed overeenstemmen. De chromatografie zelve geeft dus goede uitkomsten; de grootste fouten worden blijkbaar gemaakt bij het verzepen en bij het uitschudden van de verzepingsprodukten.

c. De verhouding van adsorbens tot adsorbaat. De invloed van de verhouding adsorbens-adsorbaat werd onderzocht in de proeven 4, 5 en 6 met het niet verzeepte grasextract B1G. Uit de cijfers blijkt, dat de chromatogrammen 5 en 6 vrijwel gelijke uitkomsten gaven, hetgeen voor de hand ligt, aangezien de verhouding adsorbens-adsorbaat bij beide ongeveer gelijk was. De invloed van de blancowaarden deed zich dus bij $\pm$ 0,36 g adsorbaat (proef 6) nog niet sterk gelden. Bij 0,18 g adsorbaat (proef 4) is deze invloed echter wèl merkbaar, voornamelijk in het aethereluaat, dat bij deze proef iets verhoogd was.

Vervolgens werden nog twee chromatogrammen gemaakt van een ander niet verzeept grasextract (extract 1422, proef 7 en 8) met ongeveer dezelfde verhouding adsorbens-adsorbaat als bij chromatogram 6 werd gebruikt. De uitkomsten zijn redelijk met elkaar in overeenstemming, uitgezonderd die voor het PAe-eluaat (kranenvet?).

d. Chromatografie van mestextract. Twee chromatogrammen van een onverzeept extract van gedroogde verse mest (9, 10) en twee chromatogrammen van

de verzepingsprodukten van dit extract (11, 12) gaven overeenstemmende uitkomsten. Ook hier biedt de chromatografie dus goede mogelijkheden.

C. Overzicht der verkregen uitkomsten

Mengsels van vetachtige stoffen werden geadsorbeerd aan silicagel en achtereenvolgens geëlueerd met enige eluentia. In het algemeen verliep de elutie als volgt: petroleumaether elueert de koolwaterstoffen, vervolgens tetrachloorkoolstof de sterolesters. Daarna worden door benzeen de glyceriden en de vetzuren geëlueerd, waarna de sterolen en een groot deel van de di- en tri-carbonzuren door aether worden uitgewassen. Ten slotte kan de rest van de di- en tricarbonzuren door absolute alkohol van het adsorbens worden verwijderd.

Op deze wijze gelukte het de scheiding van koolwaterstoffen en sterolesters naar wens uit te voeren. De scheiding van de andere bestanddelen leverde echter moeilijkheden op. Hoewel de glyceriden en vetzuren meestal door benzeen werden geëlueerd, kon het voorkomen dat een deel der onverzadigde vetzuren en glyceriden, met kleurstoffen gemengd, pas door aether werden geëlueerd. Deze tendens werd nog versterkt door de aanwezigheid van cholesterol, dat zelf in hoofdzaak eveneens door aether geëlueerd wordt. Daar wij slechts rekening behoeven te houden met zeer geringe hoeveelheden sterolen, zal het remmend effect van deze stoffen bij de chromatografie van grasextracten echter van weinig belang zijn. Omgekeerd kan cholesterol reeds ten dele door benzeen geëlueerd worden, wanneer veel stoffen uit de benzeengroep aanwezig zijn. Dit geval zal zich dus meestal voordoen bij het onderzoek van gras- en mestextracten.

De chromatogrammen met "normaal" silicagel, bereid volgens de methode van NIJKAMP, gaven betere uitkomsten dan die, waarbij het gel was geactiveerd door verhitting op 150°C of waarbij het was gedeactiveerd door bewaring boven NaOH 50%.

Vergroting van de activiteit van het silicagel geeft een goede scheiding van de verschillende vetachtige stoffen, doch er treedt hierbij irreversibele adsorptie op. Tevens is het een groot bezwaar, dat de vetzuren niet meer door benzeen, doch eerst door aether worden geëlueerd, tezamen met kleurstoffen en zure afbraakprodukten dezer kleurstoffen, die in het grasextract aanwezig zijn.

Het gebruik van de "normale" silicagel verdient dus de voorkeur. Het bleek echter, dat de activiteit van deze "normale" silicagel, zoals het door ons bereid werd (zie § 2Aa), na de bereiding nog iets te groot was. Daarom hebben wij voor de verdere proeven een grote hoeveelheid gel bereid en dit na één dag bewaren boven NaOH 50% in kleine porties in luchtdicht afgesloten flesjes bewaard, totdat het gebruikt werd. Hierdoor werd bereikt, dat oliezuur voor 90% (titrimetrisch) door benzeen werd geëlueerd. In het aethereluaat konden wij geen zuur meer aantonen; maar de laatste (vierde) tetrafractie bevatte veelal reeds een weinig zuur (tot 10%). Dit is echter weinig bezwaarlijk, omdat deze fractie geen stoffen bevat, die tot de eigenlijke tetragroep behoren, aangezien de elutie van de laatstbedoelde stoffen zeer snel verloopt en reeds met de tweede fractie voltooid is.

De aldus ontwikkelde methode werd toegepast op aetherische extracten van gedroogd gras. De extracten werden als zodanig onderzocht dan wel na toevoeging van modelstoffen. De uitkomsten waren zeer hoopgevend. De monsterneming van de grasextracten leverde echter moeilijkheden op, doordat een deel

TABEL 14. Chromatografie van gras- en mestextracten

Proefnummer	Extract en wijze van behandeling	Adsorbens					Petroleumaether				Tetrachloorkoolstof					
		hoogte × doorsnede		extract	opgebrachte stof	opgebr. stof in % van extract	fracties	mg	% van opgebr. stof	% van extract	fracties	mg	% van opgebr. stof	% van extract	0,1 n loog	equivalent-
		mm	g	mg	mg			mg				mg			ml	
1	grasextract A verzeept	42 × 24	4,5	214,5	100,2[a])	46,8	2	1,6	1,6	0,7	2	1,4	1,4	0,7	0,00	–
2	grasextract A verzeept	41 × 24	4,5	210,2	124,0[a])	59,0	2	6,8	5,5	3,2	2	3,3	2,7	1,6	0,00	–
3	grasextract A verzeept	40 × 24	4,5	249,6	117,8[a])	47,2	2	4,0	3,4	1,6	2	2,8	2,3	1,1		
4	grasextract B1G onverz.	110 × 30	15,0		178,5		6	0,8	0,6		4	4,5	2,5			
5	grasextract B1G onverz.	106 × 30	15,0		1000,1		6	7,3	0,7		5	28,0	2,8			
6	grasextract B1G onverz.	54 × 30	7,0		359,9		4	4,3	1,2		3	13,8	3,8			
7	grasextract 1422 onverz.	50 × 30	7,0		302,6		4	8,7	2,9		3	17,9	5,9			
8	grasextract 1422 onverz.	51 × 30	7,0		306,7		4	30,8	10,0		3	21,8	7,1			
9	mestextract B1M onverz.	51 × 30	7,0		265,1		4	19,4	7,3		2	29,3	11,1			
10	mestextract B1M onverz.	52 × 30	7,0		214,6		4	11,5	5,4		3	18,4	8,6			
11	mestextract B1M verz.	50 × 30	7,0	238,0	b)		4	9,1		3,8	3	1,6		0,7		
12	mestextract B1M verz.	50 × 30	7,0	361,1	b)		4	15,8		4,4	3	8,1		2,2	0,12	6

a) In petroleumaether oplosbare verzepingsprodukten verkregen uit de hoeveelheid grasextract, aangegeven in de voorgaande kolom.
b) Het gewicht van de in PAe oplosbare verzepingsprodukten werd niet bepaald; de verzepingsprodukten werden direct op het adsorbens gebracht

van de geëxtraheerde massa zich tot een taaie stroop verenigde. Om deze reden en mede gezien de moeilijkheid silicagel te bereiden van precies de goede activiteit, leek het ons gewenst na te gaan of een geheel andere wijze van extractie en bewerking van de extracten tot een nog betere scheiding in elutiegroepen zou voeren. Niettemin hebben wij de tot nu toe uitgewerkte methode bij een verteringsproef gebruikt.

§ 3. TOEPASSING VAN DE CHROMATOGRAFIE BIJ EEN VERTERINGSPROEF

a. Algemene opzet. Deze proef werd uitgevoerd met een melkgevende koe en omvatte een voorperiode van zes dagen, onmiddellijk gevolgd door een hoofdperiode van acht dagen. Gedurende deze beide perioden stond het proefdier op stal en ontving het vers gemaaid gras. Tijdens de hoofdperiode werden, zowel van het gras als van de mest, monsters verzameld, waarin door ons de samenstelling van de vetachtige stoffen werd bepaald met de reeds beschreven analysemethode.

b. Het proefdier. Voor deze proef werd de koe Zwartschoft 3 gebruikt, welke niet drachtig was. Vóór de proef gaf deze koe gemiddeld 4,5 kg melk per dag

Benzeen					Aether						Absolute alkohol						Totaal				Proefnummer
mg	% van opgebr. stof	% van extract	0,1 n loog ml	equivalent-gewicht	fracties	mg	% van opgebr. stof	% van extract	0,1 n loog ml	equivalent-gewicht	fracties	mg	% van opgebr. stof	% van extract	0,1 n loog ml	equivalent-gewicht	fracties	mg	% van opgebr. stof	% van extract	
76,1	75,9	35,5	1,84	414	3	13,3	13,3	6,2	0,15	887	2	6,3	6,3	2,9	0,00	–	15	98,7	98,5	**46,0**	**1**
88,2	71,1	41,9	2,20	401	3	19,5	15,7	9,3	0,25	780	2	6,3	5,1	3,0	0,00	–	15	124,1	100,1	**59,0**	**2**
90,0	76,4	36,0			3	15,9	13,5	6,4			2	6,6	5,6	2,6			15	119,3	101,3	**47,8**	**3**
9,9	5,6				4	63,4	35,5				2	39,7	22,2				24	118,3	66,3		**4**
57,7	5,8				7	308,1	30,8				3	220,4	22,0				27	621,5	62,1		**5**
26,3	5,9				4	108,9	30,3				3	61,7	17,1				22	215,0	59,7		**6**
52,8	17,4				5	89,4	29,5				4	110,8	36,6				23	279,6	92,4		**7**
41,6	13,6				6	95,0	31,0				4	110,4	36,0				23	299,6	97,7		**8**
104,0	39,2				6	101,5	38,2				4	11,7	4,4				22	266,0	100,3		**9**
85,0	39,6				5	88,5	41,2				4	14,8	6,9				22	208,2	97,1		**10**
119,4		50,2			5	49,7		20,9			4	8,1		3,4			22	187,9		**79,0**	**11**
200,4		55,5	4,02	499	5	70,7		19,6	0,40	1770	4	12,3		3,4	0,14	880	26	307,3		**85,1**	**12**

met 5,0% vet. Gebruik makende van de formule van FREDERIKSEN (1931):

$$Z = \frac{G}{300} + \frac{M}{9} + \frac{MV}{24} + 1,$$

waarin Z = benodigde zetmeelwaarde (kg), G = gewicht der koe (kg), M = melkproduktie (kg per dag), V = vetpercentage der melk, en rekening houdende met een jeugdtoeslag van 0,6 kg zetmeelwaarde, berekenden wij een behoefte van 4,32 kg zetmeelwaarde per dag.

c. Het gras. Het gras, dat in deze proef werd gevoederd, was afkomstig van perceel 1, behorende bij het laboratorium. Dit perceel was het laatst gemaaid op 20/7 1955 en hoewel er na het maaien kalkammonsalpeter was uitgestrooid, was dit gras, door de grote droogte in augustus, bij de aanvang der proef (18/10) nog niet volledig uitgegroeid.

Van een monster gras van dit perceel bedroeg het asgehalte 13,40% berekend op ds (droge stof) en het ruw-eiwit-gehalte 13,28% van de ds. Met behulp van de formule (DIJKSTRA, BROUWER, 1939):

$$Z' = 0{,}6940\,\omega' + 0{,}164\,x' - 0{,}6632\,\omega' \cdot 10^{-6{,}665\,\frac{x'}{\omega'}}$$

(Z' = kg zetmeelwaarde per 100 kg ds, ω' = 100 – asgehalte, x' = ruw-eiwitgehalte) volgt hieruit een zetmeelwaarde 56,8. Deze waarde werd voor de gehele duur van de proef aangehouden.

Door regelmatige monsternemingen en droge-stof-bepalingen werd er zorg voor gedragen, dat de koe elke dag zo nauwkeurig mogelijk dezelfde hoeveelheid droge stof toegediend kreeg.

d. Het verloop der proef. De proef ving aan op 18/10 1955 te 9.00 uur en eindigde op 1/11 1955 te 9.00 uur. Zij bestond uit een voorperiode, die duurde van 18/10 tot 24/10 en een hoofdperiode van 24/10 tot 1/11. De etmalen begonnen en eindigden te 9.00 uur.

Gedurende de hoofdperiode werd elke morgen, voor het eerst op 24/10 en voor het laatst op 30/10 tijdens het afwegen van het rantsoen een monster gras getrokken. Van dit monster werd 200,0 g onder doorleiding van lichtgas bij 100 °C (binnen een watermantel) gedurende 24 uur gedroogd. Na afkoeling in een luchtdichte plastic zak werd het monster onmiddellijk gemalen en vervolgens onder N_2 bewaard.

Van de voederresten werden het gewicht en het droge-stof-gehalte bepaald. De hieruit berekende hoeveelheid droge stof werd in mindering gebracht op de verstrekte hoeveelheid droge stof. Tabel 15 geeft een overzicht van de per dag opgenomen hoeveelheid zetmeelwaarde.

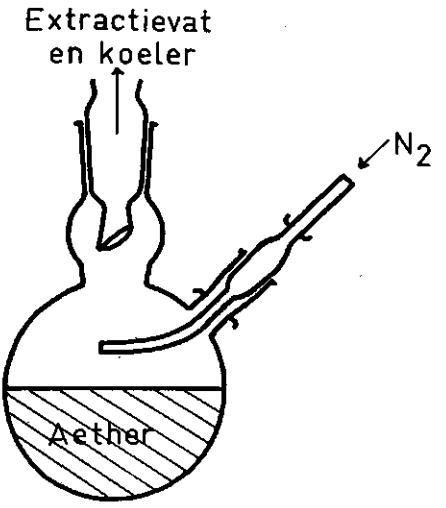
TABEL 15. Overzicht verteringsproef

okt/nov.1955	Gras	Mest	Melk		
	opgenomen zetmeelwaarde kg	ds kg	kg	vet %	vet g
18	3,18		4,8	5,25	252
19	2,83		4,7	4,98	209
20	3,63		4,0	4,88	195
21	3,74		4,4	4,70	207
22	3,48		4,4	4,75	209
23	3,73		4,8	4,56	219
24	3,78		4,2	3,98	167
25	3,49	3,05	3,8	4,66	177
26	3,17	2,48	3,4	4,79	163
27	3,81	2,54	3,4	4,91	167
28	3,51	2,28	3,8	4,32	164
29	3,13	2,67	3,6	4,22	152
30	3,76	2,17	3,7	4,51	167
1		2,28	3,6	4,31	155

Koe Zwartschoft 3: geboren voorjaar 1953; gewicht 385 kg; laatste kalfdatum 7 mei 1955; niet drachtig.

Gedurende de hoofdperiode werd de mest opgevangen en tot het einde van het etmaal in een gesloten bak bewaard. Na ieder etmaal werd de mest gewogen, waarna een monster van 200,0 g werd genomen. Dit monster werd in een

FIG. 1.
Soxhletapparaat voor extractie onder uitsluiting van lucht-zuurstof door inleiding van stikstof.
→ Stroomrichting van de stikstof.



vertind koperen schuitje onder overleiden van lichtgas bij 100 °C gedroogd. Na 24 uur werd het monster, na afkoeling in een luchtdichte plastic zak, gewogen, gemalen en daarna onder N_2 bewaard. Het tijdvak, waarin de mest dagelijks werd verzameld en bemonsterd, liep van 25/10, 9.00 uur tot 1/11, 9.00 uur.

De verzamelperiode van de mest begon en eindigde dus 24 uur later dan de verzamelperiode van de grasmonsters, omdat de vertering van het gras enige tijd vergt en het bekend is, dat na ongeveer een dag de onverteerde resten van het voorafgaande voeder het lichaam voor het grootste deel hebben verlaten.

De hoeveelheden droge stof, uitgescheiden in de mest, zijn opgenomen in tabel 15. Uit de cijfers blijkt, dat deze hoeveelheden van dag tot dag vrij constant waren.

De opgenomen hoeveelheid zetmeelwaarde bedroeg gemiddeld 3,48 kg per dag, dus aanzienlijk minder dan de berekende norm 4,32 kg. Ten gevolge hiervan liepen de melkgift en het vetpercentage der melk sterk terug, terwijl ook het gewicht der koe niet toenam. Indien men geen rekening houdt met de jeugdtoeslag, welke bedoeld is om het jonge dier te doen uitgroeien, zou de koe van 18 tot en met 30/10 45,77 kg zetmeelwaarde hebben moeten opnemen, terwijl in feite 45,24 kg is opgenomen. Vermoedelijk moet de te kleine opname voor een groot deel worden toegeschreven aan vermindering van de kwaliteit en de smakelijkheid van het gras door het maaien en de bewerkingen voor het nemen van de monsters.

e. De verwerking van de monsters. Na afloop van de proef werden in de 7 dagmonsters gras en de 7 dagmonsters mest droge-stof-bepalingen uitgevoerd. Op grond van deze bepalingen en de per dag opgenomen c.q. uitgescheiden hoeveelheid droge stof werden, zowel bij het gras als bij de mest, aliquote delen van de dagmonsters tot een mengmonster verwerkt; resp. B6G en B7M.

Van deze monsters B6G en B7M werden afgewogen hoeveelheden met peroxyde-vrije aether geëxtraheerd in een Soxhlet-apparaat onder stikstofdoorleiding (fig. 1). Het extraheren werd voortgezet totdat de overhevelende aether kleurloos was ($\pm$ 5 $\times$ 8 uur). Het extract werd vervolgens gedroogd met water-

vrij Na_2SO_4 en kwantitatief overgebracht in een kolfje van 100 ml. De aether werd afgedampt en daarna werd het residu onder het overleiden van stikstof bij 100 °C van de rest van het oplosmiddel bevrijd.

Aldus werden van het monster B6G twee extracten (B6G1 en B6G2) – telkens van 50,0 g materiaal – verkregen, en wel resp. 4,64 % en 5,08 % extract berekend op ds. Op dezelfde wijze werden twee submonsters van 25,0 g B7M behandeld; de uitkomsten waren hier B7M1: 6,67 % en B7M2: 7,40 % extract.

Aangezien er in de literatuur aanwijzingen zijn, dat de aetherextractie, voornamelijk ten aanzien van de vetzuren (al of niet gebonden), onvolledig is, zijn van beide monsters (B6G en B7M) ook extracten bereid na voorbehandeling met zuur en loog (KUMAGAWA e.a., 1908; INABA, 1908; TERROINE e.a., 1926; VORIS, 1941; RANDLE, 1943; SCHALL, THORNTON, 1943; BROUWER, 1944; LEROY, FRANCOIS, 1952).

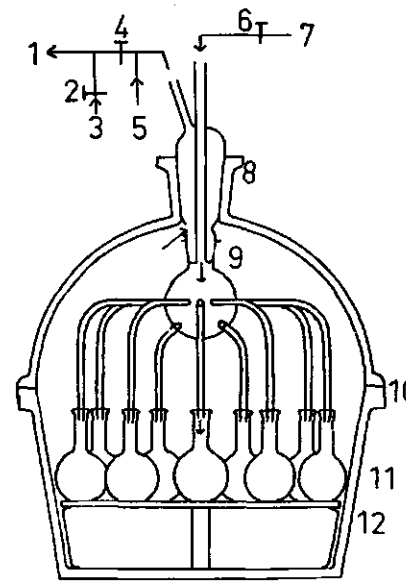
Deze bewerking verliep als volgt: Een hoeveelheid materiaal (gedroogd gras: 35,0 g; gedroogde mest: 33,0 g) werd in een rondbodemkolf van 1 liter bevochtigd met 96 % alkohol (gras: 75 ml; mest: 50 ml) en vervolgens werd 250 ml zoutzuur (± 15 %) toegevoegd. Onder overleiding van N_2 werd op het kokende waterbad gedurende 8 uur verwarmd aan een opstijgende koeler. Na afkoeling werd gefiltreerd en uitgewassen met 500 ml water, waarna het residu in de kolf werd teruggebracht. Hierna werd 250 ml 10 % KOH toegevoegd en wederom op dezelfde wijze 8 uur verwarmd. Na afkoeling werd vervolgens aangezuurd met gec. HCl tot zuur op congopapier en opnieuw gefiltreerd. Het residu werd in vacuo onder N_2 boven silicagel gedroogd, waarna het met peroxyd-vrije aether werd geëxtraheerd, zoals hiervoor is beschreven. De beide filtraten en de wasvloeistoffen werden samengevoegd, aangezuurd en uitgeschud met aether, totdat de aether geen gekleurde stoffen meer aan de vloeistof onttrok. De verzamelde aether-oplossingen werden toegevoegd aan het aetherextract en op de reeds eerder beschreven wijze (zie extracten B6G1 en B6G2) verder behandeld.

De verkregen grasextracten (B6G3 en B6G4) bedroegen resp. 6,79 % en 6.64 % berekend op ds, de verkregen mestextracten (B7M3 en B7M4) resp. 7,19 % en 7,26 %. De uitkomsten van deze duplobepalingen stemmen beter overeen dan de uitkomsten verkregen zonder voorbehandeling van het uitgangsmateriaal. De hoeveelheid extract uit het gras is veel groter dan bij de directe extractie (resp. 6,79 % en 6,64 % tegen 4,64 % en 5,08 %); voor de mest is het verschil onbelangrijk. Dit zou er op kunnen wijzen, dat in het gras een deel van de extraheerbare stoffen niet door de aether wordt bereikt (bijv. doordat het in de onbeschadigde cel is gelegen) of op zodanige wijze is gebonden, dat het niet door aether kan worden opgelost. Bij de mest is dit klaarblijkelijk niet het geval (de cellen zijn vernietigd of de verbindingen ontleed).

f. Berekening van de verteringscoëfficiënten. Per dag werd door de koe 6,199 kg ds opgenomen en 2,496 kg ds uitgescheiden. De schijnbare verteringscoëfficiënt van de ds van het gras was dus 59,8. Het door de koe per dag opgenomen gras bevatte 301,3 g direct met aether extraheerbare stoffen; de mest bevatte 175,7 g van deze stoffen. De "verteringscoëfficiënt" is derhalve 41,7. De hoeveelheid extract, na voorbehandeling met zuur en loog uit het per dag opgenomen gras verkregen, bedroeg 416,6 g; de mest bevatte 180,1 g. De "verteringscoëfficiënt" voor het extract was dus 56,8; dit is derhalve aanzienlijk groter dan de "verteringscoëfficiënt" berekend uit de directe extractie. De hier gegeven "verteringscoëfficiënten" zijn slechts schijnbare, omdat er geen rekening is gehouden met

FIG. 2.
Vacuumdroogapparaat voor kolfjes met eluaat onder doorleiding van stikstof en bij verhoogde temperatuur.

→ Stroomrichting van de stikstof.
1. aansluiting gasballastpomp.
2. fiinregelkraan vacuum.
3. capillair lek in verbinding met de buitenlucht.
4. kraan voor de grove regeling van het vacuum.
5. aansluiting manometer.
6. kraan voor de regeling van de stikstofstroom.
7. aanvoerleiding stikstof.
8. slijpstuk in het glazen exsiccatordeksel, van zodanige afmetingen, dat slijpstuk 9 hierdoor in zijn geheel omhoog gebracht kan worden.
9. slijpstuk met daaraan zoveel uitstroombuizen, als er kolfjes in de exsiccator geplaatst kunnen worden.
10. geslepen scheidingsvlak tussen exsiccatorpan en -deksel. De ondereinden van de uitstróombuizen liggen in de hoogste stand van slijpstuk 9 boven dit vlak.
11. kolfjes met eluaat.
12. porseleinen exsiccatorpan, welke in een waterbad wordt verwarmd op ca. 80 °C.



de afscheidingsprodukten van de darmklieren en met de veranderingen, die door de pens- en darmflora worden veroorzaakt.

g. De chromatografische bewerking van de verkregen gras- en mestextracten. Bij het chromatografische onderzoek der verkregen extracten werd steeds 7 g adsorbens gebruikt. De hoeveelheid opgebrachte stof bedroeg in de regel ongeveer 300 mg. Uit enkele voorbereidende proeven bleek ons, dat tot de desbetreffende elutiegroep behorende stoffen volledig werden geëlueerd, als de volgende aantallen fracties van 25 ml werden opgevangen: 4 PAe-fracties, 3 tetrafracties (T), 8 benzeenfracties (Be), 5 aetherfracties (Ae) en 4 alkoholfracties (Al). In enkele gevallen brak het scheidingsfront tussen benzeen en aether één fractie eerder door, waardoor resp. 7 benzeen- en 6 aetherfracties werden verkregen.

Het eluens werd uit de kolfjes afgedampt op het waterbad onder overleiden van stikstof. Nadat het eluens grotendeels verwijderd was, werden de kolfjes in een vacuumexsiccator geplaatst, waarin de laatste resten van het eluens door een stikstofstroom bij een druk van 2–20 cm Hg en ca. 80 °C werden verwijderd (fig. 2). De duur van de droging bedroeg 1½ uur, waarna de kolfjes werden gewogen. Tijdens de weging werd de stikstof in de kolfjes door lucht vervangen, omdat het gewicht anders ruim 2 mg te laag zou worden gevonden. Na de weging werden de kolfjes opnieuw met N_2 gevuld en afgesloten, totdat een titratie of een J-getalbepaling werd uitgevoerd.

Bij een chromatogram werd vervolgens òf een zuurtitratie òf een J-getalbepaling van de eluaten verricht. De zuurtitratie geschiedde met 0,1 n loog en met thymolblauw als indicator; zij werd bij alle eluaten van het betrokken chroma-

TABEL 16. Overzicht van de chromatografie van de extracten

Chromatogram	Extract en wijze van behandeling	opgebracht extract mg	Petroleum-aether a) ‰ van droge stof	Petroleum-aether b) meq zuur per 100 g ds	Tetrachloor-koolstof a) ‰ van droge stof	Tetrachloor-koolstof b) meq zuur per 100 g ds	Benzeen a) ‰ van droge stof	Benzeen b) meq zuur per 100 g ds	Aether a) ‰ van droge stof	Aether b) meq zuur per 100 g ds	Absolute alkohol a) ‰ van droge stof	Absolute alkohol b) meq zuur per 100 g ds
1	B6G1 onverz.	318,4	0,4		4,3		8,9		13,7		12,5	
2	B6G2 onverz.	359,0	0,9		4,2		9,7		15,0		14,6	
3	B6G1 verz.	233,6	0,5		0,4		18,9		3,9		1,1	
4	B6G1 verz.	319,4	1,6	0,0	1,7	0,07	19,0	5,78	6,0	0,95	1,4	0,41
5	B6G2 verz.	295,0	1,5	0,0	0,4	0,0	21,0	4,99	7,0	1,31	2,4	0,38
6	B6G2 verz.	273,0	1,5		0,3		22,1		7,2		2,2	
7	B6G3 verz.	268,0	2,1		0,8		25,0		8,7		1,4	
8	B6G3 verz.	600,9	1,5	0,0	0,2	0,0	21,4	5,22	6,3	1,41	0,9	0,18
9	B6G4 verz.	326,0	2,1	0,0	0,6	0,0	27,7	6,97	8,5	1,55	1,5	0,14
10	B6G4 verz.	281,3	3,2		2,5		18,4		9,7		1,5	
11	B6G4 verz.	321,0	0,6		0,0		19,0		11,4		1,5	
12	B7M1 onverz.	309,5	1,2		3,2		24,3		22,3		3,3	
13	B7M2 onverz.	340,9	1,7		5,2		16,2		20,0		3,0	
14	B7M1 verz.	147,2	2,4	0,0	1,7	0,0	20,9	1,77	6,8	2,13	2,5	0,50
15	B7M2 verz.	508,2	1,6		1,0		20,2		6,4		1,1	
16	B7M2 verz.	263,1	5,2	0,0	1,4	0,0	19,2	1,13	7,0	3,89	1,4	0,34
17	B7M3 verz.	289,5	1,6		1,5		21,3		10,8		3,1	
18	B7M3 verz.	323,2	2,1	0,0	0,9	0,0	21,6	3,46	12,8	2,03	1,8	0,16
19	B7M3 verz.	347,5	2,0		0,5		21,1		14,6		1,7	
20	B7M4 verz.	355,5	4,0	0,0	0,7	0,0	23,8	3,91	12,8	2,17	3,8	0,65
21	B7M4 verz.	318,3	5,0		0,3		24,7		11,0		3,5	
			mg		mg		mg		mg		mg	
	Blanco	–	2,8		3,6		3,4		2,1		6,8	
	Blanco	–	3,0		2,7		4,2		4,3		3,2	
	Blanco	–	1,4		0,8		1,4		0,1		0,7	

Adsorbens: 7 g silicagel; afmeting adsorptiekolom: 47–51 × 30 mm.
Elutiesnelheid: 25 ml per 12–18 min.
a) Uitgedrukt in ‰ van het monster B6G of B7M.
b) per 100 g droge stof van het monster B6G of B7M.

togram uitgevoerd. De J-getalbepaling werd slechts verricht bij die eluaten van een chromatogram, welke meer dan 10 mg bedroegen.

h. Uitkomsten. Zoals gezegd, werden van het niet met zuur en loog voorbehandelde materiaal, d.w.z. gras (B6G) en mest (B7M), aetherische extracten: B6G1, B6G2, B7M1 en B7M2 gemaakt. Er werden nu chromatogrammen vervaardigd: 1. van de onverzeepte extracten en 2. na verzeping dezer extracten. Bovendien werden chromatogrammen gemaakt 3. van de verzepingsprodukten van de extracten B6G3, B6G4, B7M3 en B7M4, verkregen uit het met zuur en loog voorbehandelde materiaal. De uitkomsten dezer chromatogrammen zijn verzameld in tabel 16. Voorts is in de blokdiagrammen (figuren 3 en 4) het gemiddelde

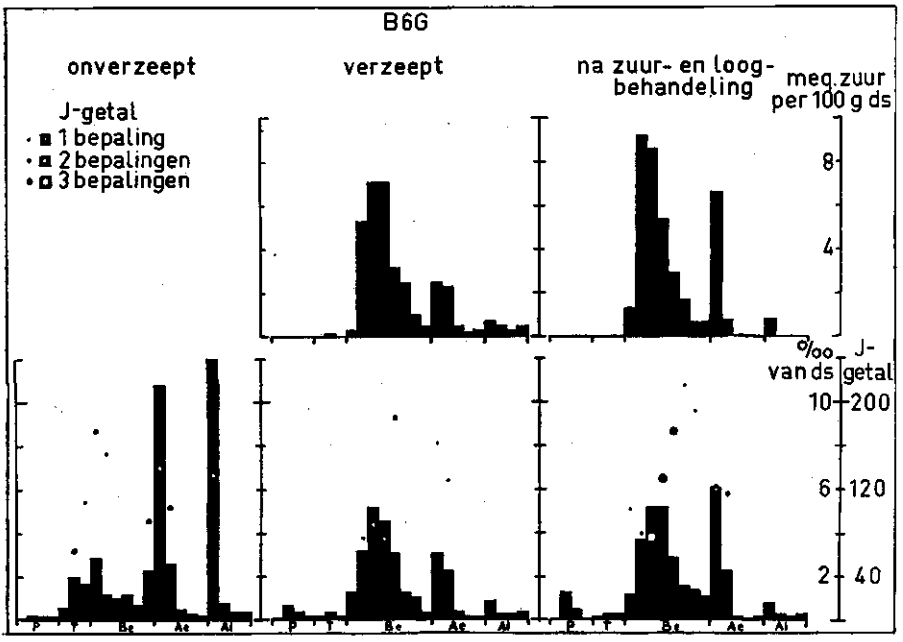


FIG. 3. Overzicht van de chromatografie van de grasextracten, behorende bij de verteringsproef van 18/10 tot 1/11 1955.

P = petroleumaether-fracties. Ae = aether-fracties.
T = tetrachloorkoolstof-fracties. Al = absolute alkohol-fracties.
Be = benzeen-fracties.
Hoeveelheden eluaat per fractie uitgedrukt in ‰ van de droge stof van het uitgangsmateriaal; aantal meq zuur uitgedrukt per 100 g ds van het uitgangsmateriaal.

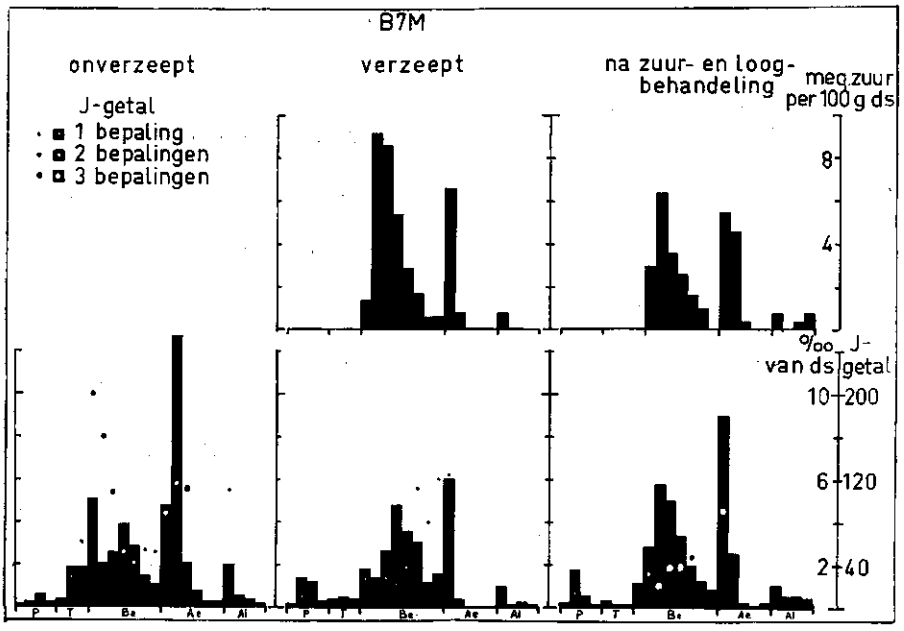


FIG. 4. Overzicht van de chromatografie van de mestextracten, behorende bij de verteringsproef van 18/10 tot 1/11 1955.
Voor verklaring van de afkortingen zie figuur 3.

verloop van deze chromatogrammen weergegeven. De grafieken geven eveneens een overzicht van de gevonden J-getallen.

j. Bespreking der uitkomsten. Allereerst moet worden opgemerkt, dat de overeenstemming tussen de uitkomsten niet bijzonder goed is. Het grootste verschil treffen wij aan tussen de chromatogrammen der onverzeepte mestextracten B7M1 en B7M2. De oorzaken van deze verschillen zouden kunnen worden gevonden in de volgende delen van de analysegang:

1. de extractiemethode,
2. het nemen van een monster van het extract vóór de chromatografie,
3. de wijze van verzeping vóór de chromatografie,
4. de invloed van de wisselende blancowaarden bij de elutie.

ad 1. De directe extractie met aether is, vooral bij gras, niet volledig; de oorzaak hiervan is niet zonder meer duidelijk. Hierbij kan zowel gedacht worden aan afscherming van de extraheerbare stoffen als aan (chemische) binding van die stoffen in niet-extraheerbare verbindingen of complexen. Zoals gezegd, werden door de voorbehandeling met zuur en loog meer stoffen toegankelijk gemaakt voor de extractievloeistof (niet voorbehandeld: 4,68%; wel voorbehandeld: 6,71%); bij de mest schijnt dit niet het geval te zijn (niet voorbehandeld: 7,04%; wel voorbehandeld: 7,22%).

Bezien wij in tabel 17 de hoeveelheden stof in de benzeen- en aethereluaten, verkregen na chromatografie van de extracten, dan blijken deze, zowel bij gras als bij mest, groter te zijn bij het voorbehandelde materiaal dan bij het niet voorbehandelde materiaal. Hetzelfde blijkt ook te gelden voor de zuren, welke door benzeen en aether werden geëlueerd.

De extractie na de voorbehandeling is dus zowel bij gras als bij mest volledig. Hoewel men mag verwachten, dat de overeenstemming in de uitkomsten bij een volledige extractie beter is dan bij een partiële extractie, die door vele factoren wordt beïnvloed, blijkt dit toch niet het geval te zijn. Hiervoor moeten de hierna te behandelen fasen van de bewerking verantwoordelijk worden gesteld.

ad 2. Zoals reeds in §2BIV is gezegd, ontmengden de verkregen extracten zich zeer sterk. Het was onmogelijk deze extracten door verwarming of op andere wijze te homogeniseren. Dat hierdoor geen representatieve monsters voor de chromatografie konden worden verkregen, spreekt welhaast vanzelf.

ad 3. Het uitschudden van het extract door middel van PAe leverde vrij veel moeilijkheden op, doordat zich stabiele emulsies vormden. Tengevolge hiervan moest vele malen worden uitgeschud, hetgeen de nauwkeurigheid en de reproduceerbaarheid uiteraard verminderde.

ad 4. Door de consistentie van het extract kon niet steeds dezelfde hoeveelheid extract worden afgewogen, waardoor de invloed van de blancowaarden op de uitkomsten van chromatogram tot chromatogram wisselde. Bovendien zijn de blancowaarden zelf allerminst constant, zoals blijkt uit de uitkomsten van de blancobepalingen opgenomen in tabel 16.

Niettegenstaande al deze bezwaren laten de uitkomsten toch nog enkele conclusies toe, en wel de volgende:

1. Stoffen met een hoog J-getal worden voor een aanzienlijk deel "verteerd". De J-getallen zijn niet in tabel 16 opgenomen, omdat zij niet voor alle fracties van de eluaten zijn bepaald, doch alleen voor die fracties waarin zich meer dan

TABEL 17. Verteringsproef. Overzicht van gemiddelden en verteringscoëfficiënten

Uitgangs-materiaal	% extract berekend op ds	Elueerbaar met: petroleum-aether (g)	tetrachloor-koolstof (g)	Benzeen g	Benzeen meq	Aether g	Aether meq	Absolute alkohol g	Absolute alkohol meq	Opmerkingen
Onverzeept extract verkregen zonder voorbehandeling van het uitgangsmateriaal										
B6G	4,86	0,07	0,43	0,93		1,44		1,36		} hoeveelheden per 100 g ds
B7M	7,04	0,15	0,42	2,03		2,11		0,32		} gras c.q. mest
	2,83	0,06	0,17	0,82		0,85		0,13		uitgescheiden p. 100 g ds gras
	2,03	0,01	0,26	0,11		0,59		1,23		"verteerd" per 100 g ds gras
	42	9	61	12		41		91		"verteringscoëfficiënten"
Verzepingsprodukten van extract verkregen zonder voorbehandeling van het uitgangsmateriaal										
B6G	4,86	0,13	0,07	2,00	5,4	0,60	1,1	0,18	0,4	} hoeveelheden per 100 g ds
B7M	7,04	0,31	0,14	2,00	1,5	0,68	3,0	0,17	0,4	} gras c.q. mest
	2,83	0,12	0,05	0,81	0,6	0,27	1,2	0,07	0,2	uitgescheiden p. 100 g ds gras
	2,03	0,01	0,02	1,19	4,8	0,33	−0,1	0,11	0,2	"verteerd" per 100 g ds gras
	42	2	23	60	89	55	−7	62	57	"verteringscoëfficiënten"
Verzepingsprodukten van extract verkregen na voorbehandeling van het uitgangsmateriaal met zuur en loog										
B6G	6,71	0,19	0,08	2,22	6,1	0,89	1,5	0,14	0,16	} hoeveelheden per 100 g ds
B7M	7,22	0,30	0,08	2,25	3,7	1,24	2,1	0,28	0,40	} gras c.q. mest
	2,90	0,12	0,03	0,91	1,5	0,50	0,8	0,11	0,16	uitgescheiden p. 100 g ds gras
	3,81	0,07	0,05	1,31	4,6	0,39	0,7	0,03	0,00	"verteerd" per 100 g ds gras
	57	37	61	59	76	44	43	18	0	"verteringscoëfficiënten"

10 mg stof bevond. De uitkomsten zijn wel verwerkt in de figuren 3 en 4. Daar de gevonden J-getallen over het algemeen betrekking hadden op meer dan tweederde van het totale benzeeneluaat hebben wij toch de "gemiddelde" J-getallen berekend. Voor de benzeeneluaten verkregen uit de verzepingsprodukten van het niet voorbehandelde materiaal bedroegen deze "gemiddelden": B6G1 (tabel 16–3): 130; B6G2 (tabel 16–6): 116 tegenover B7M2 (tabel 16–5): 77. Voor de verzepingsprodukten van het voorbehandelde materiaal vonden wij: B6G3 (tabel 16–7): 106; B6G4 (tabel 16–10): 121 en B6G4 (tabel 16–11): 137 tegenover B7M3 (tabel 16–17): 33 en B7M3 (tabel 16–19): 33. In beide gevallen wijst dit op een "verteringscoëfficiënt" der dubbele bindingen, welke ca. 75 bedraagt.

2. De verzepingsprodukten van grasextract, welke door benzeen werden geelueerd, werden slechts matig goed "verteerd" ("verteringscoëfficiënt" resp. 60 en 59, tabel 17).

3. De door benzeen elueerbare zuren zijn goed "verteerbaar" ("verteringscoëfficiënt" van de meq zuur resp. 89 en 76).

4. Uit de hogere "verteringscoëfficiënt" voor de meq zuur in het benzeeneluaat vergeleken met die voor het gehele benzeeneluaat (89 tegen 60 bij het niet voorbehandelde materiaal, 76 tegen 59 bij het voorbehandelde materiaal), blijkt, dat de zuren (vnl. vetzuren) beter worden "verteerd" dan de niet-zure stoffen.

5. De zuren, welke in het aethereluaat werden aangetroffen zijn niet beter verteerbaar dan de rest van het eluaat. Bij het niet voorbehandelde materiaal

vonden wij voor het totale eluaat een "verteringscoëfficiënt" 55, voor de zuren werd zelfs een coëfficiënt –7 gevonden. Bij het voorbehandelde materiaal waren de "verteringscoëfficiënten" voor het totale eluaat en de daarin voorkomende zuren vrijwel gelijk (resp. 44 en 43).

6. De hoeveelheden eluaat in de andere elutiegroepen zijn te gering om met enige nauwkeurigheid een verteringscoëfficiënt te berekenen, hoewel zij volledigheidshalve in tabel 17 zijn opgenomen.

7. Ten aanzien van de extracten, verkregen na voorbehandeling met zuur en loog, dient nog te worden opgemerkt, dat deze alle zure en alle neutrale stoffen bevatten welke in aether oplosbaar zijn, echter niet de alkalische stoffen, behalve wanneer de gevormde zouten in aether oplossen.

De genoemde "verteringscoëfficiënten" zijn slechts schijnbare, omdat de extraheerbare stoffen in de mest zijn samengesteld uit 1. niet geresorbeerde stoffen, 2. door microörganismen gevormde stoffen en 3. door het lichaam uitgescheiden stoffen. Dit maakt het waarschijnlijk, dat er grotere hoeveelheden werden geresorbeerd dan uit de "verteringscoëfficiënten" blijkt.

§ 4. Eindconclusies

De gevolgde methode geeft niet de gewenste inlichtingen. Dit werd in de eerste plaats veroorzaakt door de vele, reeds genoemde onvolkomenheden in de techniek der bepalingen. In de tweede plaats bestonden de verschillende elutiegroepen ieder uit een gecompliceerd mengsel van stoffen, waardoor het niet mogelijk was na te gaan, welke stoffen bij de vertering worden opgenomen en welke niet. Ook kan door gedeeltelijke afbraak tijdens de vertering een deel ener stof in een andere elutiegroep geraken, waardoor voor stoffen uit deze laatstgenoemde groep een te kleine, ja zelfs negatieve "verteringscoëfficiënt" kan worden gevonden. Wij hebben dan ook de gehele extractiemethode en de voorbereiding van het extract voor de chromatografie aan een nader onderzoek onderworpen, alvorens over te gaan tot verdere verteringsproeven. Een en ander zal in het volgende hoofdstuk worden besproken.

Hoofdstuk 3

DE ISOLERING EN DE BEPALING VAN DE VETZUREN UIT GRAS EN MEST EN DE TOEPASSING HIERVAN OP EEN VERTERINGSPROEF MET KOEIEN

Inleiding

Zoals in het voorafgaande hoofdstuk is beschreven, voldeed de door ons ontwikkelde methode tot onderzoek van de vetachtige stoffen in gras en mest niet aan de gestelde eisen, zowel wat de scheiding in goed gedefiniëerde groepen van stoffen aangaat als wat de nauwkeurigheid betreft. Daar onze belangstelling in de allereerste plaats gericht was op de vetzuren en de vertering daarvan, hebben wij ons bij het verdere onderzoek beperkt tot de vetzuren, die vrij of in verbindingen in het gras en de mest voorkomen. In dit hoofdstuk bespreken wij

eerst de ontwikkeling van de nieuwe methodiek en vervolgens de toepassing daarvan op een verteringsproef.

§ 1. Ontwikkeling der methodiek

Inleiding. Voor het ontwikkelen van de analyse werden de volgende punten aan een onderzoek onderworpen:

a. De extractie van het uitgangsmateriaal.
b. De behandeling van het extract vóór de verzeping.
c. De verzeping van het extract en de verwijdering van de onverzeepbare stoffen.
d. De hoeveelheid adsorbaat per chromatogram.

a. De extractie van het uitgangsmateriaal. De behandeling van het uitgangsmateriaal met zuur en loog vóór de extractie, zoals beschreven in het voorgaande hoofdstuk bij de bereiding van de extracten B6G3,4 en B7M3,4, is door ons nader onderzocht.

Van een monster gedroogd gras (B10G) werd 500 g zonder voorbehandeling direct met aether geëxtraheerd (*directe extractie*). Het extract (B10G1) bedroeg 6,13 %, berekend op de droge stof. Het geëxtraheerde gras werd in vier gedeelten (elk ca. 125 g) verder bewerkt. Na bevochtiging met 25 ml alkohol en toevoeging van 1000 ml 5n HCl werd onder doorleiding van stikstof gedurende 9 uur gekookt. Na affiltreren en uitwassen met 500 ml water werd aan het residu 500 ml 25 % KOH toegevoegd, waarna wederom 9 uur werd gekookt onder stikstof-doorleiding. Het residu werd afgefiltreerd en gewassen met 500 ml water en vervolgens in vacuo onder stikstof gedroogd en ten slotte werd het droge residu met aether geëxtraheerd. De verzamelde filtraten en wasvloeistoffen werden met geconcentreerd zoutzuur aangezuurd en uitgeschud met aether. Alle aetheroplossingen werden verzameld en gedroogd met watervrij Na_2SO_4, daarna bevrijd van aether en in vacuo gedroogd. Het aldus verkregen extract (B10G1[2]) bedroeg 2,00 %, berekend op de ds van het uitgangsmateriaal.

Van hetzelfde monster gras (B10G) werd 500 g in twee gedeelten direct met zuur en loog behandeld en daarna geëxtraheerd, evenals de verenigde en aangezuurde filtraten zoals in de voorgaande alinea voor de bereiding van extract B10G1[2] beschreven is; de hoeveelheden toegevoegde reagentia waren dezelfde (*extractie na voorbehandeling*). Het extract bedroeg 6,38 % van de ds (B10G2).

Van de extracten B10G1 en B10G2 werd op een onder c. te beschrijven wijze het gehalte aan zure verzepingsprodukten en onverzeepbare stoffen in viervoud bepaald. Deze gehalten, berekend op de droge stof van het uitgangsmateriaal, bedroegen gemiddeld voor B10G1: onverzeepbaar 11,8‰, zure verzepingsprodukten 25,9‰. Voor B10G2 waren deze gehalten resp.: 7,4‰ en 38,2‰. Het aantal meq zuur per 100 g ds in de zure verzepingsprodukten bedroeg resp. 8,0 meq en 11,2 meq.

Uit deze cijfers kan gemakkelijk worden berekend, dat door de voorbehandeling met zuur en loog (B10G2) de opbrengst aan zure verzepingsprodukten relatief aanzienlijk toeneemt, evenals het aantal meq zuur per 100 g ds van het uitgangsmateriaal. De opbrengst aan onverzeepbare stoffen is echter bij de directe aetherextractie (B10G1) groter. Vermoedelijk komen bij de directe extractie chlorophyl en afbraakprodukten daarvan bij de onverzeepbare stoffen terecht.

Deze laatste zijn bij de directe extractie namelijk groengeel van kleur, doch bij de extractie na voorbehandeling zuiver geel.

De methode, gebruikt bij de extractie na voorbehandeling, is echter zeer bewerkelijk door het vele filtreren en uitschudden. Teneinde deze bezwaren te ondervangen zijn wij uitgegaan van de bewerkingen, die gebruikt worden bij de ruwe-celstof-bepaling volgens de zogenaamde "verkorte methode", in gebruik bij het Rijkslandbouwproefstation Maastricht. Voorts hebben wij als oplosmiddel voor het zuur en de loog het water vervangen door alkohol, waardoor het filtreren achterwege kon blijven, omdat de alkohol kon worden afgedampt.

In één proef (B11G1) werden vrijwel evenveel equivalenten zuur en loog per gram droge stof gebruikt als bij de "verkorte methode". In een tweede proef (B11G2) gebruikten wij één derde dezer hoeveelheden. De concentratie der reagentia is bij beide proeven echter aanzienlijk hoger gekozen dan de "verkorte methode" aangeeft, aangezien anders met te grote volumina gewerkt zou moeten worden.

De bewerking bij de eerste proef (B11G1) verliep als volgt (de gegevens tussen haakjes hebben betrekking op de tweede proef, B11G2).

In een platbodemkolf van 1000 ml werd het gedroogde gras – 25 g B11G – bevochtigd met 50 (50) ml absolute alkohol en daarna werd er 200 (200) ml 2 (0,7) n HCl in alkohol aan toegevoegd, verkregen door menging van 34,3 (11,4) ml gec. HCl met 166 (189) ml absolute alkohol. Na 3 uur koken aan een opstijgende koeler werd afgekoeld, waarna 100 (100) ml 10,3 (3,4) n alkoholische NaOH, verkregen door mengen van 41,2 (13,7) g NaOH met 100 (100) ml absolute alkohol, werd toegevoegd en opnieuw 3 uur gekookt. Na aanzuren van het reactiemengsel met HCl werd de alkohol afgedampt, totdat de inhoud van de kolf dikvloeibaar was geworden. Deze massa werd kwantitatief overgebracht in een porseleinen schaal en vervolgens in vacuo gedroogd (3–4 cm Hg, 75 °C, N_2), waarbij de massa enkele malen werd fijngemaakt. De droge massa werd vervolgens in een Soxhlet-apparaat met aether geëxtraheerd totdat de aether kleurloos afliep (na ca. 4 × 8 uur).

Het aldus bereide extract B11G1 beliep 6,71 % van de droge stof en bevatte 54,5 % (3,7 % op ds) onverzeepbare stoffen en 34,5 % (2,3 % op ds) zure verzepingsprodukten (zie voor de bepalingsmethode onder c.). Het extract B11G2 omvatte 11,65 % van de droge stof. Hierop zijn geen verdere bepalingen verricht, omdat de aetheroplossing troebel was en zich sterk ontmengde. Bij nader onderzoek bleek ons, dat dit extract grote hoeveelheden stof bevatte, welke niet behoren tot de zogenaamde "onverzeepbare" stoffen of de "zure verzepingsprodukten". Vermoedelijk ging het hier om eiwitten en afbraakprodukten daarvan. De concentratie der reagentia bij deze extractie is dus niet hoog genoeg om de door ons gezochte stoffen vrij van andere stoffen te verkrijgen. Deze bezwaren kleefden niet aan de methode gevolgd bij de eerste proef (B11G1). Deze methode is dan ook door ons voor het definitieve onderzoek gebruikt.

b. De behandeling van het extract vóór de verzeping. Zoals in het voorafgaande enkele malen is gezegd, ondervonden wij grote moeilijkheden bij het nemen van een representatief monster uit een extract, doordat hierin ontmenging optrad. Door het extract reeds in opgeloste toestand in een aantal gelijke delen te verdelen, konden wij deze moeilijkheid omzeilen.

De aetherische oplossing, verkregen bij de extractie, werd onder stikstofdoorleiding ingedampt tot ± 75 ml. Na toevoeging van ca. 20 g watervrij Na_2SO_4

bleef de oplossing gedurende een nacht staan, waarna zij via een hevel en een 6bG2-filter met ongeveer 5 g Na_2SO_4 onder stikstofdruk werd overgeperst in een maatkolfje van 110 ml. Extractiekolf, hevel en filter werden gewassen met warme aether, totdat deze kleurloos bleef. Wanneer de totale hoeveelheid aether te groot was, werd uit het maatkolfje aether afgedampt, waarbij het volume van de oplossing nooit kleiner werd dan 50 ml. Na aanvulling tot 110 ml werd 4 maal 25 ml in afzonderlijke kolfjes gepipetteerd. Na afdestilleren van de aether en drogen in vacuo werd het gewicht van de droge extracten bepaald.

Deze methode werd toegepast bij twee proefextracties. Bij de eerste proef vonden wij resp. 376,7 mg, 375,0 mg, 373,2 mg en 373,4 mg, gemiddeld dus 374,6 mg droog extract. In de vier kolfjes van de tweede proef bevond zich resp. 643,1 mg, 652,4 mg, 660,9 mg en 645,1 mg droog extract, gemiddeld dus 650, 4 mg.

Deze methode van verdeling geeft dus goed overeenstemmende uitkomsten. Een bijkomend, doch niettemin belangrijk voordeel van deze werkwijze is nog, dat hierdoor steeds dezelfde hoeveelheid van een extract voor de chromatografie wordt gebruikt, waardoor de invloed van de blanco-waarden voor een groot deel werd geëlimineerd.

c. De verzeping van het extract en de verwijdering van de onverzeepbare stoffen. Bij algehele verzeping van het extract komt men tot een mengsel van stoffen, dat aanzienlijk eenvoudiger van samenstelling is dan het oorspronkelijke, door de voorbehandeling reeds ten dele verzeepte extract. Dit wordt vooral veroorzaakt door het uiteenvallen van allerlei verbindingen in stoffen met zuur karakter (zgn. "zure verzepingsprodukten") enerzijds en stoffen met alkoholisch karakter (zgn. "onverzeepbare stoffen") anderzijds. Hierdoor wordt het mogelijk het mengsel in twee delen te scheiden, die beter toegankelijk zijn voor een analyse.

Het scheiden dezer twee groepen door uitschudden met een organisch oplosmiddel wordt ernstig bemoeilijkt door het optreden van sterke emulsievorming. Onze gedachte ging uit naar een methode waarbij het alkalische reactiemengsel op een inerte drager werd gebracht en vervolgens geëlueerd met een organisch oplosmiddel ter verkrijging van de "onverzeepbare stoffen". Na aanzuren van het reactiemengsel op de drager zouden de "zure verzepingsprodukten" kunnen worden verkregen.

De bewerking werd als volgt uitgevoerd met extracten, verkregen op de wijzen die onder a. en b. zijn beschreven: Ongeveer 800 mg extract werd in een kolfje van 100 ml gedurende 1 uur verzeept op het kokende waterbad met 1 g KOH opgelost in 25 ml alkohol, waarbij het contact met de luchtzuurstof werd verhinderd door het inleiden van stikstof. Hierna werd de alkohol afgedampt, het reactiemengsel in vacuo gedroogd (2–4 cm Hg, 75 °C, N_2) en vervolgens overgebracht in een filterbuis (Jena, 6bG4) waarin zich ongeveer 2 g papierpoeder bevond. De onverzeepbare stoffen werden nu met aether geëlueerd (3 maal 75 ml), waarna het papierpoeder werd bevochtigd met $\pm$ 4 ml H_2SO_4 40%, waarbij het poeder niet "nat" mocht worden. Door het toevoegen van ca. 15 g watervrij natriumsulfaat werd het water gebonden, waardoor in de filterbuis een losse, rulle massa ontstond. De zure verzepingsprodukten werden vervolgens met aether geëlueerd. *Celite* (gezuiverde diatomeeënaarde) bleek als drager niet te voldoen, daar het de opgebrachte stoffen te sterk vasthield. Dit was eveneens het geval als het papierpoeder vóór het drogen aan het reactiemengsel werd toegevoegd.

Met deze werkwijze hebben wij een aantal modelproeven uitgevoerd met cholesterol, stearinezuur en tristearine; hierbij werd van het cholesterol ca. 101% teruggevonden. Van het stearinezuur en van het uit tristearine vrijgemaakte zuur werd volgens het gewicht 99–105% teruggevonden, volgens de uitkomsten der titraties 96–100%. De blanco-waarden waren verwaarloosbaar klein.

Deze methode werd vier maal toegepast op het grasextract B11G1, verkregen door extractie na voorbehandeling. Hierbij was de overeenstemming in de uitkomsten voor de zure verzepingsprodukten goed, voor de onverzeepbare stoffen was dit niet het geval. De oorzaak hiervan was waarschijnlijk, dat de eluaten vrij troebel waren, vooral bij de elutie der onverzeepbare stoffen.

De vervanging van KOH bij de verzeping door $Ba(OH)_2$ bracht geen verbetering. Het gebruik van petroleumaether i.p.v. aether voor de elutie van de onverzeepbare stoffen en van de zure verzepingsprodukten had echter het gewenste effect, daar de aflopende vloeistoffen helder waren en de hoeveelheden onverzeepbare stoffen en zure verzepingsprodukten goed overeenstemden.

De aldus gewijzigde methode werd toegepast op mengsels van modelstoffen (tabel 18). Hierbij bleek, dat stearinezuur niet geheel werd teruggevonden (proef 1), waarschijnlijk door de geringe oplosbaarheid in petroleumaether. Toevoeging van oliezuur aan het te scheiden mengsel gaf enige verbetering (proef 2). In proef 3 gebruikten wij een mengsel van 50% oliezuur en 50% stearinezuur (mengsel I), hetgeen weer een verbetering betekende. Het oliezuur, dat voor de bereiding van mengsel I werd gebruikt bevatte een weinig "onverzeepbare" stoffen, welke wij met de hier beschreven methode uit mengsel I verwijderden. Het aldus verkregen mengsel (II) werd voor proef 4 gebruikt, waarbij

TABEL 18. De scheiding van onverzeepbare stoffen en zure verzepingsprodukten

Pr. no.	Opgebracht		Teruggevonden					
	stof	mg	onverzeepb.		zure verzepingsprodukten			
					gewicht		meq zuur	
			mg	%	mg	%	meq	%
1	cholesterol	98,0	97,3	99,3	–	–	–	–
	stearinezuur	483,0	–	–	415,8	86,1	1,46	86,2
2	cholesterol	80,0	83,0	103,7	–	–	–	–
	stearinezuur + oliezuur	486,2 + 87,0	–	–	517,7	90,3	1,83	91,6
3	cholesterol	96,9	97,7	100,8	–	–	–	–
	mengsel I	503,1	–	–	472,7	94,0	1,70	96,6
4	cholesterol	83,1	85,4	102,8	–	–	–	–
	mengsel II	469,9	–	–	456,2	97,1	1,63	99,3
5	mengsel III	586,6	0,7	–	580,0	98,9	2,02	94,3
6	mengsel III	586,6	2,9	–	584,5	99,6	2,06	97,8

Mengsel I = mengsel van 50% oliezuur en 50% stearinezuur.
Mengsel II = mengsel I, waaruit door middel van de hier gebruikte methode de "onverzeepbare" verontreinigingen zijn verwijderd.
Mengsel III = mengsel van meervoudig onverzadigde vetzuren, bereid uit lijnolie.

TABEL 19. De scheiding van onverzeepbare stoffen en zure verzepingsprodukten

Pr. no.	Gras-extract B10G2 mg	Onverzeepbaar			Zure verzepingsprodukten				
					gewicht		meq zuur		
		mg	% van extract	meq zuur	mg	% van extract	totaal	per 100 mg verzeepbaar	per 100 mg extract
1	646,9	20,0	3,1	0,010	355,9	55,0	1,12	0,315	0,173
2	647,7	39,6	6,1	0,020	350,8	54,2	1,16	0,331	0,179
3	652,7	38,9	6,0	0,006	349,6	53,6	1,12	0,321	0,172
4	650,2	61,8	9,6	0,008	360,1	55,4	1,19	0,331	0,183
5	653,0	38,1	5,8	0,011	351,5	53,8	1,16	0,330	0,178
6	652,9	35,8	5,5	0,012	340,8	52,2	1,09	0,320	0,167
7	653,7	41,9	6,4	0,011	352,6	53,9	1,24	0,352	0,190
gemiddelde		39,4	6,1	0,011	351,6	54,0	1,15	0,329	0,177
standaardafw.		4,6	0,72	0,0017	2,25	0,39	0,190	0,0045	0,0029

de zuren en het cholesterol vrijwel volledig werden teruggevonden. Ook sterk onverzadigde vetzuren, uit lijnolie verkregen (mengsel III), werden vrijwel volledig teruggevonden (proef 5 en 6).

Uit de modelproeven blijkt, dat de uitgewerkte methode zowel voor de onverzeepbare stoffen als voor de zure verzepingsprodukten goede uitkomsten geeft. Het percentage teruggevonden cholesterol bedraagt rond 100%, dat voor de vetzuren ligt tussen 94% en 100%, zowel uit het gewicht als uit de titraties berekend.

Deze methode is vervolgens toegepast op zeven gelijke hoeveelheden van het onder a. genoemde extract B10G2, verkregen na voorbehandeling. Uit tabel 19 blijkt, dat hiermede zeer goed overeenstemmende uitkomsten werden verkregen. Het gemiddelde gehalte van het extract aan onverzeepbare stoffen bedroeg in 7 proeven 6,1 $\pm$ 0,72%; het percentage zure verzepingsprodukten bedroeg 54,0 $\pm$ 0,39%. Het aantal meq zuur in de zure verzepingsprodukten bedroeg 0,329 $\pm$ 0,0045 per 100 mg of, berekend per 100 mg opgebracht extract, 0,177 $\pm$ 0,0029.

Het scheiden van de onverzeepbare stoffen van de zure verzepingsprodukten kan dus op de hier ontwikkelde wijze geschieden met goed reproduceerbare uitkomsten voor beide soorten stof.

d. De hoeveelheid extract per chromatogram. In het voorafgaande onderzoek was reeds gebleken, dat het scheidingsfront tussen benzeen en aether nu eens in de ene dan weer in de andere fractie doorbreekt. Hierdoor werd de vergelijking tussen verschillende chromatogrammen ernstig bemoeilijkt. Dit kon worden voorkomen door de hoeveelheid adsorbens te verhogen van 7,0 tot 7,5 g.

Ten einde de invloed van de grote variatie in de blanco-waarden zo veel mogelijk te verminderen, dient de hoeveelheid op te brengen stof zo groot mogelijk te zijn. Hiertoe hebben wij een aantal chromatogrammen gemaakt met verzepingsprodukten van verschillende hoeveelheden van het grasextract B10G1 genoemd onder a.

Uit de uitkomsten bleek, dat bij ca. 800 mg extract een verhoging van de hoeveelheid eluaat in de tetrafracties optrad. De hiervoor verantwoordelijke stoffen

zijn geen zuren en zijn waarschijnlijk in zo grote hoeveelheid aanwezig, dat de adsorptie aan het silicagel niet meer volledig is en zij dus reeds door tetrachloorkoolstof worden geëlueerd. De maximale hoeveelheid op te brengen stof bedraagt daarom ongeveer 800 mg.

§ 2. Werkwijze ter isolering en bepaling van de vetzuren in gras en mest

A. Bijzondere benodigdheden

I. Reagentia

a. alkoholische HCl: 82 ml gec. HCl met 398 ml absolute alkohol.
b. een mengsel van 100 g KOH (vast) en 230 ml absolute alkohol.
c. alkoholische KOH: los 1 g KOH op in 25 ml alkohol 96%.
d. filtreerpapierpoeder: filtreerpapier (Whatman No. 4), gemalen in een analysemolen met zeefopeningen van 1,25 mm.
e. silicagel, bereid volgens Nijkamp (1954): telkens wordt 40 g gel gedurende 18 uur bij 150 °C geactiveerd en vervolgens boven P_2O_5 bewaard. Deze silicagel kan na twee dagen worden gebruikt.
f. neutrale alkohol: voeg per 25 ml alkohol 96% twee druppels thymolblauwoplossing toe en neutraliseer daarna met 0,1 n loog tot groen.
g. carborundumkorrels: ca. 2 mm doorsnede.

II. Apparaten en glaswerk

a. droogstoof, geschikt voor het drogen in een inert gas bij 100 °C.
b. analysemolen met zeefopeningen van 1,25 mm doorsnede.
c. vacuumdroogapparaat, waarbij tijdens het gebruik N_2 kan worden doorgeleid (zie hoofdstuk 2, § 3g en fig. 2).
d. Soxhlet-extractieapparaat, voorzien van een extractiekolf van 1500 ml inhoud met twee slijpstukken. Eén slijpstuk dient voor de aansluiting van het tussenstuk, dat ruimte biedt voor de extractiehuls; het andere slijpstuk dient voor het inbrengen van een inleidbuis voor stikstof, welke uitmondt boven de extractievloeistof. Op dit zelfde slijpstuk kan de hevel voor het overbrengen van het extract worden geplaatst. Het tussenstuk moet een doorsnede hebben van tenminste 8 cm en een werkhoogte van tenminste 30 cm (fig. 1).
e. kleminrichting voor het vasthouden van de rubberstop met toevoerbuis op het filter 6bG2 of 6bG4 tijdens het persen onder druk. Deze kleminrichting is zodanig uitgevoerd, dat de klem met een eenvoudige handgreep kan worden verwijderd (fig. 5).

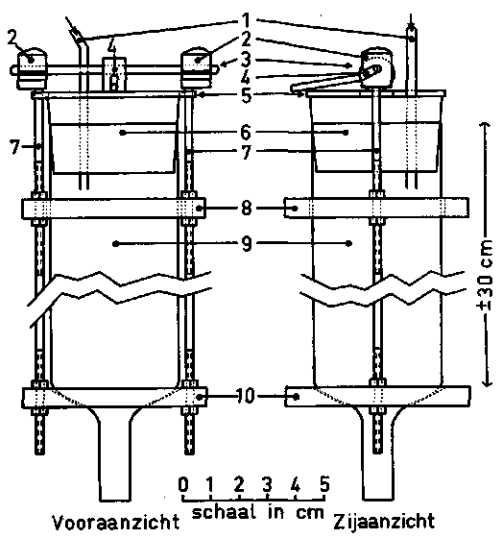


Fig. 5. *Kleminrichting voor chromatografie onder stikstofdruk.*
Verklaring der cijfers:
1. Toevoerleiding voor stikstof onder druk
2. Kop van de trekstang (7) met ligplaats voor de excenteras (3)
3. Excenteras van de drukrol (4)
4. Drukrol met handel voor het omleggen
5. Drukplaat
6. Rubberstop
8. Centreerring voor de filterbuis
9. Chromatografische kolom (glasfilter Jena 6bG2)
10. Steunring, waarvan de afstand tot 2 instelbaar is d.m.v. moeren op de trekstangen (7). Het apparaat is in gesloten toestand getekend. Na het omleggen van 4 kan de as (3) uit 2 genomen worden, waarna de drukplaat (5) en de rubberstop (6) naar boven worden afgenomen.

B. Methodiek

I. Isolering van de vetachtige stoffen uit gras en mest

a. Tijdens de gehele bewerking wordt er steeds voor gewaakt, dat geen oxydatie door de luchtzuurstof kan optreden. Daartoe wordt de lucht zoveel mogelijk door stikstof vervangen, uitgezonderd bij de bewerking genoemd onder BIb, waarbij in verband met de beschikbare apparatuur lichtgas voor dit doel wordt gebruikt.

b. Voorbereiding van het analysemonster. Het voor de analyse bestemde monster (vers gras of verse mest) wordt gedroogd bij 100 °C onder door- of overleiding van lichtgas. Het drogen wordt voortgezet totdat het gewicht van de droogrest constant geworden is. Het droge monster wordt daarna gemalen in een analysemolen (AIIb).

c. Ontsluiting van het monster. Van het gedroogde en gemalen monster wordt 60,00 g afgewogen en overgebracht in een rondbodemkolf van 2000 ml. Tevens wordt 2 maal 3 g afgewogen en gedroogd bij 100°–105 °C tot constant gewicht, ter bepaling van het droge-stofgehalte. Het monster in de rondbodemkolf wordt bevochtigd met 120 ml absolute alkohol, waarna onder voortdurend roeren 480 ml alkoholische HCl-oplossing (AIa) wordt toegevoegd. Het mengsel wordt 3 uur aan een opstijgende koeler gekookt en vervolgens gedurende $1\frac{1}{2}$ uur bij kamertemperatuur gekoeld. Nu wordt onder heftig roeren het KOH-alkoholmengsel (AIb) in de aangegeven hoeveelheid toegevoegd; de laatste resten KOH worden met 20 ml absolute alkohol overgespoeld, waarna weer 3 uur aan een opstijgende koeler wordt gekookt. Het reactiemengsel wordt snel afgekoeld en onder voortdurende koeling geneutraliseerd met gec. HCl tot zure reactie op congopapier, waarvoor $\pm$ 120 ml gec. HCl nodig is. Hierna wordt de alkohol op het kokende waterbad zo goed mogelijk afgedestilleerd. De reactiemassa wordt uit de kolf kwantitatief overgebracht in een porseleinen schaal en in het vacuumapparaat gedroogd (3–4 cm Hg, 75 °C, N_2). Nadat het gewicht van de schaal met reactiemassa constant is geworden, wordt de massa in een mortier gepoederd.

d. Extractie van de vetachtige stoffen. De gedroogde en gepoederde massa wordt overgebracht in een extractiehuls en in het Soxhlet-apparaat (AIId) geextraheerd met peroxydvrije aether. De extractie wordt voortgezet totdat de overhevelende aether kleurloos is. De aetherische oplossing wordt ingedampt tot $\pm$ 70 ml en gedurende de nacht gedroogd met watervrij Na_2SO_4. Vervolgens wordt de oplossing overgeheveld op een glasfilter 6bG2 waarop tevoren een laagje $Na_2SO_4 \cdot 0$ aq (1 cm) is gebracht. De oplossing wordt met stikstof door het filter geperst in een maatkolfje van 110 ml. Extractiekolf, hevel en filter worden gewassen met 20 ml-porties warme aether, totdat de wasvloeistof kleurloos blijft. Indien nodig wordt de inhoud van het maatkolfje, onder toevoeging van 2 carborundumkorrels, ingedampt tot 50 ml om de porties wasvloeistof ook nog in het kolfje te kunnen brengen. De inhoud van het maatkolfje wordt aangevuld tot 110 ml. Van de verkregen oplossing der vetachtige stoffen wordt 4 maal 25 ml gepipetteerd in te voren gewogen platbodemkolfjes van 100 ml. De aether wordt op het waterbad (40 °C) afgedestilleerd, waarna de extracten gedurende 3 uur in vacuo (3–4 cm Hg, 75 °C, N_2) worden gedroogd. Na afkoelen aan de lucht gedurende 15 min. kunnen de kolfjes worden gewogen.

II. Isolering van de vetzuren uit de geëxtraheerde vetachtige stoffen en bepaling van het joodadditiegetal en van het equivalentgewicht.

a. De volgens BI verkregen extracten worden achtereenvolgens aan de volgende bewerkingen onderworpen.

b. Voortgezette verzeping van het extract. Aan de inhoud van ieder der vier kolfjes met extract (zie BId) wordt 25 ml alkoholische loog (AIc) toegevoegd. Na omschudden wordt gedurende 3 uur aan een opstijgende koeler op het kokende waterbad verzeept, waarna de alkohol wordt afgedestilleerd. Het nog warme, vloeibare residu wordt door omzwenken in een dunne laag langs de wand van het kolfje verspreid teneinde het droogproces te bespoedigen en spatten te voorkomen. Vervolgens wordt gedurende $4\frac{1}{2}$ uur in het vacuumdroogapparaat gedroogd (3–4 cm Hg, 75 °C, N_2). Tenslotte laat men de kolfjes in vacuo onder N_2 afkoelen.

c. Scheiding van het verzeepte extract in onverzeepbare stoffen en zure verzepingsprodukten. Ongeveer 1 g filtreerpapierpoeder (AId) wordt met 100 ml gedestilleerd water opgeschud en vervolgens met behulp van een waterstraalluchtpomp vastgezogen op het filterplaatje van een glasfilter 6bG2. Het laagje papier wordt stevig aangestampt, waarna het water met aceton wordt verwijderd en het papierlaagje door het doorzuigen van lucht verder wordt gedroogd. Op dit laagje papier wordt 2 g papierpoeder los in het filter gebracht. De verzeepte en gedroogde massa (BIIb) wordt met behulp van een spatel, papierpoeder en een weinig petroleumaether, kwantitatief op het papierpoeder op het filter gebracht. Hierna wordt 4 maal geëlueerd met 80 ml petroleumaether, waarbij het kolfje, waarin de verzeping heeft plaatsgevonden, telkens wordt uitgewassen met de elutievloeistof. Het eluaat wordt opgevangen in een platbodemkolfje van 100 ml, dat tezamen met 8 carborundumkorrels is gewogen. Tijdens de elutie worden het papierpoeder en de verzeepte massa goed door de elutievloeistof geroerd, waarbij men er zorg voor dient te dragen, dat het vastgestampte papierlaagje niet wordt losgemaakt. Indien nodig wordt de petroleumaether met stikstof door het filter geperst (met gebruik van de kleminrichting AIIe), na gedurende ongeveer 20 min. in aanraking geweest te zijn met de verzeepte massa. Na iedere elutie worden telkens 2 van de medegewogen carborundumkorrels toegevoegd en wordt de petroleumaether afgedestilleerd. Tenslotte wordt het kolfje met het aldus verkregen onverzeepbare materiaal in vacuo gedroogd (3–4 cm Hg, 75 °C, N_2) en na 15 min. afkoelen aan de lucht gewogen. Bij het doorpersen van de elutievloeistof tijdens de vierde elutie wordt niet alle petroleumaether uit het filter geperst, maar wordt er voor gezorgd, dat de porieën van het filterplaatje en het vastgezogen papierlaagje met de elutievloeistof gevuld blijven. Dit dient om te voorkomen, dat het zwavelzuur, tijdens het nu volgende aanzuren, in deze porieën dringt en daarna in het eluaat geraakt.

Het kolfje, waarin de verzeping heeft plaatsgevonden, wordt nu bevochtigd met 2 ml H_2SO_4 40 %, waarna de inhoud wordt overgebracht op het mengsel van papierpoeder en verzeepte massa. Hieraan wordt dan nog 4 ml van dit zuur toegevoegd, hetwelk met een spatel intensief met het papierpoeder wordt gemengd. Als alles goed dooreen gewerkt is, wordt het vastgestampte laagje papierpoeder losgemaakt en door het mengsel gewerkt. Daarna wordt 15 g

watervrij Na_2SO_4 toegevoegd en nogmaals goed gemengd. Nu wordt 6 maal geëlueerd, telkens met 80 ml petroleumaether, op dezelfde wijze als hiervoor beschreven voor de winning van het onverzeepbare materiaal. Het aldus verkregen eluaat met de zure verzepingsprodukten wordt na de laatste elutie ingedampt tot 15 ml en deze oplossing wordt gebruikt voor de chromatografische scheiding.

d. Chromatografie van de zure verzepingsprodukten. Voor het vervaardigen van de adsorptiekolom wordt 7,5 g silicagel (AIe) in een filter 6bG4 (hoogte 30 cm) gebracht, met behulp van een waterstraalluchtpomp aangezogen en met een stamper vastgestampt. Het silicagel wordt bedekt met een laagje (2 mm) geprecipiteerd $BaSO_4$ om te voorkomen dat het silicagel opwervelt bij het opbrengen van de elutievloeistoffen. Nu wordt petroleumaether doorgezogen totdat alle lucht uit het silicagel is verwijderd. Dit gaat eenvoudig door telkens 75 ml petroleumaether op te brengen en door te zuigen. Juist voordat de meniscus de bovenzijde van het $BaSO_4$ bereikt, wordt het vacuum voorzichtig en langzaam opgeheven. Nadat dit 2–4 maal is gedaan, is de lucht verwijderd, hetgeen blijkt uit het volledig doorschijnend worden van het adsorbens. Wanneer het silicagel op de juiste wijze is bereid en de gewenste activiteit bezit, wordt een adsorptiekolom verkregen van 58–62 mm hoogte.

De volgens BIIc verkregen oplossing van de zure verzepingsprodukten in petroleumaether wordt uit het kolfje overgeheveld op de adsorptiekolom, waarna kolfje en hevel 3 maal worden gewassen met 5 ml warme petroleumaether. De oplossing wordt met stikstofdruk van 30–50 cm Hg in het adsorbens geperst. De stikstofdruk wordt zodanig geregeld, dat de elutiesnelheid 25 ml per 12–18 min. bedraagt. De druk wordt nu, en telkens ook later bij de volgende porties elutievloeistof, verbroken op het ogenblik, dat de meniscus de bovenzijde van het $BaSO_4$ bereikt. Er dient namelijk voor te worden gewaakt, dat geen stikstof in de adsorptiekolom dringt, daar hierdoor de adsorptie ernstig wordt verstoord. Achtereenvolgens wordt nu geëlueerd met de volgende elutievloeistoffen: 2 maal 25 ml tetrachloorkoolstof, 12 maal 25 ml benzeen, 5 maal 25 ml aethylaether en 4 maal 25 ml absolute alkohol, waarbij de laatste elutie wordt voortgezet totdat geen vloeistof meer uit het filter treedt. Deze laatste fractie is groter dan 25 ml, omdat hierbij ook de vloeistof in het adsorbens door de stikstof wordt weggedrukt. Alle fracties van 25 ml worden opgevangen in platbodemkolfjes van 50 ml, die tezamen met 2 carborundumkorrels zijn gewogen. Bij het overgaan van het ene eluens op het andere komt het scheidingsfront tussen de beide vloeistoffen na elutie van ongeveer 35 ml uit het filter, dus in de tweede fractie na de overgang. Als eerste fractie van een eluens wordt nu beschouwd de fractie, waarin het mengsel van dit eluens met het voorafgaande wordt opgevangen. Aldus verkrijgt men de volgende fracties eluaat: 2 maal petroleumaether (PAe), 2 maal tetrachloorkoolstof (T), 12 maal benzeen (Be), 5 maal aether (Ae) en 3 maal absolute alkohol (Al), tezamen dus 24 fracties.

Het eluens wordt uit de opvangkolfjes verwijderd door destillatie op het waterbad onder stikstofdoorleiding, waarna de kolfjes in vacuo worden gedroogd (3–4 cm Hg, 75 °C, N_2). Na afkoeling aan de lucht gedurende 15 min. worden de residus gewogen. Zoals gezegd werden van elk monster vier gelijke delen extract in bewerking genomen (BIIa), zodat ook vier chromatografische scheidingen van de zure verzepingsprodukten worden uitgevoerd. Op elk van de 24 residus van de eerste en derde chromatografische scheiding wordt vervolgens een bepaling van het joodadditiegetal uitgevoerd. Daarnaast wordt het equiva-

lentgewicht bepaald in de residus van de tweede en vierde chromatografische scheiding.

e. Bepaling van het joodadditiegetal volgens WIJS (NORMBLAD N 1046–50, gewijzigd). De kolfjes worden bedeeld met 3 ml tetrachloorkoolstof, waarna de residus door verwarming tot koken worden opgelost. In een groep van 8 kolfjes en 2 kolfjes voor de blancobepaling wordt nu 5,0 ml WIJS-oplossing gepipetteerd (uitgezonderd bij de eerste aetherfractie, waaraan 10 ml wordt toegevoegd). Zoals in het voorafgaande hoofdstuk beschreven is, worden de kolfjes zonder afsluiting in het donker geplaatst en na 2 uur getitreerd. Hiervoor worden 4 ml KJ-oplossing en 14 ml gedestilleerd water toegevoegd en vervolgens wordt met 0,1 n thiosulfaat getitreerd tot bijna kleurloos, waarna 5 ml stijfseloplossing wordt toegevoegd. Nu wordt onder heftig schudden, waarbij het kolfje met een kurk wordt gesloten, getitreerd tot kleurloos.

f. Bepaling van het equivalentgewicht. De kolfjes worden bedeeld met 10 ml neutrale alkohol (Alf). De residus worden door verwarming tot koken opgelost en warm getitreerd met 0,1 n loog. Bij de sterk gekleurde residus (eerste en tweede aetherfractie en eerste alkoholfractie) verdient het aanbeveling nog 2–3 druppels thymolblauwoplossing extra toe te voegen.

§ 3. TOEPASSING VAN DE UITGEWERKTE ANALYSEMETHODE BIJ EEN VERTERINGSPROEF MET VERS GRAS

a. Proefopzet. Voor deze proef werden drie koeien van het laboratorium op stal gezet en gedurende 17 dagen gevoederd met vers gras. Het proeftijdvak was verdeeld in een voorperiode van 7 dagen en een hoofdperiode van 10 dagen. De proef werd op dezelfde wijze uitgevoerd als de voorgaande (hoofdstuk II). De uitvoering van de proef en de uitkomsten der analyses worden uitvoerig beschreven door VAN ES (1961) onder proefnummer R 8.

b. De proefdieren. Hiervoor werden drie droogstaande dieren gekozen, aangezien de voeding van melkgevende dieren aan de voortdurende daling van de melkgift dient te worden aangepast, hetgeen de interpretatie der uitkomsten bemoeilijkt. In tabel 20 zijn enkele gegevens van de proefdieren verzameld.

c. De bemonstering van het gras en de mest. De verse monsters werden op dezelfde wijze verkregen als bij de voorgaande proef is beschreven. In afwijking van de voorgaande proef werden deze monsters echter in verse toestand bij lage

TABEL 20. Enkele gegevens omtrent de proefdieren

Koe	Geboorte-datum	Kalfdatum		Gewicht	Zetmeelwaarde
		laatste	eerstvolgende	kg	berekende behoefte kg
Roosje	8–1–'54	15– 9–'56	9–12–'57	504,6	2,65
Lamkje	9–5–'54	6–10–'56	5–11–'57	494,2	2,6
Klaske	voorj. '52	15– 3–'57	(niet drachtig)	536,0	2,8

temperatuur bewaard. Daarvoor werd ieder etmaal een aliquoot deel van het voedsel (in duplo, monsters A en B) en eveneens van de geproduceerde mest in grote stopflessen gebracht, waarin aldus monsters van de gehele hoofdperiode werden verzameld. De grasmonsters werden steeds bij –25 °C bewaard. De mestmonsters werden onder toevoeging van een weinig formol, bij + 2 à 5 °C bewaard. De voederresten en de daarin aanwezige kluiten klei werden eveneens in stopflessen verzameld en na afloop van de proef geanalyseerd.

d. De analyse van gras en mest. Van de verkregen monsters gras en mest werden bepaald de gehalten aan droge stof (*ds*), ruw eiwit (*re*) volgens KJELDAHL, ruw vet (*rv*) volgens de methode van het Rijkslandbouwproefstation te Maastricht, ruwe celstof (*rc*) volgens de Weender methode, minerale bestanddelen (*mb*) door verassing, werkelijk eiwit (*we*) door neerslaan met $Cu(OH)_2$, koolstof (*C*) door bepaling van het CO_2 na verbranding en het aantal kcal, dat vrijkomt per 100 g ds bij verbranding in de bom van BERTHELOT. Ten slotte werden de stikstofvrije extractstoffen of "overige koolhydraten" (*ok*) berekend met behulp van de formule: $100 - (re + rv + rc + mb) = ok$.

In verband met de toevoeging van formol bij de bewaring van de mestmonsters moet op de verkregen cijfers bij de mest nog een correctie worden toegepast. Hierbij werd aangenomen dat het formaldehyde niet vervluchtigde en bij de bepalingen in zijn geheel als "overige koolhydraten" werd teruggevonden.

De gecorrigeerde analysecijfers zijn gebruikt voor de berekening van de verteringscoëfficiënten van de componenten van het voeder, die met de hiervoor genoemde analysemethode werden bepaald. Tabel 21 geeft een overzicht van de uitkomsten dezer berekeningen (VAN ES, 1961).

TABEL 21. Verteringsproef met drie koeien (hoofdperiode 16/9–27/9 '57)

Verteringscoëfficiënten van de hoofdbestanddelen van het gras									
Koe	*ds*	*re*	*rv*	*rc*	*ok*	*mb*	*we*	*C*	kcal
Roosje	72,2	76,3	49,3	79,7	80,4	34,3	72,3	75,1	74,0
Lamkje	73,5	78,2	50,5	80,7	80,2	39,2	74,2	76,0	75,0
Klaske	72,1	70,4	50,6	79,9	83,3	32,2	71,6	75,0	73,9

e. Analyse der vetachtige stoffen. Van elk der drie monsters mest en van de grasmonsters A en B is vervolgens een aantal submonsters bij 100 °C in lichtgas gedroogd en voor de analyse der vetachtige stoffen gebruikt. De bewerking van de gedroogde monsters geschiedde geheel op de hiervoor in § 2 beschreven wijze. De uitkomsten van de analyses zijn verwerkt in tabel 22, waarbij voor de berekening van de gewichtspercentages geen rekening is gehouden met de hoeveelheden eluaat, die bij een blanco-elutie werden gevonden. De hoeveelheid "blanco-eluaat" bedroeg per volledig chromatogram maximaal 9 mg tegenover een totale hoeveelheid eluaat van gemiddeld ruim 500 mg. Een reden te meer om de hoeveelheid blanco-eluaat te verwaarlozen was het feit, dat deze hoeveelheid per elutiemiddel sterk varieerde, namelijk van ongeveer –3 tot +6 mg.

Bij de bepaling van het aantal meq zuur werd per fractie van 25 ml als blanco 0,03 ml 0,1 n loog afgetrokken, wanneer de totale titratie meer dan 0,03 ml bedroeg; de uitkomsten 0,00, 0,01, 0,02 en 0,03 ml werden als nul beschouwd. Voor de bepaling van het aantal meq dubbele bindingen (= aantal meq H, nodig voor de volledige hydrogenering van de onverzadigde bindingen) was geen blanco-correctie nodig.

De blokdiagrammen (fig. 6, 7, 8 en 9) geven het gemiddelde verloop van de chromatografie der extracten voor elk der in tabel 30 opgenomen monsters.

TABEL 22. Verteringsproef met drie koeien. Uitkomsten van de analysen der vetachtige stoffen

monster nummer	bewerkt materiaal	Extract		onverzeepbare stoffen	Zure verzepingsprodukten				Onverzadigde bindingen								Zuren							
									meq dubbele bindingen per 100 g droge stof [2]				joodadditiegetal				meq zuur per 100 g droge stof [2]				equivalentgewicht			
		g	%[1]	%[1]	benzeen-eluaat %[1]	aether-eluaat %[1]	alkohol-eluaat %[1]	totaal eluaat %[1]	benzeen-eluaat	aether-eluaat	alkohol-eluaat	totaal eluaat	benzeen-eluaat	aether-eluaat	alkohol-eluaat	totaal eluaat	benzeen-eluaat	aether-eluaat	alkohol-eluaat	totaal eluaat	benzeen-eluaat	aether-eluaat	alkohol-eluaat	totaal eluaat
B15G	gras	1,5219	–	0,70	2,40	1,10	0,08	3,60	–	–	–	–	–	–	–	–	7,1	3,6	0,13	10,9	340	308	635	331
		1,5215	–	0,68	2,04	1,29	0,08	3,45	18,9	11,7	0,5	31,2	118	115	75	115	–	–	–	–	–	–	–	–
		1,5250	–	0,76	2,18	1,36	0,15	3,71	19,4	8,6	0,6	28,7	113	80	47	98	–	–	–	–	–	–	–	–
		1,5257	–	0,78	2,11	1,34	0,09	3,55	–	–	–	–	–	–	–	–	6,4	4,0	0,17	10,6	332	335	522	337
gemiddelde		*1,5232*	*11,5*	*0,73*	*2,18*	*1,27*	*0,10*	*3,58*	*19,2*	*10,2*	*0,5*	*29,9*	*116*	*98*	*61*	*106*	*6,7*	*3,8*	*0,15*	*10,7*	*336*	*321*	*578*	*334*
B17G	gras	0,9634	–	0,71	1,92	1,13	0,11	3,18	–	–	–	–	–	–	–	–	5,8	3,5	0,20	9,5	333	327	554	335
		0,9640	–	0,67	1,83	1,04	0,10	2,98	14,9	6,7	0,5	22,1	103	81	68	94	–	–	–	–	–	–	–	–
		0,9639	–	0,74	1,80	1,14	0,15	3,10	13,7	8,7	0,7	23,1	96	97	58	95	–	–	–	–	–	–	–	–
		0,9650	–	0,67	1,73	1,34	0,17	3,19	–	–	–	–	–	–	–	–	5,4	4,0	0,17	9,6	324	335	677	334
gemiddelde		*0,9640*	*7,2*	*0,70*	*1,82*	*1,16*	*0,12*	*3,11*	*14,3*	*7,7*	*0,6*	*22,6*	*100*	*89*	*63*	*94*	*5,6*	*3,7*	*0,18*	*9,5*	*328*	*331*	*615*	*334*
B21G	gras	1,0115	–	0,68	1,51	1,43	0,11	3,05	–	–	–	–	–	–	–	–	4,4	4,4	0,16	9,0	340	324	675	338
		1,0065	–	0,61	1,77	1,31	0,08	3,18	13,6	12,3	0,3	26,3	98	119	56	105	–	–	–	–	–	–	–	–
		1,0054	–	1,03	1,58	1,12	0,09	2,81	–	–	–	–	–	–	–	–	5,1	3,8	0,15	9,0	312	296	569	311
		1,0140	–	0,73	1,54	1,26	0,09	2,89	11,9	12,2	0,6	24,7	98	123	85	108	–	–	–	–	–	–	–	–
gemiddelde		*1,0093*	*7,6*	*0,76*	*1,60*	*1,28*	*0,09*	*2,98*	*12,7*	*12,3*	*0,5*	*25,5*	*98*	*121*	*70*	*107*	*4,8*	*4,1*	*0,15*	*9,0*	*326*	*310*	*622*	*325*
B22M	mest	1,9263	–	3,52	1,77	1,40	0,09	3,28	1,7	6,8	0,5	8,9	12	62	66	35	–	–	–	–	–	–	–	–
	Lamkje	1,9289	–	3,02	1,79	1,68	0,12	3,60	–	–	–	–	–	–	–	–	4,2	4,6	0,20	9,0	427	367	600	400
		1,9329	–	2,53	1,98	1,74	0,11	3,85	2,2	9,1	0,6	12,0	14	67	67	39	–	–	–	–	–	–	–	–
		1,9369	–	2,47	1,91	1,46	0,10	3,52	–	–	–	–	–	–	–	–	4,1	3,5	0,12	7,8	461	414	805	451
gemiddelde		*1,9312*	*14,5*	*2,89*	*1,86*	*1,57*	*0,11*	*3,56*	*1,9*	*8,0*	*0,5*	*10,4*	*13*	*64*	*67*	*37*	*4,2*	*4,1*	*0,16*	*8,4*	*444*	*390*	*702*	*526*
B13M	mest	1,6264	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Lamkje	1,6355	–	2,72	1,59	1,48	0,12	3,18	–	–	–	–	–	–	–	–	2,9	3,5	0,11	6,6	538	417	1093	429
		1,6305	–	2,61	1,64	1,48	0,18	3,31	1,6	9,3	0,8	11,8	12	80	60	45	–	–	–	–	–	–	–	–
		1,6334	–	2,86	1,73	1,21	0,12	3,08	–	–	–	–	–	–	–	–	3,1	2,7	0,12	5,9	561	453	1029	521
gemiddelde		*1,6314*	*12,3*	*2,73*	*1,65*	*1,39*	*0,14*	*3,19*	*1,6*	*9,3*	*0,8*	*11,8*	*12*	*80*	*60*	*45*	*3,0*	*3,1*	*0,12*	*6,3*	*549*	*435*	*1061*	*475*
B18M	mest	2,4204	–	3,36	1,88	1,93	0,17	4,02	–	–	–	–	–	–	–	–	4,2	5,2	0,28	9,8	437	368	608	411
	Lamkje	2,4175	–	2,72	2,06	1,89	0,20	4,18	3,1	9,6	1,0	13,7	19	64	66	49								

gemiddelde		*2,4183*	*10,2*	*2,57*	*2,02*	*1,62*	*0,13*	*4,36*	*3,1*	*9,0*	*1,1*	*14,3*	*20*	*68*	*51*	*38*	*4,1*	*4,1*	*0,23*	*9,3*	*424*	*353*	*844*	*398*
B19M	mest	2,5421	–	2,45	2,03	1,66	0,09	3,79	2,6	9,8	0,8	13,3	16	75	108	44	–	–	–	–	–	–	–	–
	Roosje	2,4610	–	2,27	2,44	2,12	0,19	4,75	–	–	–	–	–	–	–	–	5,5	4,6	0,19	10,3	443	463	1004	462
		2,4630	–	2,50	2,55	1,86	0,12	4,59	–	–	–	–	–	–	–	–	5,3	4,3	0,10	9,8	481	434	1162	470
		2,4676	–	2,80	2,51	2,19	0,16	4,90	3,1	10,8	0,8	14,7	16	62	60	38	–	–	–	–	–	–	–	–
gemiddelde		*2,4609*	*18,4*	*2,50*	*2,38*	*1,96*	*0,14*	*4,51*	*2,8*	*10,3*	*0,8*	*14,0*	*16*	*69*	*84*	*41*	*5,4*	*4,4*	*0,14*	*10,0*	*462*	*449*	*1083*	*466*
B20M	mest	1,5486	–	2,57	1,69	1,44	0,07	3,21	1,5	8,7	0,5	10,7	12	76	78	42	–	–	–	–	–	–	–	–
	Roosje	1,5493	–	3,12	1,95	1,22	0,11	3,32	–	–	–	–	–	–	–	–	5,1	3,3	0,17	8,5	386	370	682	388
		1,5476	–	2,30	2,05	1,50	0,11	3,67	2,7	8,5	0,7	11,9	17	71	81	41	–	–	–	–	–	–	–	–
		1,5533	–	2,39	2,04	1,33	0,03	3,42	–	–	–	–	–	–	–	–	5,0	3,6	0,10	8,6	411	371	330	395
gemiddelde		*1,5497*	*11,6*	*2,60*	*1,93*	*1,37*	*0,08*	*3,40*	*2,1*	*8,6*	*0,6*	*11,3*	*14*	*74*	*80*	*42*	*5,0*	*3,4*	*0,14*	*8,6*	*399*	*371*	*506*	*392*
B14M	mest	1,9231	–	2,95	2,40	1,66	0,20	4,28	3,4	7,8	0,9	12,1	18	59	57	36	–	–	–	–	–	–	–	–
	Klaske	1,9129	–	2,96	2,25	1,63	0,17	4,05	–	–	–	–	–	–	–	–	5,5	4,8	0,20	10,2	412	358	858	396
		1,9267	–	3,02	2,31	1,66	0,15	4,15	2,6	8,3	0,8	11,7	14	63	64	36	–	–	–	–	–	–	–	–
		1,9286	–	3,09	2,20	1,62	0,17	4,00	–	–	–	–	–	–	–	–	5,8	4,6	0,11	10,5	379	356	1517	381
gemiddelde		*1,9228*	*14,5*	*3,01*	*2,29*	*1,64*	*0,17*	*4,12*	*3,0*	*8,0*	*0,8*	*11,9*	*16*	*61*	*61*	*36*	*5,6*	*4,7*	*0,15*	*10,4*	*395*	*357*	*1187*	*388*
B16M	mest	2,3703	–	2,86	2,64	2,15	0,19	4,99	3,9	9,9	0,8	14,6	19	58	51	37	–	–	–	–	–	–	–	–
	Klaske	2,3815	–	3,32	2,34	2,06	0,16	4,58	–	–	–	–	–	–	–	–	6,0	6,3	0,20	12,5	391	325	827	365
		2,3742	–	2,24	2,79	2,17	0,28	5,25	–	–	–	–	–	–	–	–	6,1	5,7	0,32	12,2	456	380	860	431
		2,3765	–	2,02	2,52	1,83	0,13	4,58	4,3	9,3	0,6	14,4	22	64	63	40	–	–	–	–	–	–	–	–
gemiddelde		*2,3756*	*18,2*	*2,61*	*2,57*	*2,05*	*0,19*	*4,85*	*4,1*	*9,6*	*0,7*	*14,5*	*20*	*61*	*57*	*39*	*6,0*	*6,0*	*0,26*	*12,4*	*424*	*353*	*844*	*398*
gemiddelde voor de verschillende uitgangsstoffen over alle extracten	**gras**			**0,73**	**1,87**	**1,24**	**0,10**		**15,4**	**10,0**	**0,5**		**105**	**103**	**65**		**5,7**	**3,9**	**0,16**		**330**	**321**	**605**	
	mest Lamkje			**2,80**	**1,86**	**1,60**	**0,15**		**2,4**	**9,0**	**0,8**		**16**	**69**	**64**		**3,9**	**4,0**	**0,17**		**474**	**402**	**822**	
	mest Roosje			**2,55**	**2,16**	**1,67**	**0,11**		**2,5**	**9,4**	**0,7**		**15**	**71**	**82**		**5,2**	**3,9**	**0,14**		**430**	**410**	**794**	
	mest Klaske			**2,81**	**2,43**	**1,85**	**0,18**		**3,5**	**8,8**	**0,8**		**18**	**61**	**59**		**5,8**	**5,3**	**0,21**		**409**	**355**	**1015**	

[1]) Berekend op de droge stof van het gras c.q. de mest. [2]) Droge stof van het gras c.q. de mest.

§ 4. Bespreking der uitkomsten van de verteringsproef

I. Verteringscoëfficiënten van de belangrijkste groepen van nutriënten

Ten opzichte van de uitkomsten van het onderzoek naar de gewoonlijk bij een verteringsproef bepaalde hoofdgroepen van nutriënten kan worden opgemerkt, dat deze vrij goed overeenstemmen met de waarden die men gemeenlijk vindt. Het gehalte aan ds in het gras lag aan de lage kant, hetgeen zijn oorzaak vond in het natte weer ten tijde van de proef. Het gehalte aan *mb* was door dezelfde oorzaak aan de hoge kant, omdat zeer veel klei aan het vochtige gras bleef hangen.

De overeenstemming tussen de verteringscoëfficiënten voor de onderscheiden bestanddelen van het voeder bij de drie koeien is zeer goed (tabel 21). Uit de uitkomsten van dit deel van het onderzoek mag de conclusie worden getrokken, dat de verteringsproef op redelijke wijze is verlopen en dat mag worden verwacht dat ook de vertering van de vetachtige stoffen op normale wijze verlopen zal zijn.

II. Vetachtige stoffen

Allereerst dient er op te worden gewezen, dat de overeenstemming der uitkomsten, zowel die tussen de vier chromatogrammen van één extract als die tussen de gemiddelden van duplo-extracties (tabel 22), niet zo goed is als de voorafgaande proeven hadden doen verwachten. De spreiding in de uitkomsten der benzeen- en aether-eluaten bedraagt 10–20%. Voor de alkohol-eluaten is de spreiding veel groter, waarvoor echter in de eerste plaats de geringe hoeveelheden residu, die hierbij in het spel zijn, verantwoordelijk moeten worden gesteld. Ondanks deze niet geheel bevredigende overeenstemming zijn de uitkomsten voor de benzeen- en aether-eluaten toch wel van dien aard, dat wij gemeend hebben hieruit enkele gevolgtrekkingen te mogen maken.

In tabel 22 werden geen uitkomsten voor de petroleum- en tetra-eluaten opgenomen, omdat deze nooit meer stof bevatten dan in de overeenkomstige eluaten van blancochromatogrammen werd aangetroffen. Deze uitkomsten zijn wel verwerkt in de figuren 6 t/m 9, doch zij zullen verder niet worden besproken.

Een en ander willen wij doen aan de hand van tabel 23. Hierin zijn op de regels 1 t/m 4 de gemiddelde uitkomsten der analyses verzameld. Op de regels 5, 6 en 7 zijn de cijfers vermeld, die zijn verkregen door de uitkomsten voor de mest te betrekken op 100 g ds van het opgenomen gras, door vermenigvuldiging met de factor

$$\frac{100 - \text{verteringscoëfficiënt ds gras}}{100}$$

Door de aldus verkregen waarden af te trekken van de overeenkomstige waarden voor 100 g ds gras konden wij berekenen welke hoeveelheden per 100 g ds gras werden "verteerd" (regels 8, 9, 10 en 11).

Uit de bovenstaande gegevens werden het J-getal en het equivalentgewicht van de "verteerde" zuren berekend. De uitkomsten en de gemiddelden over de drie koeien zijn eveneens weergegeven in de regels 8, 9, 10 en 11 van tabel 23. Ten slotte zijn nog de schijnbare verteringscoëfficiënten voor de drie koeien en de gemiddelden daarvan in deze tabel opgenomen (regels 12, 13, 14 en 15).

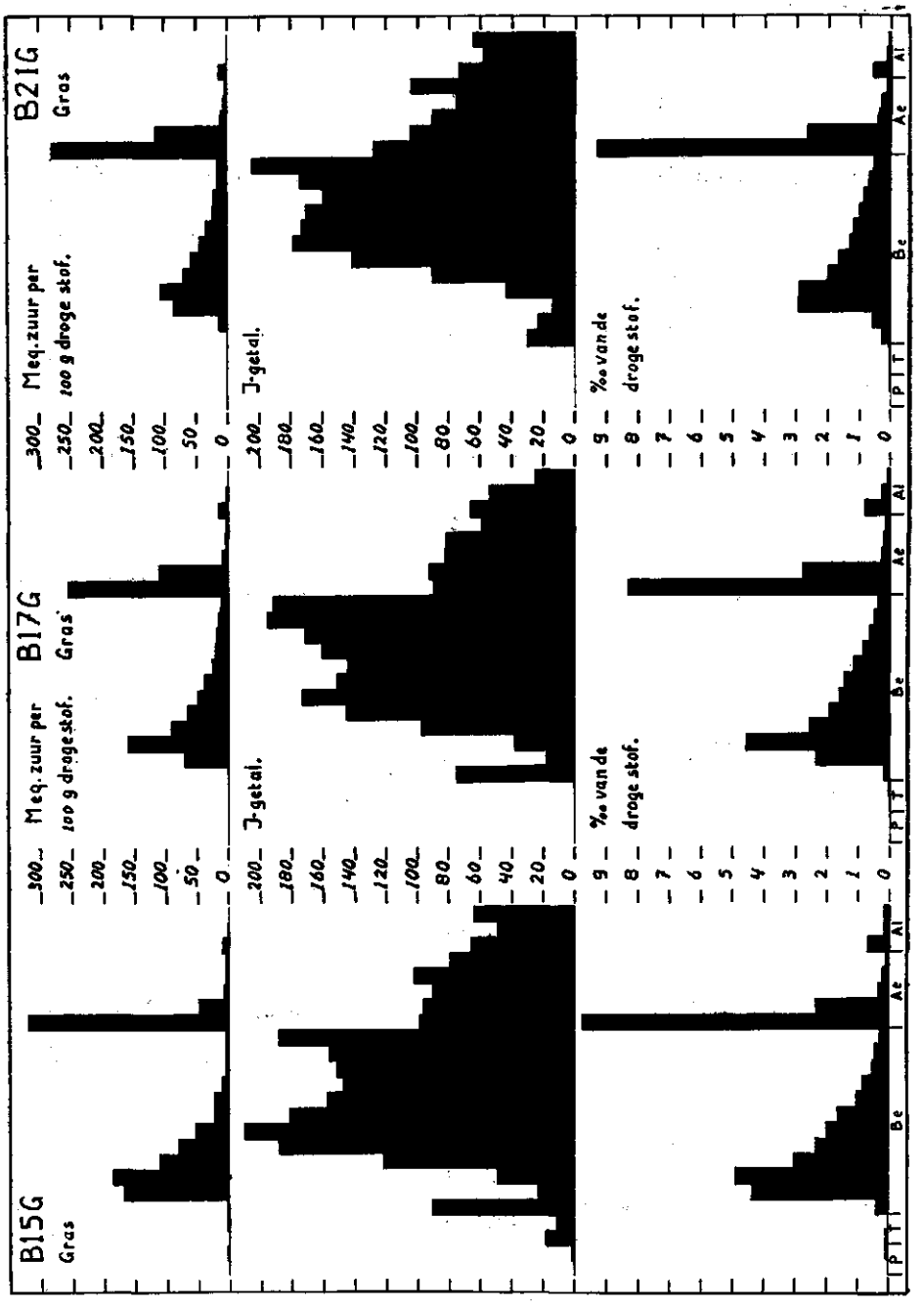


FIG. 6. Overzicht van het gemiddelde verloop der chromatografie van de zure verzepingsprodukten van het aetherische grasextract.
Verklaring der figuur: van links naar rechts de verkregen uitkomsten, resp. uitgaande van de grasextracten B15G, B17G en B21G.
Van beneden naar boven: de hoeveelheid eluaat per fractie uitgedrukt in ‰ van de droge stof van het betrokken grasmonster; het J-getal van het eluaat per fractie; het aantal meq zuur per fractie, omgerekend per 100 g droge stof van het betrokken monster.
Abscis van elk diagram: achtereenvolgende fracties van 25 ml der onderscheiden eluentia, namelijk P = petroleumaether, T = tetrachloorkoolstof, Be = benzeen, Ae = aether en Al = absolute alkohol.

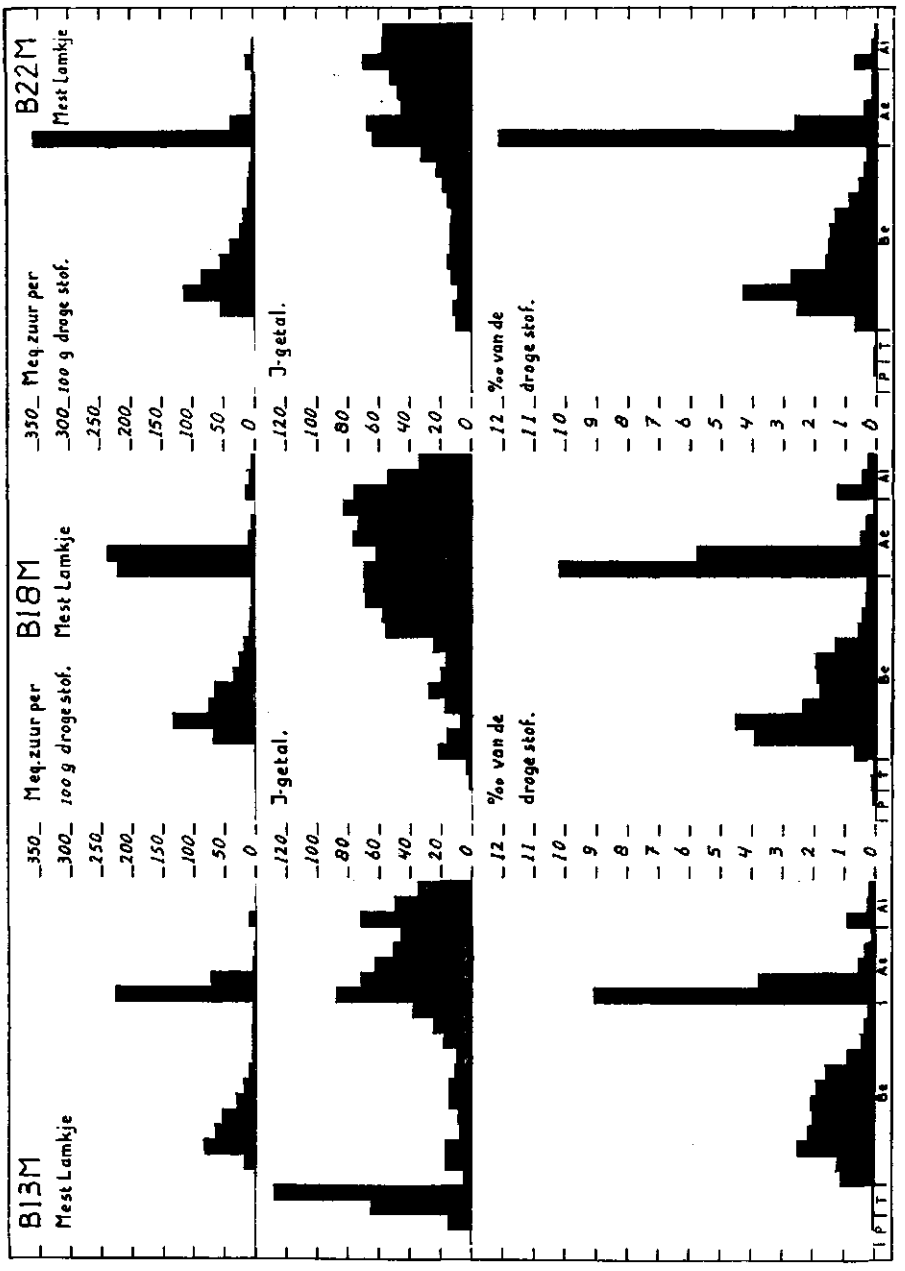


FIG. 7. Overzicht van het gemiddelde verloop der chromatografie van de zure verzepingsprodukten van het aetherische extract van de mest van koe Lamkje.
Verklaring van de figuur: van links naar rechts de verkregen uitkomsten, resp. uitgaande van de mestextracten B13M, B18M en B22M.
Zie verder verklaring bij fig. 6.

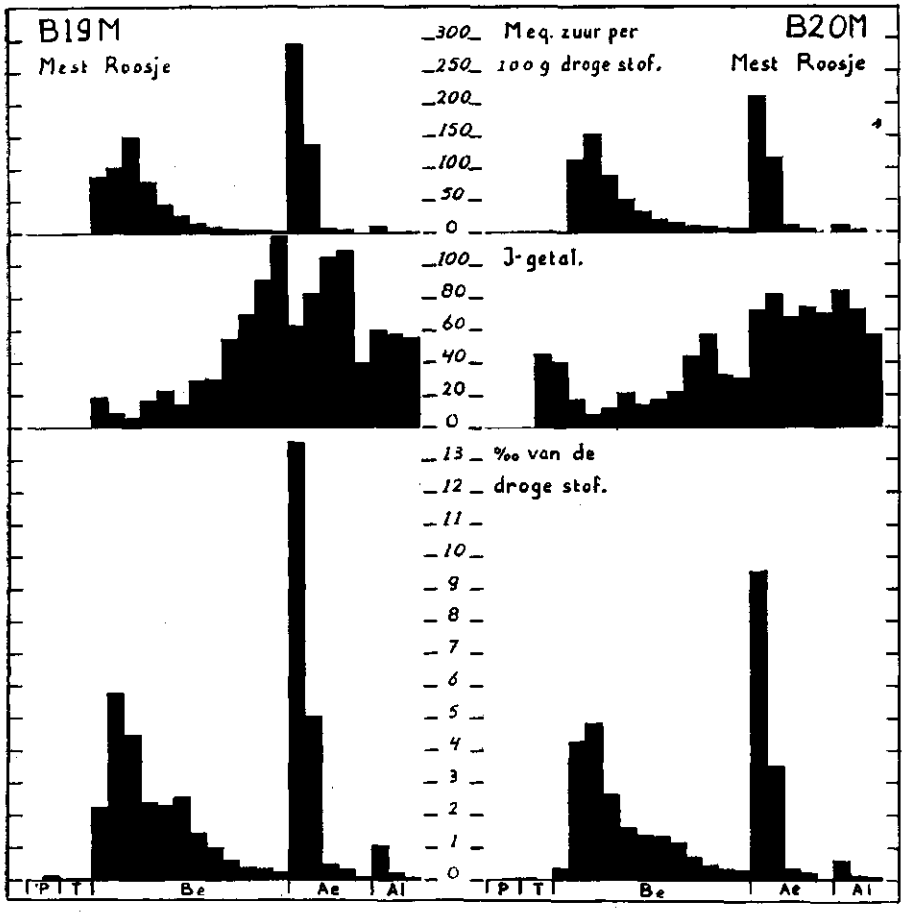


FIG. 8. Overzicht van het gemiddelde verloop van de chromatografie van de zure verzepingsprodukten van het aetherische extract van de mest van koe Roosje.
Verklaring van de figuur: van links naar rechts de verkregen uitkomsten, resp. uitgaande van de mestextracten B19M en B20M.
Zie verder verklaring bij fig. 6.

a. *De benzeen-eluaten.* Allereerst richten wij onze aandacht op de uitkomsten voor de met benzeen elueerbare stoffen. Het blijkt, dat het gemiddelde equivalentgewicht der zuren uit het gras 330 bedraagt, dat van die uit de mest 438, terwijl het berekende equivalentgewicht voor de "verteerde" vetzuren 296 bedraagt. Ter oriëntering geven wij het equivalentgewicht van linolzuur $C_{18}H_{32}O_2$, dat 280 bedraagt. Nu is het een algemeen bekend feit dat het gemiddelde equivalentgewicht van de vetzuren uit echte vetten, zowel van dierlijke als van plantaardige herkomst, altijd omstreeks 280 bedraagt. Dit stemt dus goed overeen met het gemiddelde equivalentgewicht der "verteerde" zuren. Voor de herkomst van de zuren met de hogere equivalentgewichten dient men te denken aan de vetzuren, die afkomstig zijn van de wasachtige stoffen welke een deel van de cuticula der grassen vormen. Hierin worden inderdaad vetzuren aangetroffen

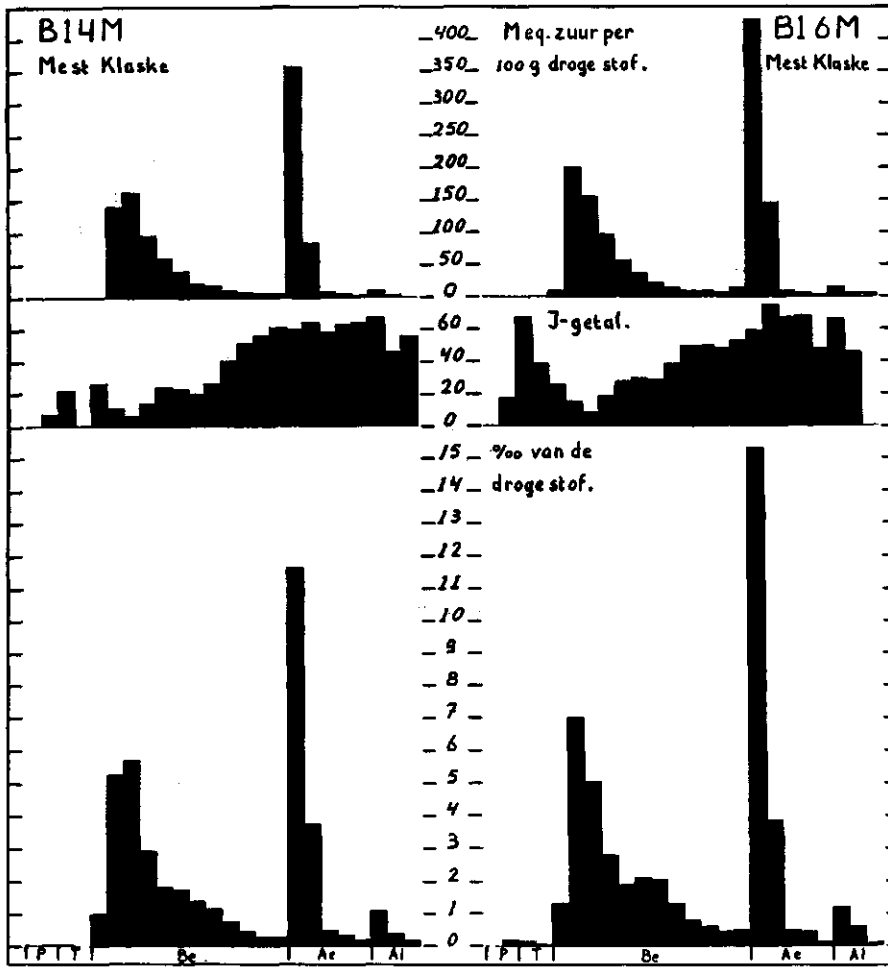


FIG. 9. Overzicht van het gemiddelde verloop der chromatografie van de zure verzepingsprodukten van het aetherische extract van de mest van koe Klaske.
Verklaring van de figuur: van links naar rechts de verkregen uitkomsten, resp. uitgaande van de mestextracten B14M en B16M.
Zie verder verklaring bij fig. 6.

met lange koolstofketens. Het gemiddelde equivalentgewicht van de onverteerde zuren komt overeen met een zuur van ongeveer de samenstelling $C_{28}H_{57}COOH$ (438). Dit geeft ons dus een indirekte aanwijzing dat de wasachtige stoffen van het gras niet door het organisme worden geresorbeerd. Deze aanwijzing wordt nog versterkt door het feit, dat van de onverzeepbare stoffen vrijwel niets wordt verteerd. Deze groep stoffen zal toch voor een groot deel bestaan uit de wasalkoholen en de paraffinen, welke tezamen met de vetzuren deelnemen aan de opbouw van de wasachtige stof.

Uit de analysecijfers betreffende het joodadditievermogen blijkt, dat de onverzadigde verbindingen, voorzover deze door benzeen worden geëlueerd,

TABEL 23. Verteringsproef met drie koeien

Berekening van hoeveelheid en eigenschappen der verteerde vetachtige stoffen en van de verteringscoëfficiënten

		verteringscoëfficiënt van ds gras	onverzeepbare stoffen	Zure verzepingsprodukten														
				met benzeen elueerbaar					met aether elueerbaar					met alkohol elueerbaar				
				g	meq zuur	equivalentgewicht der zuren	meq dubbele binding	joodadditiegetal	g	meq zuur	equivalentgewicht der zuren	meq dubbele binding	joodadditiegetal	g	meq zuur	equivalentgewicht der zuren	meq dubbele binding	joodadditiegetal
	Hoeveelheden per 100 g ds gras c.q. mest																	
1	gras		0,73	1,87	5,7	330	15,4	105	1,24	3,9	321	10,0	103	0,10	0,16	605	0,5	65
2	mest Roosje	72,23	2,55	2,16	5,2	430	2,5	15	1,67	3,9	410	9,4	71	0,11	0,14	794	0,7	82
3	mest Lamkje	73,53	2,80	1,86	3,9	474	2,4	16	1,60	4,0	402	9,0	69	0,15	0,17	822	0,8	64
4	mest Klaske	72,14	2,81	2,43	5,8	409	3,5	18	1,85	5,3	355	8,8	61	0,18	0,21	1015	0,8	59
	Hoeveelheden in de mest uitgescheiden per 100 g ds gras																	
5	Roosje	–	0,71	0,60	1,4	430	0,7	15	0,46	1,1	410	2,6	71	0,03	0,04	794	0,2	82
6	Lamkje	–	0,74	0,49	1,0	474	0,6	16	0,43	1,1	402	2,4	69	0,04	0,04	822	0,2	64
7	Klaske	–	0,78	0,68	1,6	409	1,0	18	0,52	1,5	355	2,5	61	0,05	0,06	1015	0,2	59
	Per 100 g ds gras "schijnbaar" verteerde hoeveelheden																	
8	Roosje	–	0,02	1,3	4,2	299	14,7	147	0,78	2,8	279	7,4	121	0,07	0,12	610[a]	0,3	59[a]
9	Lamkje	–	–0,01	1,4	4,7	296	14,8	136	0,81	2,8	289	7,7	120	0,07	0,12	540[a]	0,3	59[a]
10	Klaske	–	–0,05	1,2	4,1	293	14,4	154	0,72	2,4	302	7,6	133	0,05	0,10	540[a]	0,3	74[a]
11	*gemiddelde*	–	*–0,01*	*1,3*	*4,3*	*296*	*14,6*	*146*	*0,77*	*2,7*	*290*	*7,6*	*125*	*0,06*	*0,11*	*560[a]*	*0,3*	*64[a]*
	"Schijnbare" verteringscoëfficiënten																	
12	Roosje	–	+3	68	75	–	96	–	63	72	–	74	–	70[a]	75[a]	–	65[a]	–
13	Lamkje	–	–2	74	82	–	96	–	66	73	–	76	–	63[a]	75[a]	–	58[a]	–
14	Klaske	–	–7	64	71	–	94	–	58	62	–	76	–	52[a]	63[a]	–	60[a]	–
15	*gemiddelde*	–	*–2*	*68*	*76*	–	*95*	–	*62*	*69*	–	*75*	–	*62[a]*	*71[a]*	–	*61[a]*	–

[a] Onbetrouwbaar i.v.m. geringe hoeveelheid stof in deze elutiegroep

vrijwel volledig worden "verteerd". Het J-getal dezer zuren uit het gras bedraagt namelijk gemiddeld 105, dat voor de overeenkomstige stoffen uit de mest 16. Het J-getal van de "verteerde" zuren bedraagt gemiddeld 146. Ter vergelijking dienen de J-getallen voor oliezuur, linolzuur en linoleenzuur, resp. 90, 181 en 274. Uit de diagrammen (fig. 6 tot en met 9) blijkt, dat in het gras met benzeen elueerbare zuren worden aangetroffen met J-getallen boven 200, terwijl in de mest op enkele uitzonderingen na (bij zeer geringe hoeveelheden stof per fractie) geen J-getallen boven 50 werden gevonden.

Uit hetgeen hiervoor gezegd is over het J-getal en het equivalentgewicht van de zuren uit gras en mest volgt, dat de met benzeen elueerbare zuren uit het gras voor een groot deel bestaan uit vetzuren met ongeveer 18 C-atomen en meerdere dubbele bindingen per molecuul, welke zuren preferent worden "verteerd". De verteringscoëfficiënten wijzen dit uit; deze bedragen voor het gewicht van de met benzeen elueerbare stof gemiddeld 68, voor de meq zuur 76 en voor de meq dubbele bindingen (= milligramatomen H nodig voor verzadiging der dubbele bindingen) 95.

b. De aether-eluaten. Ten aanzien van de met aether elueerbare zuren zijn de uitkomsten veel minder duidelijk, in de eerste plaats doordat wij er niet in geslaagd zijn uit te maken welke soort zuren in dit eluaat worden aangetroffen. Zoals reeds in hoofdstuk 2 is beschreven, wordt van oliezuur en linolzuur (natuurlijke produkten) en van de gemengde vetzuren uit lijnolie een groot deel door benzeen geëlueerd, waarna echter door aether ook nog een belangrijke hoeveelheid zuren wordt geëlueerd. Ook is daarbij aangetoond, dat er geen sprake is van oververzadiging van het adsorbens of van omzettingen gedurende de bewerkingen.

Bij het beschouwen van de uitkomsten valt het op, dat bij deze groep stoffen dezelfde tendenzen zijn te vinden als bij die in de benzeen-eluaten, doch dat deze tendenzen minder sterk zijn. Zo is het equivalentgewicht der zuren uit het gras 321 en dat voor de overeenkomstige zuren uit de mest gemiddeld 389. Voor het equivalentgewicht der "verteerde" zuren berekenden wij 290. Dit is ongeveer gelijk aan het equivalentgewicht dat wij vonden voor de met benzeen elueerbare zuren, die werden "verteerd". Ook de voorkeur voor het "verteren" van de zuren met lagere equivalentgewichten is ongeveer dezelfde. De verteringscoëfficiënt voor het gewicht der "verteerde" stof bedraagt 62, voor de meq zuur 69, tegen resp. 68 en 76 voor de benzeen-eluaten.

De voorkeur voor het opnemen van onverzadigde verbindingen blijkt echter veel minder sterk te zijn. Het J-getal der zuren uit het gras bedraagt 103, dat der zuren uit de mest 67. Het berekende J-getal der "verteerde" zuren bedraagt 125. De verteringscoëfficiënt voor de meq dubbele bindingen is 75 tegen 95 bij de benzeen-eluaten. Bij de chromatografie bleek ook, dat bij het grasextract in deze fracties geen hogere J-getallen dan 120 werden aangetroffen, terwijl daartegenover bij de overeenkomstige fracties uit de mest geen extreem lage J-getallen werden gevonden, in tegenstelling met hetgeen wij bij de benzeen-eluaten hebben gezien. Het is dan ook niet waarschijnlijk, dat de met aether elueerbare onverzadigde zuren uit het gras en de mest grote hoeveelheden linolzuur of linoleenzuur bevatten, aangezien men zich niet voor kan stellen waarom deze dan niet eveneens preferent worden opgenomen. Wij hellen over tot de mening, dat deze zuren zich in hun sterische configuratie en/of de vorm van hun koolstofskelet duidelijk onderscheiden van linolzuur en linoleenzuur.

c. De absolute alkohol-eluaten. De uitkomsten voor de met absolute alkohol elueerbare zuren zijn, doordat zij betrekking hebben op zeer geringe hoeveelheden stof weinig betrouwbaar. Wij willen dan ook slechts wijzen op het feit, dat uit de cijfers geen voorkeur voor het opnemen van onverzadigde zuren valt op te maken. Verdere conclusies zouden wij aan deze cijfers niet willen verbinden.

Ten slotte willen wij nog opmerken dat, ondanks de grote spreiding in de uitkomsten der afzonderlijke analyses, de overeenstemming in de verteringscoëfficiënten voor de onderscheiden componenten en radicalen nog zeer redelijk is te noemen. Wij achten het daarom gerechtvaardigd nog enkele beschouwingen aangaande het belang van de zuren uit het gras voor de voeding van het rundvee en in het bijzonder voor de eigenschappen van het melkvet te geven.

§ 5. Beschouwingen naar aanleiding van de uitkomsten van de verteringsproef

Wij zullen bij deze beschouwingen uitgaan van de formule voor de berekening van de voederbehoefte van runderen, zoals deze is opgesteld door Frederiksen (1931). Deze formule luidt:

$$Z = \frac{G}{300} + 1 + \frac{M}{9} + \frac{MV}{24}, \qquad (1)$$

hierin is Z de behoefte aan zetmeelwaarde in kg per dag voor een koe met gewicht G kg en een produktie van M kg melk per dag met V % vet. Wij willen nu nagaan wat de invloed kan zijn van de geresorbeerde zuren op het joodadditiegetal van het melkvet. Hiertoe dient de formule van Frederiksen te worden omgewerkt. Nu is:

$$K = 10MV \text{ of } MV = \frac{K}{10} \text{ of } M = \frac{K}{10V}, \qquad (2)$$

waarin K = vetproduktie in grammen per dag. Bij invoering van (2) in (1) gaat deze vergelijking over in:

$$Z = \frac{G}{300} + 1 + \frac{K}{90V} + \frac{K}{240}. \qquad (3)$$

Voorts is:

$$D = Z\frac{100}{S}, \qquad (4)$$

waarin D = behoefte aan droge stof in kg per dag van een voeder met zetmeelwaarde S kg per 100 kg ds.

Deze hoeveelheid droge stof bevat een aantal meq onverzadigde bindingen in de vorm van onverzadigde vetzuren, waarvan een deel zal worden geresorbeerd. Uitgaande van de hypothese van Brouwer (1932a), dat de hoeveelheid dezer geresorbeerde zuren sterk gecorreleerd is met het J-getal van het melkvet, veronderstellen wij dat niet deze zuren zelve, doch wel de daarin aanwezige dubbele bindingen, onafhankelijk van G, V, M en K, vrijwel volledig in het melkvet worden verwerkt. Met andere woorden: er bestaat in het metabolisme een onafhankelijk mechanisme, dat de onverzadigde bindingen voor de melkvetsynthese reserveert. Hiervoor zijn bij onze huidige kennis van het verloop van

de melkvetsynthese geen bewijzen aan te voeren. Wel zijn er enkele aanwijzingen te vinden om aan te tonen, dat wij geen ernstige fout maken bij deze veronderstelling.

In de eerste plaats de sterke voorkeur voor de "vertering" van onverzadigde zuren (95% van de met benzeen en 75% van de met aether elueerbare onverzadigde zuren), zoals uit ons onderzoek blijkt. Nu wijst echter een onderzoek van SHORLAND e.a. (1957) er op, dat onverzadigde vetzuren in de pens voor een deel (partieel) gehydreerd zouden worden. Bij incubatie van 5 g vetzuur met 700 ml pensinhoud gedurende 48 uur werd bij oliezuur ca. 70% en bij linolzuur ca. 65% van de onverzadigde bindingen in de vetzuren teruggevonden. Voor linoleenzuur waren de uitkomsten niet betrouwbaar, maar werd tenminste 35% der dubbele bindingen in de vetzuren teruggevonden. De betekenis van deze proeven is echter twijfelachtig, daar ten eerste *in vivo* een groot deel van het voeder de pens reeds heeft verlaten na 48 uur. Ten tweede is een dosis van 5 g vetzuur per 700 ml pensinhoud zeer hoog en ten derde bestaat *in vivo* nog de mogelijkheid, dat de onverzadigde vetzuren door de penswand worden opgenomen. Ten vierde volgt uit enkele voederproeven van BROUWER e.a. (1937), dat tenminste 90% der dubbele bindingen in de vetzuren uit het voeder in het melkvet wordt teruggevonden, hetgeen tezamen met het feit, dat het rund niet in staat is zelf onverzadigde vetzuren te synthetiseren (POPJAK, 1952), aantoont dat de hydrogenering van de onverzadigde vetzuren in de pens niet van veel betekenis kan zijn.

In de tweede plaats is belangrijk, dat de samenstelling van de lichaamsvetten slechts in geringe mate afhangt van de samenstelling van de voedervetten, in het bijzonder voor wat betreft de onverzadigde vetzuren (DAHL, 1957).

In de derde plaats wijst de sterke stijging van de onverzadigdheid van het melkvet bij hongerende dieren (voeding onder de norm) eveneens in dezelfde richting. Onder deze omstandigheden zal het organisme immers zoveel mogelijk voeder- en lichaamsvetten mobiliseren en voor de instandhouding van de levensprocessen afbreken. Indien er echter een onafhankelijk mechanisme voor de melkvetsynthese bestaat, zal dit voortgaan met de reservering der onverzadigde vetzuren. De verzadigde vetzuren daarentegen zullen in verhoogde mate worden verbrand en dus niet voor de synthese beschikbaar zijn. Hierdoor zullen in het melkvet verhoudingsgewijs meer onverzadigde vetzuren worden ingebouwd dan onder normale omstandigheden. Hieruit volgt, dat het J-getal van het melkvet sterker zal stijgen dan overeenkomt met de theoretische stijging ten gevolge van de aanvankelijk geringe daling van de vetproduktie.

Op grond van de voorgaande beschouwing is het mogelijk het aantal meq dubbele bindingen, dat in het melkvet wordt verwerkt als volgt uit te drukken:

$$U = 10fED = 10fEZ\frac{100}{S}. \qquad (5)$$

Hierin is

U = aantal meq dubbele bindingen, dat per dag in het melkvet wordt verwerkt;

f = de constante fractie, die van de geresorbeerde dubbele bindingen in het melkvet wordt verwerkt;

E = aantal meq dubbele bindingen, dat per 100 g ds van het voeder wordt geresorbeerd.

Ten slotte nemen wij nog aan, dat deze zuren de enige bron zijn waaruit het rund onverzadigde vetzuren voor het melkvet kan bereiden. Door POPJAK (1952) is namelijk bij de geit aangetoond, dat de synthese van oliezuur uit radioactief gemerkt acetaat vrijwel nihil is. Wellicht is de geringe hoeveelheid radioactiviteit, welke in het oliezuur werd aangetroffen, slechts veroorzaakt door een partiële synthese, namelijk verlenging van een onverzadigd vetzuur met een of meer C_2H_4-groepen of door overdracht van dubbele bindingen aan radioactief gemerkte verzadigde vetzuren. Alles samengenomen mogen wij aannemen dat de invloed van de eigen synthese onbelangrijk is. Ook andere bronnen van onverzadigde vetzuren zijn (afgezien van het lichaamsvet bij ondervoeding) niet bekend. Wij kunnen nu het J-getal (J) van het melkvet berekenen:

$$J = \frac{U}{1000} \times 126{,}9 \times \frac{100}{K}. \tag{6}$$

Invoering van (5) in (6) geeft:

$$J = 10fEZ\,\frac{100}{S} \times \frac{126{,}9}{1000} \times \frac{100}{K}, \tag{7}$$

waarna invoering van (3) in (7) en herleiding ons tenslotte de volgende formule geeft:

$$J = \frac{fE}{S}\left(42{,}3\,\frac{G + 300}{K} + 141\,\frac{1}{V} + 52{,}875\right). \tag{8}$$

Nogmaals zij er op gewezen, dat deze formule slechts geldt wanneer voldaan is aan alle hiervóór genoemde hypothesen en het dier voorts precies opneemt wat het nodig heeft voor lichaamsonderhoud en melkproduktie. Zodra het dier voedsel op gaat nemen voor de eigen groei of voor de ontwikkeling van het foetus wordt aan de formule van FREDERIKSEN nog een extra term toegevoegd, welke geheel onafhankelijk is van G, V, M en K.

Helaas beschikken wij niet over gegevens van proeven die zodanig werden verricht, dat zij geschikt zijn voor de verificatie van bovenstaande formule. Teneinde na te gaan of deze formule inderdaad een goed beeld geeft van de invloed van de onverzadigde vetzuren uit het voeder op het J-getal van het melkvet, zal het noodzakelijk zijn juist opgezette voederproeven te nemen, waarbij aan alle voorwaarden ten aanzien van de voedselopname is voldaan. In het onderzoek van ADRIANI, TAMSMA e.a. (1945) zijn echter wel enkele aanwijzingen te vinden, die ons een indruk kunnen geven of onze formule tot juiste uitkomsten leidt. Zij vermelden namelijk de volgende regressiecoëfficiënten, verkregen uit de gegevens over een aantal koeien, welke gedurende drie weideseizoenen werden verzameld:

a.	$b_{xa \cdot x_6} = +0{,}514 \pm 0{,}118$	over	1942, 1943 en 1944	(9a)
b.	$b_{xc \cdot x_6} = +0{,}908 \pm 0{,}247$	over	1942, 1943 en 1944	(9b)
c.	$b_{xc \cdot x_6 b} = +0{,}485 \pm 0{,}300$	over	1943 en 1944	(9c)
d.	$b_{xc \cdot ab} = +0{,}580$	over	1943	(9d)
e.	$b_{xb \cdot x_6} = +0{,}131 \pm 0{,}028$	over	1943, 1944	(9e)
f.	$b_{xb \cdot cx_6} = +0{,}125 \pm 0{,}028$	over	1943, 1944	(9f)

Hierin is X = "refractie" = $(n^D_{35°} - 1{,}45) \times 10^4$ van het melkvet;

$$A = \frac{10}{\text{vetproduktie (kg/etmaal)}};\quad B = \frac{\text{gewicht der koe (kg)}}{10 \times \text{vetproduktie (kg/etmaal)}};$$

$C = \frac{100}{\text{vetgehalte der melk (\%)}}$; X_6 = lactatiestadium in maanden na het afkalven. ($b_{xc \cdot bx_6}$ betekent de regressiecoëfficiënt van X t.o.v. C, als B en X_6 constant zijn.) Verder geven zij voor de samenhang van J-getal (J) en "refractie" de volgende vergelijking:

$$(J - 38) = -2{,}87 \times 10^{-3} (X - 65)^2 + 0{,}517 (X - 65) + 0{,}648. \qquad (10)$$

Wij kunnen nu door enkele benaderingen nagaan of de orde van grootte van de factor fE/S uit formule (8) juist is. Wanneer X niet te veel afwijkt van 65 kan de eerste term in het rechterlid van (10) worden verwaarloosd en gaat deze vergelijking over in

$$J = 0{,}517X + \text{const.} \qquad (60 < X < 70). \qquad (11)$$

Voorts is

$$A = 10^4 \frac{1}{K},\ B = 10^2 \frac{G}{K} \text{ en } C = 10^2 \frac{1}{V}. \qquad (12a, b, c)$$

De regressiecoëfficiënten kunnen nu omgerekend worden voor de door ons gebruikte grootheden. Uit (11) volgt

$$X = \frac{1}{0{,}517} J + \text{const.} \qquad (13)$$

Verder is per definitie

$$X = b_{xa \cdot x_6} A + b_{xx_6 \cdot a} X_6 + \text{const.}, \qquad (14)$$

waaruit bij constante X_6 en na invoering van (12a) volgt

$$X = b_{xa \cdot x_6} \times 10^4 \frac{1}{K} + \text{const.} \qquad (15)$$

Uit (13 en (15) volgt dan

$$\frac{1}{0{,}517} J = 10^4 b_{xa \cdot x_6} \frac{1}{K} + \text{const.}, \qquad (16)$$

dus

$$J = 0{,}517 \cdot 10^4 \cdot b_{xa \cdot x_6} \frac{1}{K} + \text{const.} \qquad (17)$$

Nu is ook, wederom per definitie,

$$J = b_{j\frac{1}{k} \cdot x_6} \frac{1}{K} + b_{jx_6 \cdot \frac{1}{k}} X_6 + \text{const.} \qquad (18)$$

en uit (17) en (18) volgt dan bij constante X_6

$$b_{j\frac{1}{k} \cdot x_6} = + 0{,}517 \cdot 10^4 \cdot b_{xa \cdot x_6}, \qquad (19)$$

of volgens (9a),

$$b_{j\frac{1}{k} \cdot x_6} = + 0{,}517 \cdot 10^4 \cdot (0{,}514 \pm 0{,}118) = + 2657 \pm 610. \qquad (20)$$

Op dezelfde wijze vindt men met behulp van de formules (9) en (12) de overige

regressiecoëfficiënten. Samengevat vindt men dan de volgende waarden:

a. $b_{f\frac{1}{k}\cdot x_6} = +2657 \pm 610$ (20a)

b. $b_{f\frac{1}{v}\cdot x_6} = +46{,}9 \pm 12{,}8$ (20b)

c. $b_{f\frac{1}{v}\cdot\frac{g}{k}x_6} = +25{,}1 \pm 15{,}5$ (20c)

d. $b_{f\frac{1}{v}\cdot\frac{g}{k}\frac{1}{k}} = +30{,}0$ (20d)

e. $b_{f\frac{g}{k}\cdot x_6} = +6{,}75 \pm 1{,}45$ (20e)

f. $b_{f\frac{g}{k}\cdot\frac{1}{v}x_6} = +6{,}45 + 1{,}45$ (20f)

Voor A, B en C geven de auteurs de volgende gemiddelden:

$$A = \text{ca. } 20 \text{ of } \frac{1}{K} = \text{ca. } 0{,}002, \text{ dus } K = \text{ca. } 500,$$

$$B = \text{ca. } 100 \text{ of } \frac{G}{K} = \text{ca. } 1 \quad , \text{dus } G = \text{ca. } 500,$$

$$C = \text{ca. } 28 \text{ of } \frac{1}{V} = \text{ca. } 0{,}28 \ , \text{dus } V = \text{ca. } 3{,}6.$$

Hieruit volgt $M = \dfrac{K}{10V} = \dfrac{500}{36} = \text{ca. } 14{,}0.$

Wanneer de dieren, zoals in dit geval, allen hetzelfde voer ontvangen, ontstaat uit formule (8), d.w.z. uit

$$J = \frac{fE}{S}\left(42{,}3\,\frac{G+300}{K} + 141\,\frac{1}{V} + 52{,}875\right), \tag{8}$$

door differentiatie

$$dJ = \frac{fE}{S}\left(42{,}3\,d\frac{G}{K} + 12690\,d\frac{1}{K} + 141\,d\frac{1}{V}\right). \tag{21}$$

Aangezien J afhankelijk is van $\frac{G}{K}$, $\frac{1}{K}$ en $\frac{1}{V}$, kan men ook schrijven:

$$dJ = b_{f\frac{g}{k}\cdot\frac{1}{k}\frac{1}{v}}\,d\frac{G}{K} + b_{f\frac{1}{k}\cdot\frac{g}{k}\frac{1}{v}}\,d\frac{1}{K} + b_{f\frac{1}{v}\cdot\frac{g}{k}\frac{1}{k}}\,d\frac{1}{V}. \tag{22}$$

Uit (21) en (22) volgt dan

$$b_{f\frac{g}{k}\cdot\frac{1}{k}\frac{1}{v}} = 42{,}3\ \frac{fE}{S}, \tag{23a}$$

$$b_{f\frac{1}{k}\cdot\frac{g}{k}\frac{1}{v}} = 12960\frac{fE}{S}, \tag{23b}$$

$$b_{f\frac{1}{v}\cdot\frac{g}{k}\frac{1}{k}} = 141\ \frac{fE}{S}. \tag{23c}$$

Helaas is slechts een exacte vergelijking mogelijk van de formules (20d) en (23c), waaruit volgt:

$$141\frac{fE}{S} = 30{,}0 \text{ of } \frac{fE}{S} = 0{,}213. \tag{24}$$

Wij gebruiken nu voor de berekening van fE/S de waarden voor S en E, zoals die bij onze verteringsproeven zijn gevonden, namelijk $S = 60$ en $E = 14{,}6$ resp. 22,2 resp. 22,5, al naar gelang wij rekenen met de onverzadigde verbindingen die door benzeen (14,6; zie tabel 23 onder "gemiddeld per 100 g ds verteerde hoeveelheden"), resp. benzeen en aether (14,6 + 7,6), resp. benzeen, aether en absolute alkohol (14,6 + 7,6 + 0,3) worden geëlueerd. Voorts nemen wij aan, dat f niet veel van 1 afwijkt. Wij vinden dan voor fE/S resp. 0,243; 0,370 en 0,375, terwijl volgens (24) werd verwacht 0,213. De orde van grootte van de theoretisch berekende factor fE/S stemt dus zeer goed overeen met de experimenteel gevonden waarden voor deze factor. Hierbij mag niet uit het oog worden verloren, dat de experimenteel bepaalde regressiecoëfficiënt steeds kleiner is dan de coëfficiënt, die zou worden gevonden wanneer geen fouten in de bepaling der betrokken grootheden zouden worden gemaakt.

Uit de waarden voor fE/S, zoals die in de voorafgaande alinea zijn berekend, kunnen ook de waarden van $b_{f\frac{g}{k}\cdot\frac{1}{k}\frac{1}{v}}$, nl. 10,28 resp. 15,65 en 15,86 en van

$b_{f\frac{1}{k}\cdot\frac{g}{k}\frac{1}{v}}$, nl. 3149 resp. 4795 en 4860 (23a, b)

worden bepaald. Een exacte vergelijking met coëfficiënten van ADRIANI e.a. is niet mogelijk. Toch stemmen deze waarden, wat hun orde van grootte betreft, vrij goed met de door deze auteurs gevonden waarden (resp. 20e, f en a) overeen.

BROUWER (1932a) vond voor de regressiecoëfficiënt $b_{f\frac{z}{k}}$ de waarde 1330 $\pm$ 340. Uit formule (7) volgt:

$$J = 12690\frac{fE}{S}\frac{Z}{K} + \text{const.} \tag{25}$$

en daar uiteraard

$$J = b_{f\frac{z}{k}}\cdot\frac{Z}{K} + \text{const.}, \tag{26}$$

is:

$$b_{f\frac{z}{k}} = 12960\frac{fE}{S} = 1330 \pm 340 \tag{27}$$

of

$fE/S = 0{,}105 \pm 0{,}0268$, derhalve wederom van dezelfde orde van

grootte, vooral wanneer men bedenkt, dat de experimenteel berekende regressiecoëfficiënten steeds kleiner moeten worden gevonden dan de theoretische.

Uit onze formule (8), d.w.z.

$$J = \frac{fE}{S}\left(42{,}3\,\frac{G + 300}{K} + 141\,\frac{1}{V} + 52{,}875 \right), \tag{8}$$

volgt

$$\frac{\partial J}{\partial K} = -\frac{fE}{S} \cdot 42{,}3\,\frac{G + 300}{K^2} = b_{jk \,.\, gv}, \tag{28}$$

$$\frac{\partial J}{\partial V} = -\frac{fE}{S} \cdot 141\,\frac{1}{V^2} = b_{jv \,.\, gk}, \tag{29}$$

$$\frac{\partial J}{\partial G} = +\frac{fE}{S} \cdot 42{,}3\,\frac{1}{K} = b_{jg \,.\, vk}\,. \tag{30}$$

Bij invoering van de gemiddelden voor G, K en V van BROUWER:

$G = 600$, $K = 500$ en $V = 3{,}33$ en de drie waarden voor fE/S vindt men

voor $fE/S = 0{,}243$: $b_{jk \,.\, gv} = -0{,}037$, $b_{jv \,.\, gk} = -3{,}09$ en $b_{jg \,.\, vk} = +0{,}020$,
voor $fE/S = 0{,}370$: $b_{jk \,.\, gv} = -0{,}056$, $b_{jv \,.\, gk} = -4{,}70$ en $b_{jg \,.\, vk} = +0{,}031$,
voor $fE/S = 0{,}375$: $b_{jk \,.\, gv} = -0{,}057$, $b_{jv \,.\, gk} = -4{,}77$ en $b_{jg \,.\, vk} = +0{,}032$.

BROUWER vond voor deze regressiecoëfficiënten

$b_{jk \,.\, gv} = -0{,}0131 \pm 0{,}0040$, $b_{jv \,.\, gk} = -3{,}53 \pm 1{,}45$ en $b_{jg \,.\, vk} = +\ 0{,}00819 \pm 0{,}00809$.

Ook hier dus weer een vrij grote mate van overeenstemming tussen volgens de theorie berekende en in de praktijk gevonden waarden.

Het is ook mogelijk op grond van de formule (8) het joodadditiegetal te berekenen voor verschillende waarden van G, K en V. De uitkomsten dezer bere-

TABEL 24. Joodadditiegetallen van het melkvet, berekend met de formule

$$J = f\frac{E}{S}\left(42{,}3\,\frac{G + 300}{K} + 141\,\frac{1}{V} + 52{,}875 \right),$$

voor $f = 1$, $E = 14{,}6$, $S = 60$ en verschillende waarden voor G, K en V

	V	3,3					3,6					4,0				
	K	400	500	600	700	800	400	500	600	700	800	400	500	600	700	800
G	M	12,1	15,2	18,2	21,2	24,2	11,1	13,9	16,7	19,4	22,2	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
500		43,8	39,7	37,0	35,0	33,6	43,0	38,9	36,1	34,2	32,7	42,0	37,9	35,2	33,2	31,7
600		46,4	41,8	38,7	36,5	34,8	45,6	40,9	37,8	35,6	34,0	44,6	40,0	36,9	34,7	33,0

V = vetgehalte der melk in %; K = melkvetproduktie per koe per dag in g; M = melkproduktie per koe per dag in kg; G = levend gewicht der koe in kg; f = fractie der onverzadigde vetzuren in de opgenomen droge stof, welke in het melkvet wordt verwerkt; E = aantal meq dubbele bindingen per 100 g opgenomen ds; S = zetmeelwaarde van het voeder in kg per 100 kg ds; J = joodadditiegetal van het melkvet.

keningen voor $E = 14{,}6$ zijn verzameld in tabel 24. Uit deze cijfers blijkt, dat de aldus berekende J-getallen zeer behoorlijk overeenkomen met de waarden, die hiervoor bij zomerboter worden gevonden. Daar voor deze berekeningen slechts rekening is gehouden met de door benzeen elueerbare zuren, kan dit betekenen dat de factor f kleiner is dan 1, doch ook kan het zijn dat de door aether en alkohol elueerbare onverzadigde zuren *niet* in het melkvet worden opgenomen. Wanneer dit laatste wel het geval zou zijn, moeten de cijfers in tabel 24 met ongeveer 50 % worden vermeerderd, waarna ze niet meer zouden overeenstemmen met in de praktijk gevonden J-getallen.

§ 6. Eindconclusies en samenvatting

Wij menen uit onze uitkomsten de gevolgtrekking te mogen maken, dat het zeer aannemelijk is, dat het joodadditiegetal van het melkvet vrijwel uitsluitend bepaald wordt door de hoeveelheid onverzadigde vetzuren uit het voeder. Dit geldt echter alleen voor die gevallen waarin deze hoeveelheid niet te groot is, want anders bestaat de mogelijkheid van overbelasting van het verwerkingsmechanisme. Hierdoor zou een verdere verhoging van de hoeveelheid der aangeboden overzadigde vetzuren geen verhoging van het joodadditiegetal meer veroorzaken. Met andere woorden: in deze gevallen is de factor f zeer veel kleiner dan 1.

Samenvattend kan worden gezegd, dat de door ons gevonden cijfers betreffende de samenstelling van de vetzuren uit het gras en de vertering dezer zuren door het rund zeker niet in strijd zijn met de door Brouwer (1932a) opgeworpen hypothese, dat de onverzadigde vetzuren uit het gras de "joodgetal-verhogende factor" vormen. Integendeel, de uitkomsten geven op verschillende punten steun aan deze veronderstelling.

Hoofdstuk 4

STATISTISCHE BEWERKING VAN GEGEVENS OVER ENKELE FACTOREN, DIE MEDE DE CONSISTENTIE VAN DE BOTER BEPALEN

Inleiding

Zoals reeds in hoofdstuk 1 is uiteengezet zou een verbetering van de consistentie der boter in verschillende jaargetijden van groot belang zijn. Teneinde een zodanige verbetering te kunnen bewerkstelligen is het noodzakelijk te weten, welke factoren tezamen de consistentie van de boter bepalen. In hoofdstuk 1 hebben wij gewezen op de invloed van de bewerking der melk enerzijds en de hoedanigheid van het melkvet anderzijds. Wanneer de bewerking der melk echter onder gelijke omstandigheden wordt uitgevoerd, zal de hoedanigheid van het melkvet bepalend zijn voor de beste consistentie, die kan worden verkregen. Deze hoedanigheid nu wordt bepaald door de wijze waarop het producerend organisme de ter beschikking staande voedermiddelen verwerkt. Ten dele wordt de wijze van verwerking bepaald door genetische factoren, welke

door ons echter niet in het onderzoek zijn betrokken, omdat hier veeleer een taak voor de fokker is weggelegd. Wij hebben ons onderzoek daarom beperkt tot de invloed van de *aard van het voedsel* en de toestand van het dier. Om te laten uitkomen wat met dit laatste wordt bedoeld, zij er bij wijze van voorbeeld op gewezen, dat een dier met een hoge melkgift, melkvet van andere samenstelling produceert dan een dier met een lage melkgift, ook als het voedsel in beide gevallen gelijk is en aangepast aan de melkgift.

I. Vroegere onderzoekingen naar factoren, die de consistentie der boter bepalen

In hoofdstuk 1 hebben wij de invloed van de voeding op de melkvetsynthese en op de chemische samenstelling van het melkvet besproken. Voorts is daarin de hypothese van BROUWER (1932a) ter sprake gekomen, welke verband legt tussen de verhouding van de hoeveelheden onderhoudsvoer en produktievoer enerzijds en de geproduceerde hoeveelheid melkvet anderzijds. Nu heeft FREDERIKSEN (1931) een empirische formule afgeleid voor de hoeveelheid voer, die een melkgevende koe dient op te nemen teneinde in staat te zijn het stofwisselingsevenwicht te handhaven bij gelijkblijvende melk- en vetproduktie. BROUWER heeft deze formule gebruikt om duidelijk te maken welke factoren zijns inziens van veel belang zijn voor de consistentie der boter.

Wij zullen in het kort de redenering van BROUWER weergeven. De formule van FREDERIKSEN luidt:

$$Z = \frac{G}{300} + 1 + \frac{M}{9} + \frac{MV}{24} \qquad (1)$$

waarin Z = benodigde zetmeelwaarde in kg per dag,
G = gewicht der koe in kg,
M = melkopbrengst in kg per dag,
V = vetpercentage der melk.

Stellen wij de vetopbrengst per dag in grammen K, dan is

$$K = 10MV \text{ of } M = \frac{K}{10V} \text{ en } MV = \frac{K}{10}, \qquad (2)$$

waaruit volgt:

$$Z = \frac{G}{300} + 1 + \frac{K}{90V} + \frac{K}{240}, \qquad (3)$$

of

$$\frac{Z}{K} = \left(\frac{G}{300} + 1\right)\frac{1}{K} + \frac{1}{90V} + \frac{1}{240} = Z'. \qquad (4)$$

Uit formule (4) volgt, dat het quotiënt

$$Z' = \frac{Z}{K} = \frac{\text{onderhoudsvoer} + \text{produktievoer}}{\text{geproduceerd melkvet}}$$

groter wordt naarmate K (de vetopbrengst) kleiner wordt en eveneens wanneer V (het vetpercentage) afneemt en ook wanneer G (het gewicht der koe) toeneemt.

Gezien de moeilijkheid om de consistentie der boter in cijfers uit te drukken,

vervangt men de consistentie meestal, zoals reeds in hoofdstuk 1 is uiteengezet, door het J-getal of het refractometergetal, die daarmede nauw gecorreleerd zijn. Het getal waarin men de stevigheid (de belangrijkste factor van de consistentie) uitdrukt, wordt groter naarmate de boter slapper wordt. Eigenlijk is het dus meer een maat voor de zachtheid van de boter.

Zoals eveneens reeds is gezegd, houdt de hypothese van BROUWER in, dat bij gelijkblijvende samenstelling van het voeder, het J-getal van het botervet hoger wordt naarmate per g botervet meer voedsel wordt gebruikt, met andere woorden naarmate Z' groter wordt. Indien deze hypothese juist is, dient er een positieve correlatie te bestaan tussen Z' en het J-getal resp. het refractometergetal. Uit formule (4) volgt dan, dat er ook een negatieve partiële correlatie gevonden dient te worden tussen het J-getal (c.q. het refractometergetal) enerzijds en het vetpercentage resp. de vetproduktie anderzijds en een positieve partiële correlatie met het gewicht der koe.

In het verleden zijn reeds pogingen gedaan om deze correlaties aan te tonen. BROUWER (1932a) bewerkte de gegevens van een zestal voederproeven, die reeds eerder door hem waren genomen (1932b). De gevonden correlatiecoëfficiënten zijn opgenomen in tabel 25.

TABEL 25. Correlatiecoëfficiënten volgens BROUWER

Proef		aantal dieren	Correlatiecoëfficiënten		
			ρ_{kv}	ρ_{kj}	ρ_{vj}
1929	I	9	+0,03	–0,72	–0,12
1929	II	9	+0,40	–0,78	–0,66
1930	I	7	+0,34	–0,66	–0,80
1930	II	8	+0,40	–0,67	–0,12
1931	I	8	+0,45	–0,78	–0,68
1931	II	8	–0,73	+0,28	–0,85

K = vetproduktie in g per koe per dag.
V = vetgehalte der melk in procenten.
J = joodadditiegetal.

Uit de verkregen coëfficiënten blijkt inderdaad een duidelijke negatieve correlatie tussen het J-getal enerzijds en het vetpercentage en de vetopbrengst anderzijds. Voor elk der proeven werden ook de regressiecoëfficiënten berekend, welke hier niet alle vermeld zullen worden. Wij volstaan met de coëfficiënten over alle proeven tezamen. Deze hebben betrekking op slechts 37 dieren, aangezien enkele dieren in meer dan één jaar aan de proeven deelnamen en daarom alleen in het eerste jaar van hun deelneming werden meegerekend. Deze coëfficiënten waren

$$b_{jk} = -0{,}0159 \pm 0{,}0034, \qquad b_{jv} = -5{,}1 \pm 1{,}4,$$
$$b_{jk \cdot v} = -0{,}0134 \pm 0{,}0031, \qquad b_{jv \cdot k} = -3{,}82 \pm 1{,}18.$$

Van 25 dieren waren ook de gewichten bekend, zodat hiervoor eveneens enkele coëfficiënten werden berekend. Dit gaf als uitkomsten

$$b_{jk \cdot vg} = -0{,}0131 \pm 0{,}0040, \qquad b_{jv \cdot kg} = -3{,}53 \pm 1{,}45,$$
$$b_{jg \cdot kv} = +0{,}00819 \pm 0{,}00809.$$

Tenslotte volgde nog de berekening van

$$\rho_{jz'} = +0{,}672 \qquad \text{en} \qquad b_{jz'} = +1330 \pm 340,$$

waarbij voor de berekening van Z' gebruik werd gemaakt van Z berekend volgens FREDERIKSEN en dus niet van de feitelijk opgenomen zetmeelwaarde.

Ook ADRIANI en medewerkers (1945) bepaalden een groot aantal correlatie- en regressiecoëfficiënten, waarvan de belangrijkste door ons in tabel 26 verzameld zijn. Deze cijfers zijn de gemiddelden van de uitkomsten van proeven gedurende drie achtereenvolgende weideseizoenen (uitgezonderd die coëfficiënten, waarin de factor B voorkomt; deze zijn berekend over twee seizoenen), waarbij de gegevens van koeien die in meer dan één seizoen deelnamen, slechts eenmaal zijn geteld.

De door ADRIANI e.a. gebruikte grootheden zijn:

X_1 = refractie = $n^D{}_{35°} - 1{,}45)10^4$,

X_6 = lactatieperiode = aantal maanden verlopen na het kalven,

X_7 = leeftijd der koe in jaren,

$$A = \frac{10}{\text{vetproduktie in kg per dag}},$$

$$B = \frac{G}{10 \times \text{vetproduktie in kg per dag}},$$

$$C = \frac{100}{\text{vetpercentage der melk}},$$

G = gewicht der koe in kg (berekend uit lengte en omvang).

Om een vergelijking van deze coëfficiënten met de door BROUWER berekende en eveneens met de door ons te berekenen coëfficiënten mogelijk te maken, hebben wij ze omgerekend op de door ons gebruikte basisgrootheden, namelijk het refractometergetal (R), de vetproduktie in grammen per koe per dag (K) en het vetpercentage (V).

Nu is

$$R = \frac{n^D{}_{40°} - 1{,}4244}{0{,}0007} \text{ of } n^D{}_{40°} = 0{,}0007R + 1{,}4244. \tag{5}$$

Voorts is

$$n^D{}_{35°} = n^D{}_{40°} - c_t \text{ (c_t = constante temperatuurcorrectie)}, \tag{6}$$

dus

$$X_1 = (n^D{}_{35°} - 1{,}45)10^4 = (n^D{}_{40°} - c_t - 1{,}45)10^4 = \\ = (0{,}0007R + 1{,}4244 - c_t - 1{,}45)10^4 = 7R - 256 - 10^4\, c_t$$

of

$$R = \frac{1}{7} X_1 + \text{const.} \tag{7}$$

Voor de omrekening van de regressiecoëfficiënten van de onafhankelijk veranderlijke X_1 in die van de afhankelijk veranderlijke R moeten deze coëfficiënten dus door 7 worden gedeeld.

Verder is

$$A = \frac{10}{10^{-3}K} = 10^4 \frac{1}{K} \text{ of } \frac{1}{K} = 10^{-4} A. \tag{8}$$

TABEL 26. Correlatie- en regressiecoëfficiënten volgens ADRIANI e.a.

Voetindex	Correlatie-coëfficiënt		Regressie-coëfficiënt		Voetindex	Regressiecoëfficiënt met onze eenheden berekend	
	coëff.	m.f.	coëff.	m.f.		coëff.	m.f.
$x_1a \cdot x_6$	+0,643	±0,111	+0,51	±0,12	$r\frac{1}{k} \cdot x_6$	$+7{,}2 \cdot 10^2$	$\pm 1{,}7 \cdot 10^2$
$x_1c \cdot x_6$	+0,578	±0,126	+0,91	±0,25	$r\frac{1}{v} \cdot x_6$	+13	±3,6
$x_1b \cdot x_6$	+0,676	±0,105	+0,131	±0,028	$r\frac{g}{k} \cdot x_6$	+1,86	±0,40
$x_1b \cdot cx_6$	+0,672	±0,108	+0,125	±0,028	$r\frac{g}{k} \cdot \frac{1}{v} x_6$	+1,79	±0,40
$x_1c \cdot bx_6$	+0,308	±0,177	+0,49	±0,30	$r\frac{1}{v} \cdot \frac{g}{k} x_6$	+7,0	±4,3
$ax_7 \cdot x_6$	–0,577	±0,126	–2,00	±0,54	$\frac{1}{k} x_7 \cdot x_6$	$-2{,}00 \cdot 10^{-4}$	$\pm 0{,}54 \cdot 10^{-4}$
$ax_6 \cdot x_7$	+0,597	±0,122	+0,79	±0,20	$\frac{1}{k} x_6 \cdot x_7$	$+0{,}79 \cdot 10^{-4}$	$\pm 0{,}20 \cdot 10^{-4}$
$bx_7 \cdot x_6$	–0,389	±0,163	–4,5	±2,1	$\frac{g}{k} x_7 \cdot x_6$	–0,045	±0,021
$bx_6 \cdot x_7$	+0,727	±0,091	+4,5	±0,8	$\frac{g}{k} x_6 \cdot x_7$	+0,045	±0,008
$x_1c \cdot ax_7$	+0,560	±0,132	+0,57	±0,17	$r\frac{1}{v} \cdot \frac{1}{k} x_7$	+8,1	±2,4
$x_1a \cdot cx_7$	+0,560	±0,142	+0,27	±0,09	$r\frac{1}{v} \cdot \frac{1}{k} x_7$	+3,90	±1,30
$x_1c \cdot ab$	–	–	+0,5801	–	$r\frac{1}{v} \cdot \frac{1}{k}\frac{g}{k}$	+8,29	–
x_1a	+0,565	±0,126	+0,410	±0,113	$r\frac{1}{k}$	$+5{,}86 \cdot 10^2$	$\pm 1{,}61 \cdot 10^2$
x_1c	+0,544	±0,131	+0,782	±0,228	$r\frac{1}{v}$	+11,2	±3,26

In de kolom "voetindex" betekent $x_1a \cdot x_6$ dat de desbetreffende coëfficiënten betrekking hebben op de correlatie en regressie van X_1 t.o.v. A bij constante X_6. Evenzo heeft $r\frac{1}{v} \cdot \frac{g}{k} x_6$ betrekking op de correlatie en regressie van R t.o.v. $\frac{1}{V}$ bij constante $\frac{G}{K}$ en X_6, enz.

X_1 = "refractie" = $(n^D{}_{35°} - 1{,}45)\ 10^4$
X_7 = leeftijd der koe in jaren
X_6 = lactatiestadium in maanden na het afkalven

$$A = \frac{10}{\text{vetproduktie in kg per etmaal}}$$

$$B = \frac{G}{10 \times \text{vetproduktie in kg per etmaal}}$$

$$C = \frac{100}{\text{vetpercentage van de melk}}$$

G = gewicht der koe berekend uit lengte en omvang
R = refractie van het melkvet uitgedrukt in refractometergraden
V = vetgehalte der melk in procenten
K = vetproduktie in grammen per koe per dag

Indien A optreedt als afhankelijk veranderlijke vinden we in het algemeen

$A = pQ + \text{const.}$, waarin Q = willekeurige onafhankelijk veranderlijke, p = bijbehorende constante factor = regressiecoëfficiënt van A t.o.v. Q. Volgens (8) is dan ook

$$10^4 \frac{1}{K} = pQ + \text{const.}$$

en dus

$$\frac{1}{K} = 10^{-4}pQ + \text{const.}$$

In dit geval dienen de regressiecoëfficiënten p dus te worden vermenigvuldigd met 10^{-4}. Indien A optreedt als onafhankelijk veranderlijke heeft men:

$M = wA + \text{const.}$, waarin M = willekeurige afhankelijk veranderlijke, w = bijbehorende regressiecoëfficiënt van M t.o.v. A. Door substitutie van (8) volgt:

$$M = 10^4 w \frac{1}{K} + \text{const.}$$

Hier dienen de regressiecoëfficiënten w dus met 10^4 vermenigvuldigd te worden.

Voorts is

$$B = \frac{G}{10 \cdot 10^{-3}K} = 10^2 \frac{G}{K} \text{ of } \frac{G}{K} = 10^{-2}B. \tag{9}$$

Bij omrekening van B op G/K dient hier dus met 10^{-2} (B resp. G/K als afhankelijk veranderlijke) of met 10^2 (B resp. G/K als onafhankelijk veranderlijke) te worden vermenigvuldigd.

Voor C geldt

$$C = \frac{100}{V} = 10^2 \frac{1}{V} \text{ of } \frac{1}{V} = 10^{-2}C. \tag{10}$$

Dus voor omrekening van C op V dient met 10^{-2} (C resp. V als afhankelijk veranderlijke) of met 10^2 (C resp. V als onafhankelijk veranderlijke) vermenigvuldigd te worden. De aldus verkregen regressiecoëfficiënten zijn eveneens in tabel 26 opgenomen.

De vergelijking van ADRIANI's coëfficiënten met die welke door BROUWER werden berekend is geenszins eenvoudig, doch kan op de volgende wijze geschieden. Allereerst beschouwen wij $b_{x_1 a}$ (ADRIANI) en b_{jk} (BROUWER). De eerste coëfficiënt heeft betrekking op de regressie van de "refractie" t.o.v. A, dus $\frac{10^4}{K}$, de tweede op de regressie van het J-getal t.o.v. de vetopbrengst K.

Blijkens tabel 26 is

$$X_1 = b_{x_1 a}A + \text{const.} = 0{,}410A + \text{const.} \tag{11}$$

ADRIANI e.a. vonden voorts

$$J - 38 = -2{,}87 \cdot 10^{-3}(X_1 - 65)^2 + 0{,}517(X_1 - 65) + 0{,}648. \tag{12}$$

In de nabijheid van $X_1 = 65$ gaat vergelijking (12) over in

$$J = 0{,}517\,(X_1 - 65) + \text{const.} \tag{13}$$

Ook is blijkens (8)

$$A = 10^4 \frac{1}{K}$$

en invoering van (8) en (11) in (13) geeft

$$J = 0{,}517 \times 0{,}410 \cdot 10^4 \frac{1}{K} + \text{const.}, \tag{14}$$

waaruit volgt

$$\frac{dJ}{dK} = -0{,}517 \times 0{,}410 \cdot 10^4 \frac{1}{K^2}. \tag{15}$$

Nu was A gemiddeld ongeveer 20, dus $K = 500$ en derhalve

$$\frac{dJ}{dK} = -0{,}517 \times 0{,}410 \cdot 10^4 \frac{1}{500^2} = -0{,}00848, \tag{16}$$

waarmede de door BROUWER gevonden regressiecoëfficiënt

$$b_{jk} = -0{,}0159 \pm 0{,}0034$$

in redelijke overeenstemming is.

Op dezelfde wijze kan $\frac{dJ}{dV}$ uit $b_{x_1 c}$ berekend worden.

Men vindt dan uit ADRIANI's gegevens:

$$\frac{dJ}{dV} = -3{,}12, \tag{17}$$

hetgeen eveneens redelijk overeenstemt met BROUWER's uitkomst

$$b_{jv} = -5{,}12 \pm 1{,}4.$$

Voor $b_{x_1 c \,.\, ab}$ is de bewerking als volgt:

$$X_1 = pA + qB + b_{x_1 c \,.\, ab} C + \text{const.} \tag{18}$$

Dit geeft na invoering van (13) en van de waarde 0,5801 voor $b_{x_1 c \,.\, ab}$ uit tabel 29:

$$J = p'A + q'B + 0{,}517 \times 0{,}5801 C + \text{const.} \tag{19}$$

Voorts is volgens (10)

$$C = 10^2 \frac{1}{V},$$

dus

$$J = p'A + q'B + 0{,}517 \times 0{,}5801 \times 10^2 \frac{1}{V}, \tag{20}$$

waaruit volgt:

$$\frac{\partial J}{\partial V} = -\frac{0{,}517 \cdot 0{,}5801 \cdot 10^2}{V^2}.$$

Nu was C gemiddeld ongeveer 28, dus $V = \frac{100}{28}$ en

$$\frac{\partial J}{\partial V} = -\frac{0{,}517 \cdot 0{,}5801 \cdot 10^2}{\left(\frac{100}{28}\right)^2} = -2{,}35,$$

hetgeen wederom in redelijke overeenstemming is met de door BROUWER gevonden regressiecoëfficiënt

$$b_{fv \cdot kg} = -3{,}53 \pm 1{,}45.$$

EIGEN ONDERZOEK

I. Inleiding en doel van het onderzoek

In de literatuur werden dus aanwijzingen gevonden, dat er inderdaad een zekere mate van samenhang bestaat tussen de grootheden, welke verband houden met de consistentie enerzijds en de melkvetproduktie, het gewicht van de koe en het vetpercentage der melk anderzijds. Het leek ons gewenst deze samenhang nader te bezien aan de hand van gegevens, die betrekking hebben op een groot aantal dieren, zonder nochtans uitgebreide en kostbare proeven op te zetten. Het bleek echter, dat geen cijfermateriaal beschikbaar was waarin ook de gewichten der koeien waren opgenomen. Wij moesten ons derhalve tevreden stellen met gegevens omtrent refractometergetal, vetproduktie en vetpercentage. Dit materiaal kon verschaft worden door enkele grote combinaties van zuivelfabrieken en de botercontrolestations. Na beschouwing van de mogelijkheden leken in de eerste plaats de gegevens, die ons door de FRICO te Leeuwarden welwillend ter beschikking werden gesteld, het meest geschikt voor een statistische bewerking.

De volgende overwegingen leidden ons tot de keuze van dit materiaal.

1. In het gehele gebied (de provincie Friesland) wordt vrijwel alleen melkvee van het F.H.-veeslag aangetroffen.
2. Het aantal koeien op kleine bedrijven (minder dan 9 koeien) bedraagt slechts ongeveer 8% van het totale aantal koeien. Hierdoor zullen enkele storende invloeden, zoals het deel van de melkproduktie, dat voor eigen gebruik wordt achtergehouden, alsook grote afwijkingen van de normale voedersamenstelling, welke zich het meest voordoen op de kleine bedrijven, niet veel effect hebben.
3. De deelneming aan de melkcontrole is zeer groot. Hierdoor wordt een goede bedrijfsvoering bevorderd, waardoor de voedering veelal beter aan de norm wordt aangepast.
4. De invloed van het Fries Rundvee Stamboek is vrij groot. Bijna de helft van de koeien die aan de melkcontrole worden onderworpen, is ingeschreven in het stamboek of het hulpboek.
5. De vrijwel algemene deelneming aan de tuberculinatieactie gedurende de jaren waarop het cijfermateriaal betrekking heeft, maakt het mogelijk gegevens te krijgen over het aantal melkkoeien per aangesloten fabriek.

II. Het cijfermateriaal

a. Het refractometergetal. De refractometergetallen werden bepaald op het laboratorium van de FRICO met een boterrefractometer (Zeiss) bij 40,0°C.

Deze refractometer werd enkele malen per jaar op onregelmatige tijden geijkt met olie (Zeiss) met bekend refractometergetal. Het botervet werd verkregen door het uitsmelten bij 40 °C van een monster boter uit één kist van de wekelijkse produktie en wel van een steeds wisselende dag, die voor elke week door het laboratorium werd vastgesteld. Op het tijdstip der bepaling was de boter ongeveer twee weken oud. De mogelijkheid bestaat, dat de boter uit de gekozen kist niet afkomstig is van alle leveranciers van de betrokken fabriek, doch slechts van een deel dezer leveranciers. De daardoor veroorzaakte onnauwkeurigheid achten wij gering. Het refractometergetal werd afgelezen tot op 0,05 eenheden. De bepaling geschiedde afzonderlijk door twee personen, waarna de uitkomsten werden gemiddeld en afgerond naar beneden op 0,05 eenheden, tenzij het verschil tussen beide uitkomsten meer dan 0,20 bedroeg. In het laatste geval werd een nieuwe bepaling uitgevoerd, waarna het gemiddelde werd genomen van de twee uitkomsten welke het beste overeenstemden. Het is gebleken, dat verschillen van meer dan 0,20 eenheden vrijwel altijd op foutieve aflezing of notatie berusten. De aldus verkregen refractometergetallen zijn door ons beschouwd als de gemiddelde refractometergetallen van alle melkvet der betrokken fabrieken in de desbetreffende week.

b. De melkaanvoer. Van elke hoeveelheid melk, door een leverancier bij de fabriek aangevoerd, werd het gewicht bepaald. De cijfers omtrent de melkaanvoer per fabriek per week zijn de sommen van de aldus verkregen gewichten.

c. Het vetpercentage der melk. Bij de aanvoer der melk werd telkenmale een monster genomen van de melk van elke leverancier afzonderlijk. Deze monsters werden gedurende 14 dagen voor elke leverancier apart verzameld. Op dit verzamelmonster werd een vetgehaltebepaling volgens GERBER (1951: NORMBLAD N910, 2e ed. (1946); 1952 en 1953: NORMBLAD N962 (1951)) in enkelvoud verricht. De cijfers voor het vetgehalte per fabriek en per 14 dagen werden verkregen door voor elke leverancier het vetgehalte te vermenigvuldigen met de melkaanvoer in het betrokken tijdvak, de uitkomsten van alle leveranciers te sommeren en vervolgens te delen door de totale melkaanvoer. Hierbij dient nog te worden opgemerkt dat de melkvetbepaling in 1951 werd uitgevoerd met een melkpipet van 11,00 ml en in 1952 en 1953 met een melkpipet van 10,77 ml.

d. De melkvetaanvoer. Dit gegeven werd voor elke fabriek op de hiervoor beschreven wijze verkregen door berekening van de melkvetaanvoer van elke leverancier uit melkaanvoer en vetgehalte over 7 dagen en sommering over alle leveranciers.

e. Het aantal melkgevende koeien per fabriek. Het was niet mogelijk van week tot week na te gaan hoeveel melkgevende koeien aanwezig waren bij de veehouders, aangesloten bij een bepaalde fabriek. Aangezien echter door de *Gezondheidsdienst voor Vee in Friesland*, in het vervolg GVF genoemd, tijdens de tuberculinatie-actie tevens een telling van het rundvee werd verricht, hebben wij van deze gegevens gebruik kunnen maken. Bij deze tellingen werden de dieren ingedeeld in 1-jarige dieren, 2-jarige dieren en dieren ouder dan 2 jaar. Een moeilijkheid was gelegen in de omstandigheid, dat de tellingen tijdens de stalperioden plaats vonden, terwijl ons onderzoek betrekking heeft op de weide-

perioden. Wij hebben echter gemeend, het aantal melkgevende dieren in een bepaalde weideperiode het best te kunnen schatten door dit aantal gelijk te stellen aan het aantal koeien, dat bij de telling in de volgende stalperiode ouder dan 2 jaar was. Ten eerste zullen dieren, die in het afgelopen seizoen weinig of geen melk hebben gegeven en die dus weinig invloed hebben gehad op het refractometergetal en de melk- en vetproduktie, vóór de winter worden opgeruimd. Ten tweede zal de vervanging en uitbreiding van de veestapel door aankoop of anderszins meestal eerst nà de stalperiode geschieden. Wij ontveinzen ons echter niet, dat de cijfers geenszins op een hoge graad van nauwkeurigheid aanspraak kunnen maken.

III. De grootheden waarmede de berekeningen zijn uitgevoerd

a. Het refractometergetal (R_w).

b. Het vetpercentage (V_w). De cijfers voor deze beide grootheden werden gebruikt zoals ze ons door de FRICO ter beschikking werden gesteld.

c. De vetproduktie per koe per dag in grammen (K_w). Deze cijfers werden als gemiddelden per week en per fabriek verkregen door de melkvetaanvoer per week te delen door 7 maal het aantal koeien, ouder dan 2 jaar, volgens de zojuist toegelichte gegevens van de GVF.

IV. De statistische bewerking der gegevens

a. Verantwoording der gebruikte gegevens. Het onderzoek liep over de gegevens van de jaren 1951, 1952 en 1953. Telkenjare werd echter slechts het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september in het onderzoek betrokken. De maand mei hebben wij namelijk van ons onderzoek uitgesloten, omdat enerzijds in deze maand het vee veelal nog enige tijd op stal staat of in de weide wordt bijgevoerd en het anderzijds niet is uitgesloten dat de invloed van de stalvoedering en die van de overgang op de weidevoedering nog nawerken. Door het maken van enkele oriënterende grafieken van de beschikbare cijfers bleek, dat er omstreeks eind september onregelmatigheden in de cijfers voorkwamen, terwijl uit de praktijk bekend is, dat in die tijd veelal wordt bijgevoederd omdat er dan vaak een tekort aan gras bestaat. Daar echter de stijging van het vetgehalte tijdens de weideperiode pas sterk doorzet gedurende het einde van augustus en het begin van september en deze stijging voor ons onderzoek van veel belang was, hebben wij gemeend het tijdvak van onderzoek toch zo lang mogelijk te moeten nemen en daarom 20 september als laatste dag gekozen.

Voor het jaar 1952 hebben wij de cijfers betreffende het vetgehalte, de vetproduktie en het refractometergetal, alles per fabriek en per week, in twee grafieken uitgezet. In figuur 10 zijn de refractometergetallen uitgezet tegen de vetpercentages en in figuur 11 tegen de gemiddelde vetprodukties per koe. Teneinde de overzichtelijkheid der grafieken niet te schaden, zijn slechts de gegevens verwerkt van 11 fabrieken, willekeurig gekozen uit de 52 FRICO-deelgenoten, en bovendien nog die van de fabrieken op Ameland en Terschelling.

Uit figuur 11 blijkt, dat de punten die betrekking hebben op de gegevens van de fabrieken op de eilanden Ameland en Terschelling, ver buiten de punten-

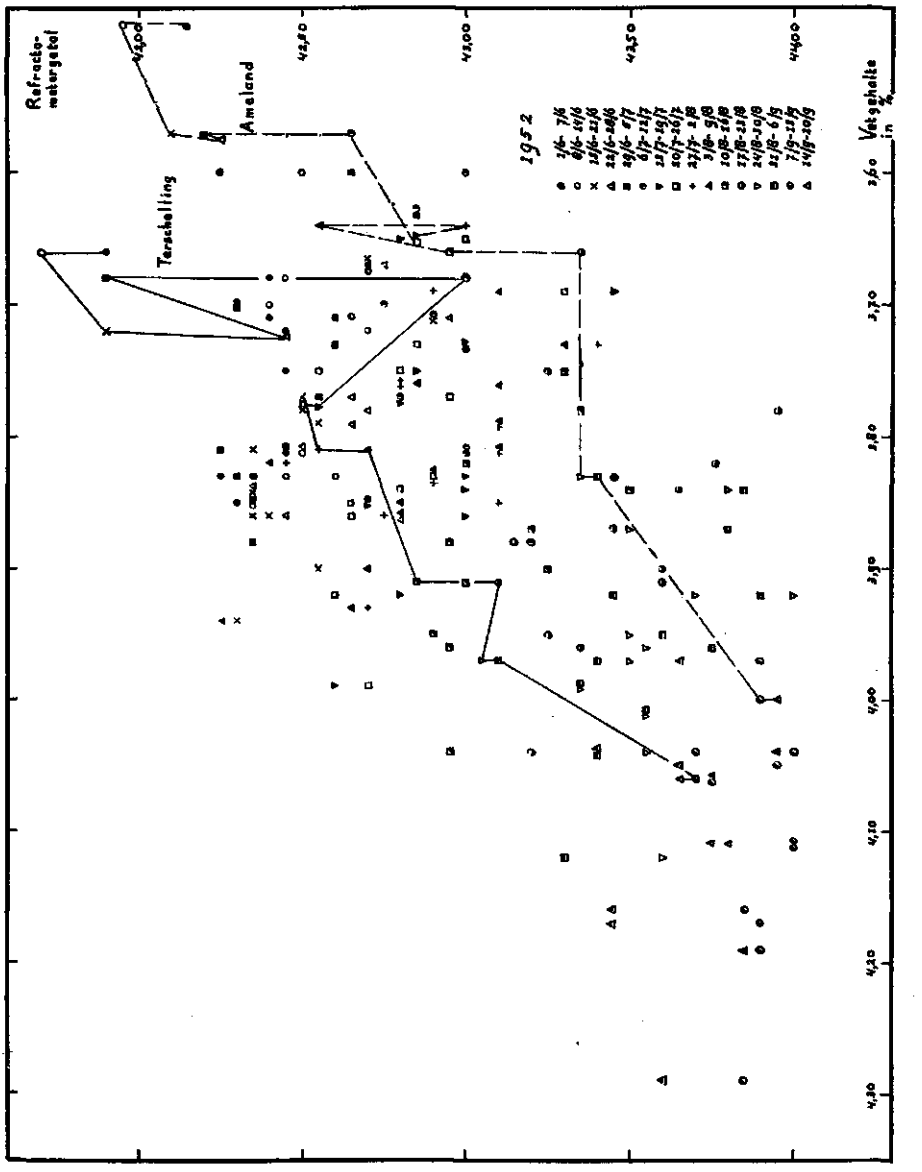


FIG. 10. Het verband tussen het refractometergetal van het melkvet en het vetgehalte der melk per FRICO-deelgenoot en per week voor het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1952.
—— zuivelfabriek op Terschelling
------ zuivelfabriek op Ameland
Terwille van een beter overzicht werden slechts 11 van de 51 overige fabrieken in de grafiek opgenomen.

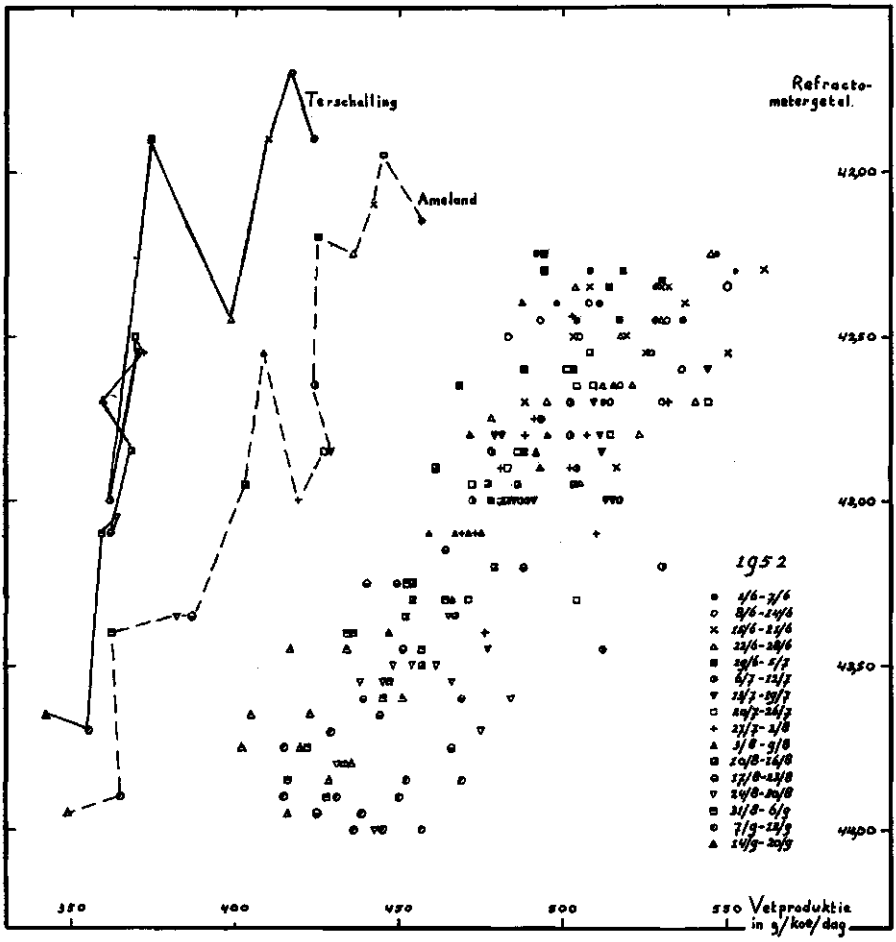


FIG. 11. Het verband tussen het refractometergetal van het melkvet en de vetproduktie per koe per dag per FRICO-deelgenoot en per week voor het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1952.
—— zuivelfabriek op Terschelling
------ zuivelfabriek op Ameland
Terwille van een beter overzicht werden slechts 11 van de 51 overige fabrieken in de grafiek opgenomen.

zwerm voor de overige fabrieken vallen. In de grafiek refractie-vetgehalte (fig. 10) liggen de punten betreffende deze fabrieken echter binnen de puntenzwerm voor de overige fabrieken. Dit deed ons denken aan de mogelijkheid, dat in de produktiegebieden van deze fabrieken het percentage van de melk, dat niet aan de fabriek geleverd werd, aanzienlijk groter was dan het percentage, dat voor de overige fabrieken als normaal gold (5–7%). Bij navraag bevestigde de directeur van de zuivelfabriek op Ameland, dat inderdaad een vrij hoog percentage melk (± 15%) op de bedrijven werd achtergehouden (invloed vakantiegangers; in september ligt dit percentage lager). Tevens bleek echter, dat het aantal koeien volgens de opgave van de directeur lager was dan volgens de ge-

gevens van de GVF, namelijk voor 1951: 1365 tegen 1599; voor 1952: 1350 tegen 1622 en voor 1953: 1405 tegen 1625. Berekent men de ligging van de punten in de grafiek refractie-vetproduktie uit de gegevens, zoals die door de directeur der fabriek werden verschaft, dan vallen de punten voor deze fabriek vrijwel binnen de puntenzwerm voor de overige fabrieken.

De inlichtingen, die de directeur van de fabriek op Terschelling ons verstrekte, waren van dien aard, dat hiermede geen afwijkingen ten opzichte van de overige fabrieken konden worden verklaard. Op grond echter van de inlichtingen over Ameland en de vrijwel overeenkomstige ligging van de punten voor de twee fabrieken, hebben wij gemeend de cijfers van deze beide fabrieken van onze statistische bewerking te moeten uitsluiten.

b. Verdere bewerking van de basisgegevens. Voor ieder jaar werd het rekenkundige gemiddelde van de weekcijfers voor elke fabriek berekend. In het jaar 1952 viel het begin van het door ons gekozen tijdvak (1 juni) samen met de aanvang van een onderzoekweek (week 1). De laatste dag (20 september) van de te onderzoeken periode viel samen met de laatste dag van een onderzoekweek (week 16). Het gehele tijdvak besloeg 16 weken, dus werden de gemiddelden voor de drie grootheden voor fabriek f verkregen met de volgende bewerkingen:

$$R_f = \frac{\sum_{w=1}^{w=16} R_w}{16} \text{ en overeenkomstig voor } V_f \text{ en } K_f.$$

R_f = waarde van de grootheid R voor deelgenoot f;
V_f = waarde van de grootheid V voor deelgenoot f;
K_f = waarde van de grootheid K voor deelgenoot f.

Voor het jaar 1951 ving de onderzoekperiode aan op de zesde dag van een weekperiode (week 0) en eindigde zij op de vijfde dag van week 16. De drie grootheden werden nu als volgt berekend:

$$R_f = \frac{\frac{2}{7}R_0 + \sum_{w=1}^{w=15} R_w + \frac{5}{7}R_{16}}{16} \text{ en overeenkomstig voor } V_f \text{ en } K_f.$$

In het jaar 1953 viel het begin van de onderzoekperiode samen met de tweede dag van een weekperiode (week 0) en het einde met de eerste dag van week 16. De berekeningen waren dus:

$$R_f = \frac{\frac{6}{7}R_0 + \sum_{w=1}^{w=15} R_w + \frac{1}{7}R_{16}}{16} \text{ en overeenkomstig voor } V_f \text{ en } K_f.$$

De verkregen cijfers zijn opgenomen in tabel 27 en tevens verwerkt in de figuren 12 t/m 17. In de tabel en de grafieken zijn ter vergelijking ook de cijfers voor Ameland (fabriek te Hollum) en Terschelling opgenomen, welke echter, zoals gezegd, niet bij de berekeningen zijn gebruikt.

c. De statistische berekeningen. De statistische berekeningen werden voor ieder jaar afzonderlijk uitgevoerd volgens de gebruikelijke statistische methoden (FISCHER, 1938; VAN UVEN, 1946; SNEDECOR, 1957). Hierbij werden de notaties gebruikt zoals die door SNEDECOR zijn aangegeven.

De volgende grootheden werden berekend (n = aantal FRICO-deelgenoten in een bepaald jaar in de berekeningen opgenomen):

$$\Sigma R = \sum_{f=1}^{f=n} R_f;\ \Sigma K = \sum_{f=1}^{f=n} K_f;\ \Sigma V = \sum_{f=1}^{f=n} V_f;\ \bar{R} = \frac{\Sigma R}{n};\ \bar{K} = \frac{\Sigma K}{n};\ \bar{V} = \frac{\Sigma V}{n}.$$

$$\Sigma r^2 = \sum_{f=1}^{f=n} (R_f - \bar{R})^2;\ \Sigma rk = \sum_{f=1}^{f=n} (R_f - \bar{R})(K_f - \bar{K});\ \Sigma rv = \sum_{f=1}^{f=n} (R_f - \bar{R})(V_f - \bar{V});$$

$$\Sigma k^2 = \sum_{f=1}^{f=n} (K_f - \bar{K})^2;\ \Sigma kv = \sum_{f=1}^{f=n} (K_f - \bar{K})(V_f - \bar{V});\ \Sigma v^2 = \sum_{f=1}^{f=n} (V_f - \bar{V})^2.$$

Hieruit verkrijgt men de correlatiecoëfficiënten:

$$\rho_{rk} = \frac{\Sigma rk}{\sqrt{\Sigma r^2\, \Sigma k^2}};\quad \rho_{rv} = \frac{\Sigma rv}{\sqrt{\Sigma r^2\, \Sigma v^2}}$$ en voorts de regressiecoëfficiënten:

$$b_{rk} = \frac{\Sigma rk}{\Sigma k^2};\ b_{rv} = \frac{\Sigma rv}{\Sigma v^2};\ b_{rk \cdot v} = \frac{\Sigma v^2\, \Sigma rk - \Sigma kv\, \Sigma rv}{\Sigma k^2\, \Sigma v^2 - (\Sigma kv)^2};$$

$$b_{rv \cdot k} = \frac{\Sigma k^2\, \Sigma rv - \Sigma kv\, \Sigma rk}{\Sigma k^2\, \Sigma v^2 - (\Sigma kv)^2}.$$

Vervolgens kunnen de bijbehorende standaardafwijkingen en de statistische significantie dezer grootheden als volgt worden berekend:

$$s_{b_{rk}} = \sqrt{\frac{\Sigma r^2 - b_{rk}\, \Sigma rk}{(n-2)\, \Sigma k^2}};\ s_{b_{rv}} = \sqrt{\frac{\Sigma r^2 - b_{rv}\, \Sigma rv}{(n-2)\, \Sigma v^2}};$$

$$s_{b_{rk \cdot v}} = \sqrt{\frac{(\Sigma r^2 - b_{rk \cdot v}\, \Sigma rk - b_{rv \cdot k}\, \Sigma rv)\, \Sigma v^2}{(n-3)\{\Sigma k^2\, \Sigma v^2 - (\Sigma kv)^2\}}};$$

$$s_{b_{rv \cdot k}} = \sqrt{\frac{(\Sigma r^2 - b_{rk \cdot v}\, \Sigma rk - b_{rv \cdot k}\, \Sigma rv)\, \Sigma k^2}{(n-3)\{\Sigma k^2\, \Sigma v^2 - (\Sigma kv)^2\}}}.$$

$$t_{b_{rk}} = \left|\frac{b_{rk}}{s_{b_{rk}}}\right|;\ t_{b_{rv}} = \left|\frac{b_{rv}}{s_{b_{rv}}}\right|;\ t_{b_{rk \cdot v}} = \left|\frac{b_{rk \cdot v}}{s_{b_{rk \cdot v}}}\right|;\ t_{b_{rv \cdot k}} = \left|\frac{b_{rv \cdot k}}{s_{b_{rv \cdot k}}}\right|.$$

Deze laatste grootheden kunnen worden opgezocht in een t-tabel volgens FISHER, waaruit de waarschijnlijkheid kan worden afgelezen dat de regressiecoëfficiënt inderdaad in de gevonden richting van nul verschilt.

Uit deze berekeningen volgen de regressievergelijkingen:

TABEL 27. De gemiddelde waarden van refractometergetal, vetproduktie en vetgehalte voor de FRICO-deelgenoten over het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september van elk der jaren 1951, 1952 en 1953

FRICO-deelgenoot		1951			1952			1953		
No.	te	R_f	K_f	V_f	R_f	K_f	V_f	R_f	K_f	V_f
1	Achlum	43,16	516	3,97	42,97	498	3,91	43,24	510	3,92
2	Bartlehiem	43,05	513	3,92	42,89	495	3,88	43,14	522	3,89
3	Dronrijp	43,00	518	3,91	42,88	493	3,90	43,08	512	3,91
4	Garijp	43,17	468	3,79	43,10	453	3,77	43,24	485	3,78
5	Giekerk	43,25	489	3,87	43,17	483	3,82	43,30	488	3,83
6	Marssum	43,02	524	3,98	42,90	484	3,94	43,23	491	3,97
7	Oudeschoot	43,26	503	3,80	43,19	485	3,76	43,19	491	3,78
8	Tzum	43,02	550	3,92	42,91	521	3,86	43,11	515	3,88
9	Roordahuizum	43,06	593	4,15	42,88	492	4,07	43,17	541	4,13
10	Grouw	43,20	549	3,99	43,08	487	3,90	43,23	539	4,00
11	Wirdum	42,94	650	4,07	42,87	516	4,01	43,10	542	4,02
12	Oosterzee	43,28	561	3,73	43,20	497	3,72	43,41	504	3,71
13	Delfstrahuizen	43,34	539	3,78	43,16	456	3,76	43,34	484	3,78
14	Wartena	43,20	483	3,91	43,01	492	3,87	43,15	519	3,92
15	Boornbergum	43,20	467	3,78	43,14	460	3,75	43,24	485	3,78
16	Luinjeberd	43,16	487	3,81	43,07	463	3,73	43,17	474	3,82
17	Oosterend	42,85	591	4,01	42,68	546	3,95	42,84	571	4,01
18	Opeinde	43,15	470	3,82	43,06	460	3,77	43,18	480	3,83
19	Bergum	43,13	499	3,83	43,13	477	3,81	43,19	485	3,85
20	Wolvega	43,13	492	3,81	43,08	477	3,75	43,08	482	3,79
21	Tijnje	43,08	471	3,75	43,14	468	3,82	43,17	481	3,83
22	Oosthem	43,03	574	3,90	43,00	531	3,77	43,19	550	3,90
23	Terschelling									
24	Wommels	42,96	549	3,98	42,96	522	3,94	43,18	555	3,97
25	Scharnegoutum	43,15	539	4,06	42,96	533	3,96	43,21	549	3,97
26	Birdaard	43,03	502	3,91	42,92	488	3,86	43,12	521	3,88
27	Uitwellingerga	43,23	496	3,82	43,12	460	3,76	43,32	488	3,79

31	Sijbrandeburen	43,12	612	3,97	43,04	498	3,91	43,33	517	3,91
32	Hollum									
33	Steggerda	43,22	478	3,76	43,15	468	3,71	43,07	466	3,77
34	Jubbega	43,00	482	3,81	42,91	472	3,73	43,07	474	3,79
35	Witmarsum	43,08	580	3,98	42,84	492	3,92	43,15	499	3,90
36	't Meer	43,28	489	3,82	43,31	466	3,75	43,40	492	3,84
37	Weidum	42,92	538	4,03	42,86	524	3,95	43,18	539	4,00
38	Akkrum	43,26	482	3,96	43,06	471	3,93	43,26	495	3,97
39	Oldeberkoop	43,06	477	3,77	42,96	458	3,71	43,06	478	3,79
40	Elslo	43,07	479	3,78	43,02	466	3,76	43,10	463	3,74
41	Donkerbroek	43,01	522	3,82	43,00	491	3,81	43,09	492	3,85
42	Zurich	42,92	517	3,91	42,69	488	3,85	43,02	499	3,85
43	Betterwird	42,96	599	3,95	42,94	534	3,92	43,10	532	3,90
44	Langezwaag	43,06	489	3,72	43,03	495	3,70	43,14	515	3,78
45	Oosterwolde	43,05	504	3,82	42,93	483	3,82	43,02	499	3,83
46	Marrum	43,18	475	3,91	43,04	467	3,88	43,29	474	3,87
47	Morra	43,16	464	3,96	43,13	482	3,92	43,29	475	3,90
48	Sexbierum	43,24	474	3,83	43,01	468	3,82	43,36	445	3,72
49	Olterterp	43,20	499	3,88	43,12	466	3,86	43,07	482	3,89
50	Schiermonnikoog	43,25	419	3,75	43,16	431	3,68	43,12	493	3,79
51	Leeuwarden	43,23	501	3,90	43,00	482	3,84	43,18	504	3,88
52	Jelsum	42,95	487	4,08	42,80	478	3,99	–	–	–
53	Makkinga	43,08	459	3,79	42,99	464	3,78	43,09	471	3,81
	som	2198,66	26079	197,98	2193,61	24758	195,73	2158,57	25057	193,23
	gemiddelde	*43,110*	*511,4*	*3,882*	*43,012*	*485,5*	*3,838*	*43,171*	*501,1*	*3,865*
	aantal	51			51			50		
23	Terschelling	42,64	421	3,86	42,66	375	3,82	42,87	416	3,81
32	Hollum	43,00	437	3,66	42,84	410	3,68	42,97	446	3,74

R = refractometergetal van het melkvet; K = vetproduktie in grammen per koe per dag; V = vetgehalte der melk in procenten.

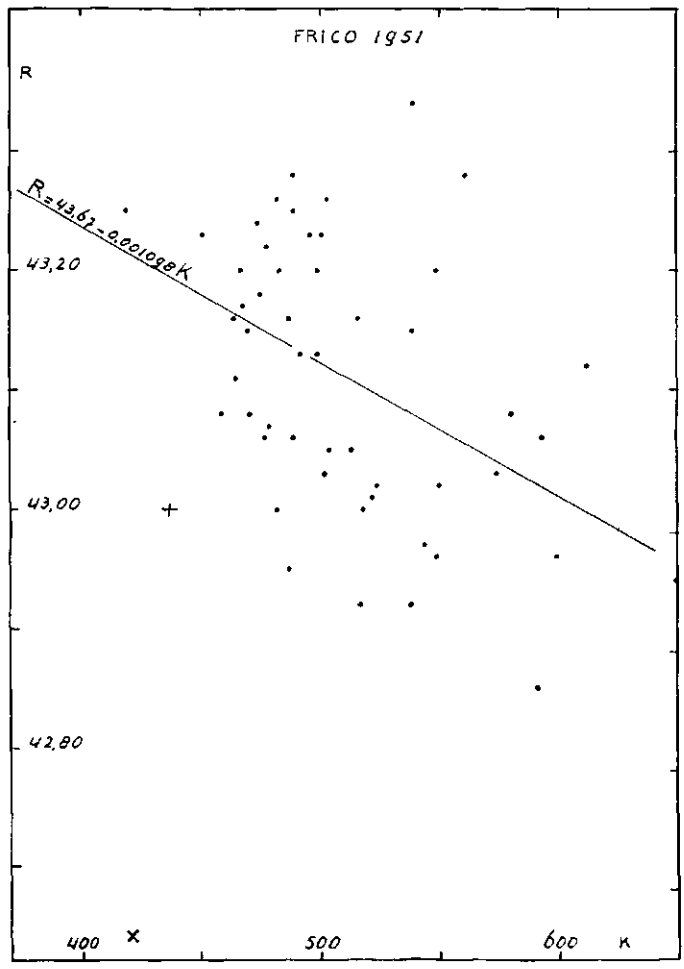


FIG. 12. Verband tussen refractometergetal en vetproduktie per FRICO-deelgenoot over het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1951.
Verklaring der grafiek:
R = gemiddelde refractometergetal
K = gemiddelde vetproduktie in g per koe per dag
—— regressielijn van R t.o.v. K
\+ zuivelfabriek op Terschelling
× zuivelfabriek op Ameland

$$\hat{R}_{rk} = \overline{R} + b_{rk}(K_f - \overline{K}); \quad \hat{R}_{rv} = \overline{R} + b_{rv}(V_f - \overline{V});$$
$$\hat{R}_{r\,.\,kv} = \overline{R} + b_{rk\,.\,v}(K_f - \overline{K}) + b_{rv\,.\,k}(V_f - \overline{V}).$$

Bij de laatstgenoemde regressievergelijking kan nog de bijbehorende correlatiecoëfficiënt ten opzichte van de regressielijn worden berekend:

$$P_{r\,.\,kv} = \frac{b_{rk\,.\,v}\,\Sigma rk + b_{rv\,.\,k}\,\Sigma rv}{\Sigma r^2}.$$

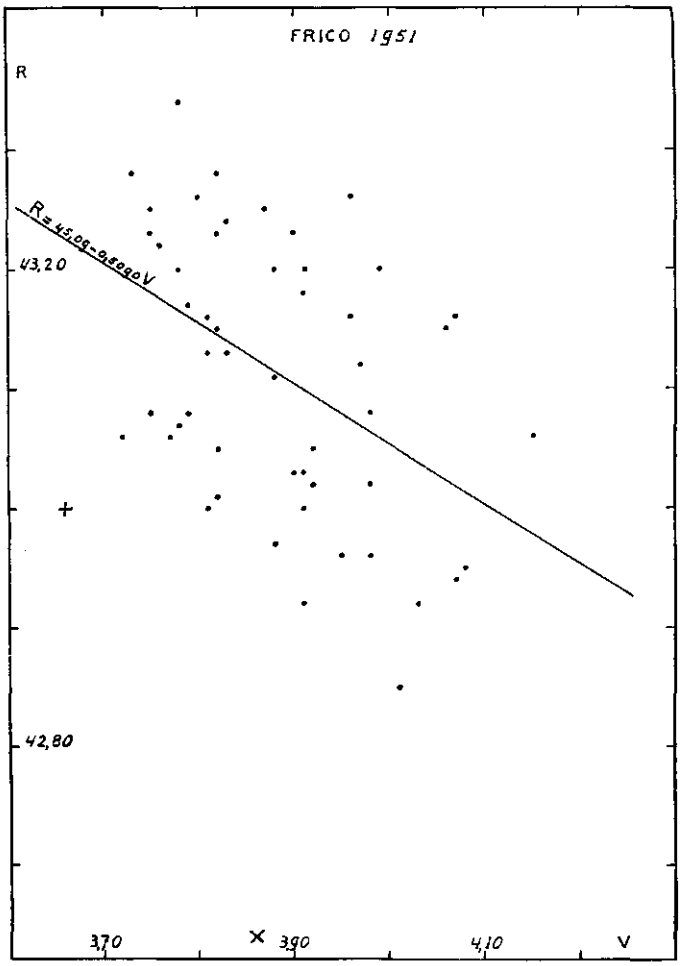


FIG. 13. Verband tussen refractometergetal en vetgehalte der melk per FRICO-deelgenoot over het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1951.
Verklaring der grafiek: zie fig. 12.

Op deze wijze verkrijgt men voor 1951 de volgende uitkomsten:

$n = 51$; $\overline{R} = 43{,}110$; $\overline{K} = 511{,}4$; $\overline{V} = 3{,}882$.

$\rho_{rk} = -0{,}4442$; $\rho_{rv} = -0{,}4519$; $P_{r\,.\,kv} = 0{,}4995$.

$b_{rk} = -0{,}001098$; $b_{rv} = -0{,}5090$; $b_{rk\,.\,v} = -0{,}000663$; $b_{rv\,.\,k} = -0{,}3247$.

$s_{b_{rk}} = 0{,}0003237$; $s_{b_{rv}} = 0{,}14354$; $s_{b_{rk\,.\,v}} = 0{,}0003837$; $s_{b_{rv\,.\,k}} = 0{,}17771$.

$t_{b_{rk}} = 3{,}3920$; $t_{b_{rv}} = 3{,}546$; $t_{b_{rk\,.\,v}} = 1{,}701$; $t_{b_{rv\,.\,k}} = 1{,}827$.

$\hat{R}_{rk} = 43{,}67 - 0{,}001098K$; $\hat{R}_{rv} = 45{,}09 - 0{,}5090V$; $\hat{R}_{r\,.\,kv} = 44{,}71 - 0{,}000663K - 0{,}3247V$.

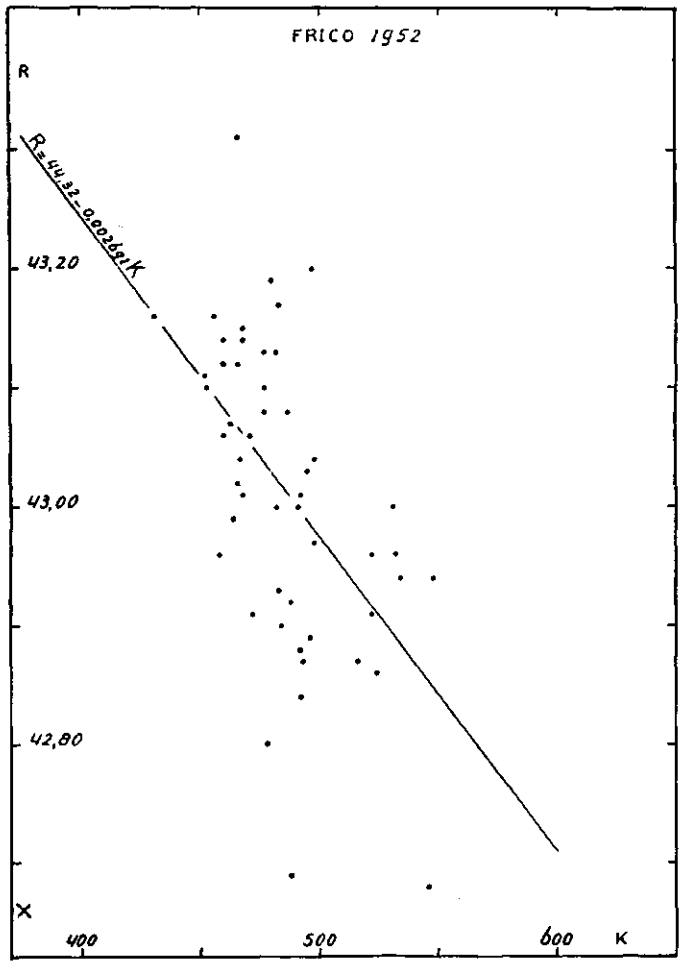


FIG. 14. Verband tussen refractometergetal en vetproduktie per FRICO-deelgenoot over het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1952.
Verklaring der grafiek: zie fig. 12.

Voor 1952 verkrijgt men:

$n = 51; \overline{R} = 43{,}012; \overline{K} = 485{,}5; \overline{V} = 3.838.$

$\rho_{rk} = -0{,}5411 \quad ; \rho_{rv} = -0{,}5825 \; ; P_{r\,.\,kv} = 0{,}6351.$

$b_{rk} = -0{,}002691 \; ; b_{rv} = -0{,}8177 \; ; b_{rk\,.\,v} = -0{,}001536 \; ; b_{rv\,.\,k} = -0{,}5694.$

$s_{b_{rk}} = 0{,}0005974; \; s_{b_{rv}} = 0{,}1630 \; ; s_{b_{rk\,.\,v}} = 0{,}0006763; \; s_{b_{rv\,.\,k}} = 0{,}19092.$

$t_{b_{rk}} = 4{,}505 \quad ; t_{b_{rv}} = 5{,}016 \; ; t_{b_{rk\,.\,v}} = 2{,}271 \quad ; t_{b_{rv\,.\,k}} = 2{,}982.$

$\hat{R}_{rk} = 44{,}32 - 0{,}002691K; \; \hat{R}_{rv} = 46{,}15 - 0{,}8177V; \; \hat{R}_{r\,.\,kv} = 45{,}94 - 0{,}001536K - 0{,}5694V.$

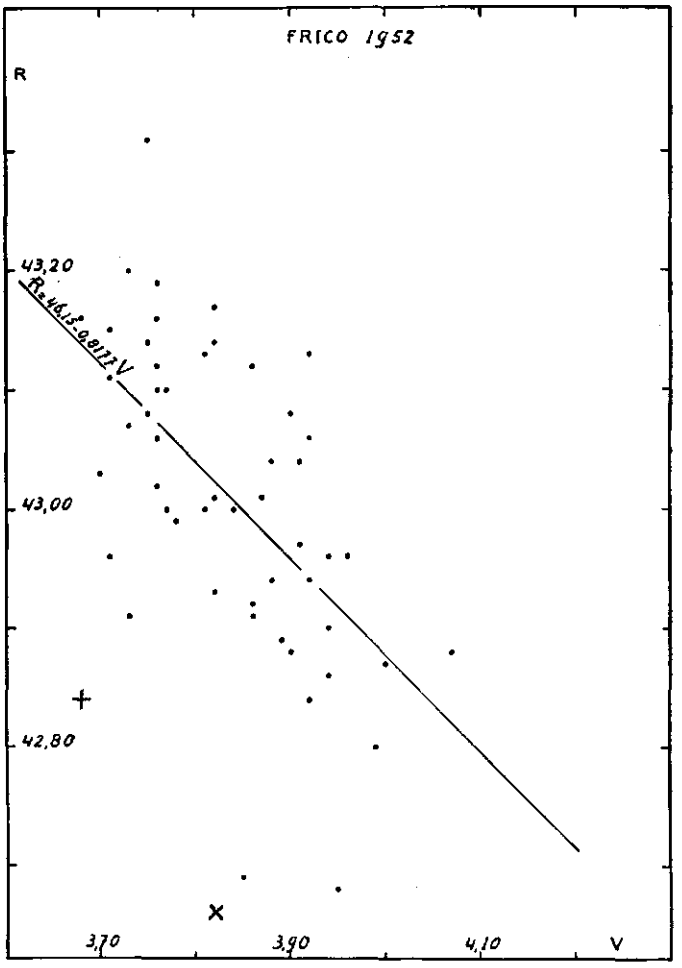


FIG. 15. Verband tussen refractometergetal en vetgehalte der melk per FRICO-deelgenoot over het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1952.
Verklaring der grafiek: zie fig. 13.

Voor 1953 vindt men aldus:

$n = 50$; $\bar{R} = 43{,}171$; $\bar{K} = 501{,}1$; $\bar{V} = 3{,}865$.

$\rho_{rk} = -0{,}2714$; $\rho_{rv} = -0{,}1734$; $P_{r\,.\,kv} = 0{,}2194$.

$b_{rk} = -0{,}000861$; $b_{rv} = -0{,}2151$; $b_{rk\,.\,v} = -0{,}000788$; $b_{rv\,.\,k} = -0{,}0312$.

$s_{b_{rk}} = 0{,}0005546$; $s_{b_{rv}} = 0{,}17634$; $s_{b_{rk\,.\,v}} = 0{,}0008336$; $s_{b_{rv\,.\,k}} = 0{,}26274$.

$t_{b_{rk}} = 1{,}552$; $t_{b_{rv}} = 1{,}220$; $t_{b_{rk\,.\,v}} = 0{,}946$; $t_{b_{rv\,.\,k}} = 0{,}119$.

$\hat{R}_{rk} = 43{,}60 - 0{,}000861K$; $\hat{R}rv = 44{,}00 - 0{,}2151V$; $\hat{R}_{r\,.\,kv} = 43{,}68 - 0{,}000788K - 0{,}0312V$.

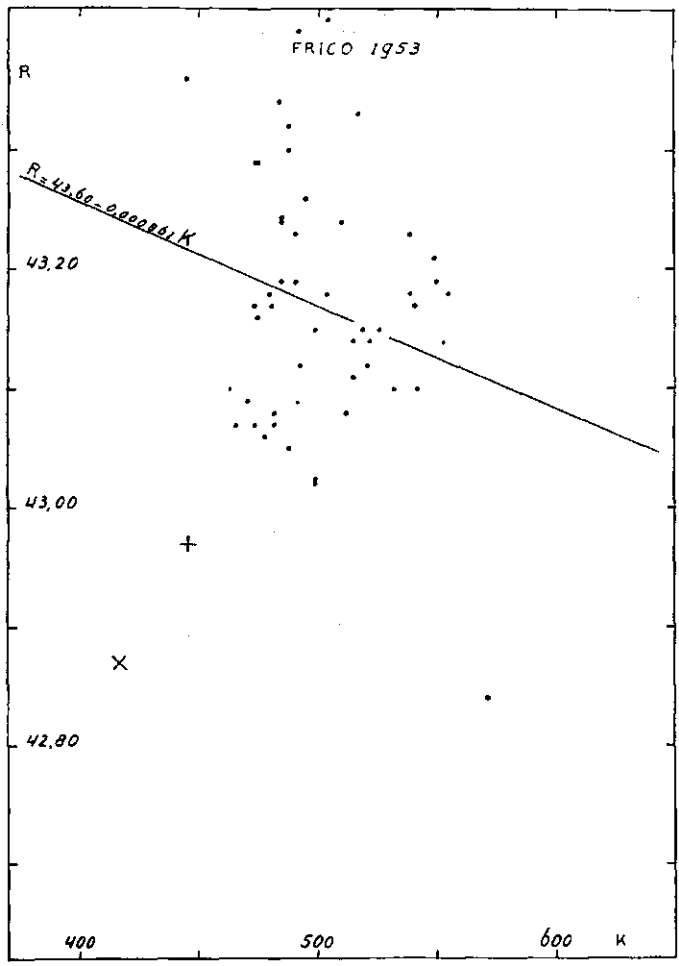


FIG. 16. Verband tussen refractometergetal en vetproduktie per FRICO-deelgenoot over het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1953.
Verklaring der grafiek: zie fig. 12.

V. Beschouwing der uitkomsten

Allereerst bezien wij de uitkomsten aangaande het verband tussen het refractometergetal en de vetproduktie. Hier vonden wij voor de regressiecoëfficiënten over de drie jaren 1951, 1952 en 1953 resp. —0,001098 ± 0,0003237; —0,002691 ± 0,0005974 en —0,000861 ± 0,0005546. Dit is in overeenstemming met de hiervoor toegelichte hypothese dat het refractometergetal des te groter is naarmate volgens de formule van FREDERIKSEN meer voedsel nodig is per gram geproduceerd melkvet. Uit deze hypothese volgde namelijk, dat er een negatieve correlatie zou moeten bestaan tussen het refractometergetal en de vetproduktie. Inderdaad vonden wij hier een negatieve correlatie en regressie. In de jaren 1951 en 1952 bestaat een statistische waarschijnlijkheid van 99% dat ook de ware

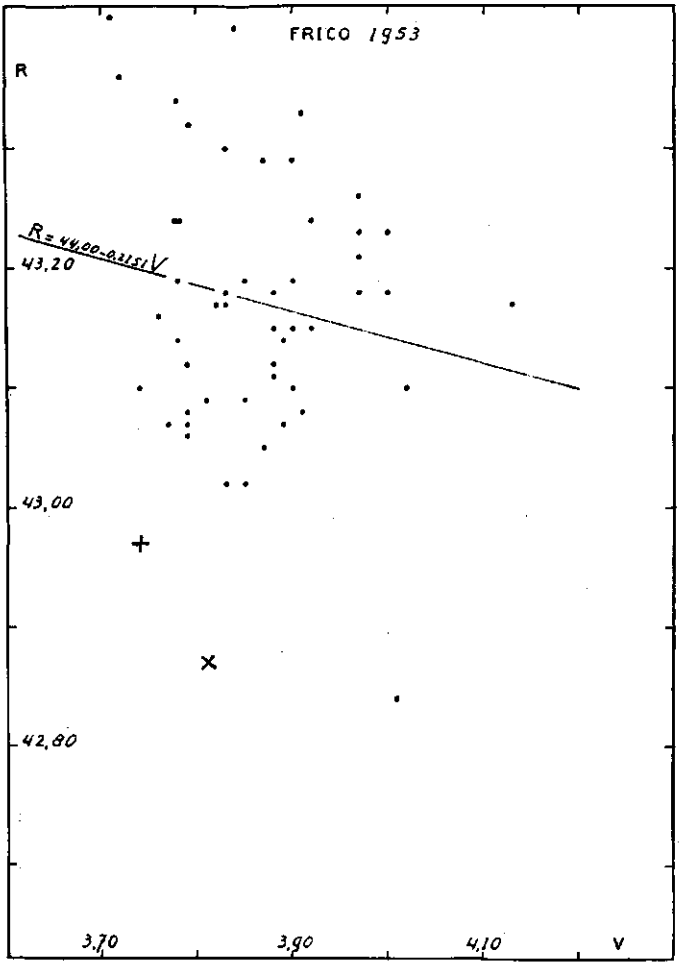


FIG. 17. Verband tussen refractometergetal en vetgehalte der melk per FRICO-deelgenoot over het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september 1953.
Verklaring der grafiek: zie fig. 13.

regressiecoëfficiënten in negatieve richting van nul verschillen. Voor 1953 is dit niet het geval; de waarschijnlijkheid dat de ware coëfficiënt in negatieve richting van nul verschilt bedraagt hier nog ongeveer 93%.

De betekenis van deze coëfficiënten kan blijken uit de vermindering van het refractometergetal ten gevolge van een stijging van de vetproduktie met 100 g per dag. Deze daling bedraagt voor de drie jaren resp. 0,11; 0,27 en 0,09 eenheden. Aangezien een verandering van één eenheid in het refractometergetal gemiddeld overeenkomt met een verandering van 3 eenheden in het J-getal (VAN DAM, 1938; voor zomerboter), komen de zojuist genoemde dalingen van het refractometergetal overeen met dalingen van het J-getal met resp. ongeveer 0,3; 0,8 en 0,3 eenheden. De invloed van de vetproduktie lijkt dus niet groot, doch, zoals reeds meermalen is gezegd, zijn de uitkomsten voor de absolute

waarden van de regressiecoëfficiënten steeds lager dan bij theoretische beschouwingen voorspeld wordt en dus zal de werkelijke invloed van de vetproduktie groter zijn dan hier is gevonden.

Het verband tussen het refractometergetal en het vetgehalte werd bepaald door de regressiecoëfficiënten —0,5090 ± 0,14354 resp. —0,8177 ± 0,1630 en —0,2151 ± 0,17634. Ook hier verschillen de coëfficiënten voor 1951 en 1952 met 99% zekerheid in negatieve zin van nul en is de coëfficiënt voor 1953, hoewel negatief, niet significant verschillend van nul. Een stijging van het vetpercentage met 0,5% geeft een daling van het refractometergetal met resp. 0,25; 0,41 en 0,11 eenheden, overeenkomende met een daling van het J-getal met resp. 0,75; 1,2 en 0,3 eenheden. Ook de invloed van het vetpercentage is dus niet groot, doch men bedenke wederom dat de berekende waarden slechts minima zijn.

Ten slotte bezien wij het verband tussen het refractometergetal enerzijds en de vetproduktie en het vetgehalte anderzijds. De desbetreffende partiële regressiecoëfficiënten zijn

voor 1951: $b_{rk \,.\, v} = -0{,}000663 \pm 0{,}0003837$ en $b_{rv \,.\, k} = -0{,}3247 \pm 0{,}17771$;
voor 1952: $b_{rk \,.\, v} = -0{,}001536 \pm 0{,}0006763$ en $b_{rv \,.\, k} = -0{,}5694 \pm 0{,}19092$;
voor 1953: $b_{rk \,.\, v} = -0{,}000788 \pm 0{,}0008336$ en $b_{rv \,.\, k} = -0{,}0312 \pm 0{,}26274$.

Voor beide coëfficiënten voor 1951 bestaat 90% zekerheid dat zij negatief zijn, voor 1952 bedraagt deze zekerheid 99%. De coëfficiënten voor 1953 verschillen niet significant van nul. De betekenis van deze coëfficiënten blijkt, wanneer wij de daling van het refractometergetal berekenen als het gemiddelde vetgehalte stijgt van 3,6% tot 3,9% en de gemiddelde melkgift stijgt van 16 kg tot 20 kg per dag, hetgeen neerkomt op een stijging van de melkvetproduktie met 204 g per dag. Deze daling is dan resp. 0,23; 0,48 en 0,17 eenheden, overeenkomende met een daling van het J-getal met resp. 0,7; 1,4 en 0,5 eenheden.

Samenvattend kan worden gezegd, dat de statistische berekeningen leiden tot uitkomsten, welke in overeenstemming zijn met de theorie omtrent de invloed van het vetgehalte en de vetproduktie op het refractometergetal en het joodadditiegetal. Voor de praktijk moge de grootte dezer uitkomsten op het eerste gezicht teleurstellend zijn, niettemin onderstreept dit onderzoek nog eens het grote belang van de verhoging van het vetgehalte der melk en van de vetproduktie per koe voor de consistentie van de boter.

VI. Vergelijking van onze uitkomsten met literatuurgegevens

De vergelijking van onze uitkomsten met de uitkomsten door BROUWER (1932a) verkregen is het eenvoudigst. BROUWER berekende de regressies van het J-getal (J) ten opzichte van de vetproduktie (K) en het vetgehalte (V). Deze regressies zijn als volgt om te rekenen:

1. Uit de onderzoekingen van VAN DAM (1938) is gebleken, dat

$$\mathrm{d}J = 3\mathrm{d}R \qquad \text{(bij benadering)}$$

en daar is

$$\mathrm{d}J = b_{jk}\mathrm{d}K,$$
$$3\mathrm{d}R = b_{jk}\mathrm{d}K$$

of

$$\frac{\mathrm{d}R}{\mathrm{d}K} = \frac{b_{jk}}{3}.$$

Voorts is

$$\frac{dR}{dK} = b_{rk}$$

en daaruit volgt

$$b_{rk} = \frac{b_{jk}}{3}.$$

2. Voor b_{jv}, $b_{jk\,.\,v}$ en $b_{jv\,.\,k}$ geldt dezelfde afleiding, hetgeen leidt tot

$$b_{rv} = \frac{b_{jv}}{3};\quad b_{rk\,.\,v} = \frac{b_{jk\,.\,v}}{3} \text{ en } b_{rv\,.\,k} = \frac{b_{jv\,.\,k}}{3}.$$

In tabel 28 zijn de waarden voor de betrokken coëfficiënten vermeld, zoals die door BROUWER zijn gevonden en voorts de regressiecoëfficiënten na omrekening op het refractometergetal. De jaren waarvoor de berekeningen werden uitgevoerd zijn aangegeven in de laatste kolom dezer tabel.

TABEL 28. Vergelijking van de gevonden regressiecoëfficiënten met literatuurgegevens

Bron	Oorspronkelijke coëfficiënt	Omgerekende coëfficiënt	Oorspronkelijke coëfficiënt	Omgerekende coëfficiënt	Proefjaar
BROUWER	b_{jk}	b_{rk}	b_{jv}	b_{rv}	
(1932a)	–0,0149	–0,00497	–1,46	–0,487	1929 I
	–0,0193	–0,00643	–7,57	–2,523	1929 II
	–0,0174	–0,00580	–8,68	–2,893	1930 I
	–0,0162	–0,00540	–0,79	–0,263	1930 II
	–0,0175	–0,00583	–7,47	–2,490	1931 I
	+0,0084	+0,00280	–6,26	–2,087	1931 II
	–0,159	–0,00538	–5,1	–1,70	alle proeven
ADRIANI e.a.	$b_{x_1 a}$	b_{rk}	$b_{x_1 c}$	b_{rv}	
(1945)	+0,9302	–0,00531	+0,8804	–0,986	1942
	+0,6666	–0,00380	+0,6608	–0,740	1943
	+0,4993	–0,00285	+0,1817	–0,204	1944
	+0,410	–0,00234	+0,782	–0,876	alle proeven
eigen berekening		b_{rk}		b_{rv}	
		–0,00110		–0,5090	1951
		–0,00269		–0,8177	1952
		–0,00086		–0,2151	1953
BROUWER	$b_{jk.v}$	$b_{rk.v}$	$b_{jv.k}$	$b_{rv.k}$	
(1932a)	–0,0134	–0,00447	–3,82	–1,273	alle proeven
ADRIANI e.a.	$b_{x_1 a.cx_7}$	$b_{rk.v}$	$b_{x_1 c.ax_7}$	$b_{rv.k}$	
	+0,266	–0,00152	+0,573	–0,6418	alle proeven
eigen berekening		$b_{rk.v}$		$b_{rv.k}$	
		–0,000663		–0,3247	1951
		–0,001536		–0,5694	1952
		–0,000788		–0,0312	1953

Voor de gegevens van ADRIANI e.a. (1945) verloopt de omrekening als volgt:

1. voor $b_{x_1 a}$: $X_1 = 7R + \text{const.}$, (dit hoofdstuk, form. 7)

$$dX_1 = 7dR.$$

Ook is $X_1 = b_{x_1 a} A + \text{const.}$ en

$$dX_1 = b_{x_1 a} dA. \quad \text{Nu is } A = 10^4 \frac{1}{K} \text{ en dus}$$

$$dX_1 = b_{x_1 a}\, d10^4 \frac{1}{K} = -b_{x_1 a} \cdot 10^4 \frac{1}{K^2} dK = 7dR$$

of $$\frac{dR}{dK} = b_{rk} = -\frac{10^4 b_{x_1 a}}{7K^2}, \text{ en aangezien } K = \text{ca. } 500,$$

is $$b_{rk} = \frac{1}{175} b_{x_1 a}.$$

2. voor $b_{x_1 c}$: $X_1 = b_{x_1 c} C + \text{const.}$, dus

$$dX_1 = b_{x_1 c} dC \text{ en omdat } C = 10^2 \frac{1}{V} \text{ en } dX_1 = 7dR, \text{ volgt}$$

$$dR = \frac{b_{x_1 c}}{7}\, d10^2 \frac{1}{V} = -\frac{10^2 b_{x_1 c}}{7V^2} dV. \text{ Nu is } V = \text{ca. } \frac{100}{28}$$

en dus $$\frac{dR}{dV} = b_{rv} = -\frac{28^2}{700} b_{x_1 c}.$$

Voor de vergelijking met $b_{rk \,.\, v}$ en $b_{rv \,.\, k}$ staan bij ADRIANI e.a. geen direct vergelijkbare gegevens ter beschikking, wel echter de regressiecoëfficiënten $b_{x_1 a \,.\, cx_7}$ en $b_{x_1 c \,.\, ax_7}$, waarin X_7 de leeftijd der koe in jaren voorstelt. Aangezien echter de gemiddelde leeftijd der koeien in een zo groot wingebied als waarop ons onderzoek betrekking heeft, van jaar tot jaar niet veel zal veranderen, mogen wij aannemen, dat onze regressiecoëfficiënten zijn berekend voor constante leeftijd. Derhalve mogen zij worden vergeleken met de genoemde coëfficiënten van ADRIANI e.a.

3. voor $b_{x_1 a \,.\, cx_7}$ en $b_{x_1 c \,.\, ax_7}$ geldt:

$$X_1 = b_{x_1 a \,.\, cx_7} A + b_{x_1 c \,.\, ax_7} C + b_{x_1 x_7 \,.\, ac} X_7 + \text{const.},$$

$$dX_1 = b_{x_1 a \,.\, cx_7} dA + b_{x_1 c \,.\, ax_7} dC + b_{x_1 x_7 \,.\, ac} dX_7,$$

$$dX_1 = 7dR$$

en dus $$dR = \frac{1}{7}(b_{x_1 a \,.\, cx_7} dA + b_{x_1 c \,.\, ax_7} dC + b_{x_1 x_7 \,.\, ac} dX_7).$$

Voorts is $$A = 10^4 \frac{1}{K};\ C = 10^2 \frac{1}{V};\ K = \text{ca. } 500 \text{ en } V = \text{ca. } \frac{100}{28},$$

derhalve $$dR = \frac{1}{7}(b_{x_1 a \,.\, c x_7} d10^4 \frac{1}{K} + b_{x_1 c \,.\, a x_7} d10^2 \frac{1}{V} + b_{x_1 x_7 \,.\, ac} dX_7)$$

of $$dR = -\frac{b_{x_1 a \,.\, c x_7} 10^4}{7K^2} dK - \frac{b_{x_1 c \,.\, a x_7} 10^2}{7V^2} dV + \frac{b_{x_1 x_7 \,.\, ac}}{7} dX_7,$$

zodat $$\frac{\partial R}{\partial K} = b_{rk \,.\, v} = -\frac{1}{175} b_{x_1 a \,.\, c x_7},$$

$$\frac{\partial R}{\partial V} = b_{rv \,.\, k} = -\frac{28^2}{700} b_{x_1 c \,.\, a x_7}.$$

In tabel 28 zijn zowel de oorspronkelijke coëfficiënten volgens ADRIANI e.a. opgenomen, als de daaruit berekende waarden voor de coëfficienten overeenkomende met de door ons gebruikte. Ten slotte zijn in deze tabel nog de uitkomsten van onze eigen berekeningen opgenomen.

Bij beschouwing van de tabel blijkt er een redelijke mate van overeenstemming te bestaan tussen onze uitkomsten en de waarden die uit de literatuur kunnen worden verkregen. Dit bewijst, dat het hier gevonden verband tussen het refractometergetal enerzijds en het vetgehalte en de vetproduktie anderzijds inderdaad aanwezig is en tevens, dat het ongeveer van de grootte is welke de door BROUWER (1932a) geformuleerde hypothese voorspelt. In het derde hoofdstuk, waarin de vertering van de voedervetten werd besproken, is hierop reeds nader ingegaan.

HOOFDSTUK 5

VERDER ONDERZOEK NAAR DE FACTOREN, WELKE HET REFRACTOMETERGETAL VAN HET MELKVET BEPALEN

INLEIDING

In het voorgaande hoofdstuk toonden wij aan, dat er een duidelijk verband bestaat tussen het refractometergetal van het melkvet enerzijds en het vetgehalte der melk en de vetproduktie per koe anderzijds. De regressie van het refractometergetal t.o.v. deze grootheden is echter zwak, zoals blijkt uit de berekende regressiecoëfficiënten. Tevens bleek aan de gevonden coëfficiënten slechts een geringe statistische betrouwbaarheid te kunnen worden toegekend. Voor het jaar 1953 was het zelfs niet mogelijk de hypothese, dat er geen enkel verband tussen het refractometergetal en de beide andere grootheden bestond, op statistische gronden te verwerpen. Teneinde de regressiecoëfficiënten nauwkeuriger te kunnen bepalen, dienden wij dus over een uitgebreider cijfermateriaal te kunnen beschikken van gelijke betrouwbaarheid als dat betreffende de Friese zuivelfabrieken. Voor het refractometergetal bleken zowel de gegevens van het botercontrolestation "Gelderland-Overijssel" (BCGO) te Deventer als die van de

gecombineerde botercontrolestations "Eindhoven" en "Maastricht" (BCME) te Roermond voor ons doel geschikt te zijn. De gegevens betreffende de aangevoerde hoeveelheid melk en het vetgehalte daarvan zijn afkomstig van de zuivelfabrieken zelve en deze zullen ongeveer van gelijke betrouwbaarheid zijn als die betreffende de Friese fabrieken. Helaas bleek het onmogelijk te zijn het aantal koeien per fabriek met enige nauwkeurigheid te bepalen, zodat de vetproduktie per koe niet kon worden berekend. Noodgedwongen hebben wij ons onderzoek dus moeten beperken tot het verband tussen refractometergetal en vetgehalte der melk.

Aangezien wij bij de bewerking van de hiervóór genoemde gegevens de indruk kregen, dat wellicht geografische, geologische en klimatologische factoren mede bepalend kunnen zijn voor het refractometergetal van het melkvet, hebben wij de gegevens hierover voor geheel Nederland verzameld. Aan deze gegevens zullen aan het slot van dit hoofdstuk enkele beschouwingen worden gewijd.

§ 1. Het verband tussen het refractometergetal en het vetgehalte der melk

A. Statistische bewerking van het cijfermateriaal

a. Verantwoording van het gebruikte cijfermateriaal. Wij hebben bij ons onderzoek betreffende Gelderland en Overijssel gebruik gemaakt van de refractometergetallen, die ons werden verstrekt door het botercontrolestation "Gelderland-Overijssel" te Deventer. Deze gegevens bestonden uit de tweemaal per maand voor iedere aangesloten fabriek bepaalde refractometergetallen. Deze cijfers werden bepaald met één refractometer bij 40 °C en uitgedrukt in boterrefractometergraden. De refractometer werd op ongeregelde tijden geijkt met een vloeistof van bekende refractie. Voor Zeeland, Noord-Brabant en Limburg werden de gegevens betreffende het refractometergetal verkregen van de gecombineerde botercontrolestations "Eindhoven" en "Maastricht" te Roermond. De refractometergetallen werden voor beide stations met dezelfde refractometer bepaald, geheel zoals vermeld voor BCGO.

De gegevens over de vetgehalten der aangevoerde melk werden ons voor beide gebieden welwillend ter beschikking gesteld door de directeuren der betrokken fabrieken of – na machtiging hunnerzijds – door het Bedrijfschap voor Zuivel te 's-Gravenhage. Deze vetgehalten hadden betrekking op 14-daagse perioden.

Daar wij de uitkomsten van dit deel van het onderzoek wilden vergelijken met de uitkomsten van de bewerking der gegevens omtrent de Friese zuivelfabrieken, was het noodzakelijk de berekeningen voor Friesland op enigszins andere wijze uit te voeren dan in hoofdstuk 4 is geschied. In de eerste plaats leek het ons juister om ten aanzien van de refractometergetallen gebruik te maken van de bepalingen hiervan door het botercontrolestation "Friesland" te Leeuwarden en niet, zoals in hoofdstuk 4, van die uitgevoerd op het FRICO-laboratorium. In de tweede plaats moest het tijdvak waarover de berekeningen werden uitgevoerd, worden aangepast aan dat waarover de berekeningen voor BCGO en BCME mogelijk waren. In verband met het tijdstip waarop de monsterneming voor de bepaling van het refractometergetal door BCGO en BCME werd verricht, was het niet mogelijk het berekeningstijdvak te beëindigen op 20 september, zoals voor Friesland is geschied, doch eerst op 30 september. De

gegevens over het refractometergetal van het melkvet, aangevoerd bij de FRICO-deelgenoten, werden dus verkregen van het botercontrolestation "Friesland" en die betreffende het vetgehalte van de FRICO-deelgenoten zelve.

Ten aanzien van het gehele cijfermateriaal dient nog te worden opgemerkt, dat alle cijfers afkomstig zijn van routinebepalingen, welke uit de aard der zaak niet de nauwkeurigheid hebben, die kan worden verkregen bij wetenschappelijke proeven. Daar wij bij onze berekeningen echter gebruik maken van gemiddelden over een aantal waarden (gewoonlijk 8) zal de invloed van deze geringere nauwkeurigheid voor een groot deel worden geëlimineerd.

Voorts zij er nog op gewezen, dat het refractometergetal door de controlestations wordt bepaald in een steekmonster van de boter, welke in het betrokken tijdvak op de zuivelfabriek is bereid. Dit kan tot gevolg hebben, dat de uitkomst van de bepaling niet representatief is voor alle in dat tijdvak aangevoerde melk. De berekening van het gemiddelde over langere tijd zal de gemaakte fout ook hier doen verminderen.

De gegevens omtrent de vetgehalten der melk hebben betrekking op alle aangevoerde melk, hetgeen echter niet inhoudt, dat zij dan ook representatief zijn voor de vetgehalten van alle door de koeien geproduceerde melk. In sommige streken, voornamelijk in de gebieden van BGCO en BCME, houden de veehouders namelijk dat deel van het melkmaal voor eigen gebruik achter, dat het minste vet bevat. Wij moeten dit dus bij de beschouwing van de uitkomsten onzer berekeningen niet uit het oog verliezen.

b. Berekening van het gemiddelde refractometergetal en het gemiddelde vetgehalte per fabriek. Voor het refractometergetal (R) maakten wij gebruik van het gemiddelde over de maanden juni, juli, augustus en september van elk der jaren 1951, 1952 en 1953. Dit gemiddelde werd verkregen door eerst het gemiddelde per maand te berekenen en vervolgens deze vier getallen te sommeren en hun som door 4 te delen. Deze wijze van berekenen was noodzakelijk, omdat in enkele gevallen slechts één refractometergetal voor een maand beschikbaar was en dus op deze wijze een juister gemiddelde werd verkregen dan door eenvoudig alle waarnemingen te sommeren en vervolgens te delen door het aantal waarnemingen.

Het rekenkundig gemiddelde der vetgehalten (V) per fabriek werd gevonden door voor elke fabriek te sommeren over alle perioden, welke vielen in het tijdvak van 1 juni tot en met 30 september, vermeerderd met een proportioneel deel van die perioden, welke niet geheel binnen dit tijdvak vielen. Vervolgens werd deze som gedeeld door het aantal perioden. Deze berekening werd dus geheel uitgevoerd op de wijze, zoals die in het voorgaande hoofdstuk (IVb) is beschreven.

Tabel 29 geeft een overzicht van de cijfers voor BCME, tabel 30 van die voor BCGO en tabel 31 van die voor BCF-FRICO. Voorts zijn deze cijfers verwerkt in grafieken (fig. 18, 19 en 20).

c. Statistische bewerking van de gegevens. Uit de gegevens omtrent refractometergetal en vetgehalte werden vervolgens per controlestation en per jaar het gemiddelde refractometergetal ($\bar{R}$) en het gemiddelde vetgehalte ($\bar{V}$) berekend. Voorts berekenden wij de correlatiecoëfficiënt ρ_{rv}, de regressiecoëfficiënt b_{rv}, de standaardafwijking van deze coëfficiënt $s_{b_{rv}}$ en het quotiënt der beide laatst genoemde grootheden $t_{b_{rv}}$, hetwelk een maat is voor de statistische waarschijn-

TABEL 29. De waarden van refractometergetal en vetgehalte per zuivelfabriek over het tijdvak van 1 juni tot en met 30 september van elk der jaren 1951, 1952 en 1953
Zuivelfabrieken in Zeeland, Noord-Brabant en Limburg, aangesloten bij de gecombineerde botercontrolestations "Eindhoven" en "Maastricht" te Roermond

Fa-	1951		1952		1953		Fa-	1951		1952		1953	
briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*	briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*
1	43,80	3,54	43,99	3,37	44,28	3,45	46	43,69	3,53	44,25	3,50	44,59	3,61
2	44,08	3,54	44,25	3,48	44,45	3,52	47	44,28	3,39	44,62	3,34	44,90	3,39
3	43,72	3,44	43,90	3,42	44,28	3,45	48	43,52	3,46	43,96	3,47	44,42	3,42
4	43,91	3,54	44,18	3,50	44,49	3,55	49	43,91	3,54	44,14	3,53	44,62	3,51
5	43,79	3,53	43,95	3,50	44,14	3,54	50	43,74	3,54	44,06	3,51	44,35	3,53
6	44,04	3,42	44,49	3,32	44,64	3,42	51	44,18	3,45	44,56	3,40	44,56	3,46
7	43,81	3,48	44,11	3,42	44,50	3,46	52	43,82	3,44	44,12	3,42	44,35	3,43
8	43,74	3,44	44,20	3,44	44,30	3,52	53	44,15	3,46	44,12	3,42	44,59	3,45
9	43,78	3,42	44,25	3,35	44,39	3,42	54	43,84	3,38	44,29	3,34	44,42	3,45
10	43,80	3,40	44,16	3,38	44,49	3,38	55	44,38	3,45	44,56	3,40	44,56	3,46
11	43,80	3,47	44,02	3,47	44,38	3,52	56	43,60	3,53	43,95	3,50	44,11	3,50
12	43,58	3,54	43,91	3,52	44,51	3,55	57	43,60	3,46	43,76	3,46	43,95	3,51
13	43,72	3,48	44,12	3,46	44,35	3,50	58	43,98	3,51	44,10	3,48	44,58	3,51
14	44,02	3,34	44,02	3,34	44,41	3,37	59	43,98	3,52	44,28	3,48	44,44	3,49
15	43,88	3,42	44,09	3,34	44,50	3,38	60	43,90	3,43	44,21	3,35	44,50	3,43
16	44,26	3,39	44,68	3,36	44,55	3,38	61	43,92	3,33	44,31	3,31	44,68	3,38
17	43,94	3,47	44,18	3,48	44,60	3,54	62	43,72	3,47	44,18	3,43	44,42	3,45
18	43,74	3,49	44,10	3,44	44,50	3,45	63	43,89	3,52	44,18	3,46	44,60	3,47
19	43,86	3,40	44,19	3,37	44,39	3,47	64	43,86	3,41	44,00	3,35	44,51	3,41
20	44,01	3,36	44,45	3,30	44,62	3,37	65	43,74	3,51	44,04	3,48	44,35	3,56
21	43,81	3,42	44,20	3,39	44,42	3,42	66	43,76	3,39	43,94	3,37	44,34	3,38
22	43,78	3,41	44,12	3,41	44,38	3,44	67	43,58	3,57	43,95	3,51	44,35	3,51
23	43,74	3,53	44,29	3,48	44,64	3,50	68	43,84	3,42	44,16	3,40	44,44	3,43
24	43,85	3,39	44,12	3,36	44,62	3,45	69	43,60	3,43	43,86	3,35	44,19	3,49
25	43,85	3,53	44,34	3,50	44,41	3,51	70	43,88	3,42	44,12	3,43	44,22	3,48
26	44,41	3,39	44,41	3,38	44,70	3,44	71	43,88	3,41	44,06	3,33	44,59	3,39
27	43,71	3,54	44,06	3,51	44,39	3,55	72	43,76	3,51	44,20	3,46	44,56	3,50
28	43,81	3,57	44,11	3,51	44,34	3,54	73	43,39	3,60	43,22	3,61	44,11	3,61
29	43,76	3,42	44,18	3,34	44,34	3,39	74	44,08	3,35	44,31	3,29	44,56	3,36
30	43,80	3,48	44,31	3,43	44,49	3,47	75	44,18	3,39	44,40	3,36	44,79	3,45
31	44,11	3,43	44,26	3,33	44,40	3,34	76	44,11	3,37	44,45	3,38	44,45	3,45
32	44,06	3,44	44,38	3,39	44,52	3,41	77	44,15	3,43	44,22	3,42	44,76	3,41
33	44,19	3,35	44,49	3,29	44,72	3,38	78	44,25	3,48	44,08	3,49	44,60	3,56
34	44,16	3,43	44,16	3,39	44,52	3,47	79	44,09	3,52	43,92	3,44	44,59	3,43
35	43,66	3,48	44,09	3,43	44,32	3,49	80	43,34	3,43	43,80	3,46	44,10	3,49
36	44,20	3,41	44,32	3,35	44,89	3,34	81	44,54	3,41	44,55	3,42	44,72	3,45
37	43,81	3,47	43,99	3,45	44,39	3,48	82	43,91	3,44	44,18	3,44	44,46	3,49
38	44,26	3,46	44,46	3,42	44,39	3,43	83	43,75	3,51	43,95	3,46	44,32	3,50
39	44,04	3,52	44,31	3,47	44,62	3,52	84	44,12	3,43	44,32	3,38	44,78	3,44
40	44,01	3,42	44,29	3,31	44,45	3,34	85	43,98	3,48	44,28	3,42	44,72	3,48
41	44,22	3,32	44,62	3,30	44,65	3,34	86	44,65	3,26	44,58	3,30	44,90	3,31
42	43,55	3,64	43,46	3,60	43,95	3,56	87	44,01	3,38	44,29	3,33	44,49	3,35
43	43,96	3,41	44,26	3,35	44,56	3,42	88	43,66	3,55	43,84	3,50	44,26	3,54
44	43,78	3,39	44,01	3,43	44,41	3,49	89	44,19	3,45	44,30	3,37	44,85	3,38
45	43,85	3,44	44,20	3,41	44,58	3,44	90	44,49	3,43	44,61	3,38	44,92	3,43

vervolg tabel 29

Fabriek	1951		1952		1953		Fabriek	1951		1952		1953	
	R	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*		*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*
91	43,75	3,55	44,01	3,48	44,46	3,48	101	44,35	3,39	44,36	3,32	44,95	3,31
92	43,96	3,51	44,22	3,51	44,65	3,53	102	43,74	3,49	44,21	3,45	44,42	3,44
93	44,21	3,32	44,38	3,35	44,65	3,37	103	44,15	3,57	44,12	3,53	44,55	3,50
94	43,86	3,53	44,24	3,50	44,56	3,50	104	44,09	3,48	44,42	3,43	44,55	3,47
95	43,94	3,43	44,19	3,43	44,39	3,41	105	43,90	3,51	44,05	3,46	44,52	3,54
96	43,88	3,56	44,19	3,51	44,62	3,55	106	44,05	3,41	44,34	3,36	44,70	3,44
97	44,18	3,43	44,29	3,41	44,69	3,38	107	43,79	3,63	–	–	44,22	3,47
98	43,79	3,53	44,08	3,47	44,41	3,48							
99	44,32	3,36	44,60	3,35	44,95	3,34							
100	43,74	3,60	43,99	3,50	44,20	3,52							

R = gemiddelde refractometergetal uitgedrukt in boterrefractometergraden
V = gemiddelde vetgehalte der melk in procenten

TABEL 30. De waarden van refractometergetal en vetgehalte per zuivelfabriek over het tijdvak van 1 juni tot en met 30 september van elk der jaren 1951, 1952 en 1953
Zuivelfabrieken in Gelderland en Overijssel, aangesloten bij het botercontrolestation "Gelderland-Overijssel" te Deventer

Fabriek	1951		1952		1953		Fabriek	1951		1952		1953	
	R	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*		*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*
1	44,12	3,42	44,21	3,44	44,15	3,49	26	44,09	3,46	43,84	3,46	44,02	3,53
2	43,88	3,65	43,95	3,65	44,08	3,72	27	43,99	3,59	43,99	3,72	43,99	3,57
3	43,92	3,53	44,18	3,52	43,89	3,58	28	44,19	3,53	44,14	3,53	44,19	3,52
4	44,39	3,38	44,35	3,41	44,36	3,43	29	44,34	3,40	44,26	3,39	44,34	3,44
5	43,69	3,71	43,76	3,72	43,74	3,74	30	44,15	3,52	44,19	3,55	44,11	3,61
6	43,80	3,61	43,79	3,59	43,91	3,61	31	–	–	43,92	3,64	43,95	3,67
7	44,29	3,45	44,12	3,46	44,19	3,54	32	43,81	3,54	44,05	3,53	43,85	3,61
8	44,22	3,44	44,25	3,40	44,39	3,48	33	43,71	3,61	43,58	3,62	43,76	3,60
9	44,25	3,45	44,29	3,42	44,38	3,45	34	44,26	3,42	44,24	3,38	44,25	3,42
10	44,22	3,40	44,10	3,43	44,14	3,48	35	44,15	3,43	44,22	3,42	44,21	3,46
11	43,95	3,56	44,06	3,53	43,91	3,59	36	44,29	3,50	44,39	3,54	44,12	3,58
12	44,25	3,41	44,32	3,41	44,40	3,46	37	43,61	3,60	43,65	3,57	43,65	3,63
13	44,24	3,47	–	–	44,22	3,52	38	44,12	3,56	44,32	3,56	44,16	3,53
14	44,40	3,40	44,22	3,40	44,32	3,40	39	44,11	3,46	44,30	3,45	44,14	3,49
15	43,81	3,64	43,76	3,59	43,85	3,62	40	44,16	3,47	44,21	3,51	44,15	3,59
16	44,22	3,55	44,19	3,60	44,09	3,54	41	44,39	3,37	44,52	3,35	44,41	3,40
17	43,88	3,69	43,79	3,65	43,70	3,67	42	44,36	3,43	44,29	3,45	44,35	3,48
18	44,21	3,46	44,25	3,48	44,39	3,53	43	44,14	3,49	44,19	3,48	44,08	3,52
19	44,19	3,60	44,20	3,60	44,16	3,65	44	43,99	3,46	44,08	3,44	44,01	3,49
20	44,00	3,52	44,05	3,53	44,00	3,57	45	44,12	3,45	44,16	3,52	44,05	3,52
21	44,04	3,54	44,09	3,59	44,02	3,63	46	44,38	3,35	44,19	3,37	44,39	3,41
22	44,16	3,58	44,20	3,56	44,11	3,63	47	–	–	43,92	3,52	43,98	3,57
23	43,92	3,51	43,99	3,53	43,89	3,59	48	44,10	3,48	44,19	3,51	44,02	3,54
24	43,92	3,54	44,11	3,55	44,04	3,60	49	44,22	3,35	44,32	3,36	44,22	3,43
25	44,45	3,34	44,52	3,37	44,40	3,41	50	43,50	3,66	43,58	3,65	43,56	3,68

vervolg tabel 30

Fa-	1951		1952		1953		Fa-	1951		1952		1953	
briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*	briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*
51	43,58	3,67	43,52	3,69	43,60	3,72	86	44,56	3,44	44,64	3,46	44,51	3,49
52	44,36	3,46	44,50	3,48	44,22	3,59	87	44,40	3,38	44,50	3,34	44,55	3,35
53	43,89	3,62	43,95	3,60	43,75	3,60	88	44,29	3,48	44,28	3,50	44,26	3,57
54	44,02	3,52	44,08	3,54	44,16	3,61	89	–	–	44,56	3,31	44,70	3,35
55	43,99	3,65	43,84	3,70	43,86	3,72	90	43,95	3,62	43,96	3,59	44,01	3,62
56	44,24	3,39	44,09	3,42	44,11	3,46	91	44,19	3,46	44,16	3,48	44,24	3,52
57	44,39	3,38	44,40	3,38	44,32	3,39	92	44,76	3,35	44,92	3,37	44,79	3,33
58	44,32	3,36	44,36	3,36	44,46	3,42	93	44,18	3,50	44,28	3,51	44,11	3,55
59	44,09	3,46	44,06	3,43	44,08	3,51	94	44,14	3,40	44,19	3,41	44,25	3,47
60	44,05	3,47	44,16	3,41	44,04	3,50	95	44,01	3,44	44,09	3,42	44,09	3,49
61	44,08	3,46	44,08	3,46	44,12	3,50	96	44,26	3,46	44,48	3,39	44,41	3,41
62	44,00	3,46	43,86	3,45	44,02	3,50	97	44,12	3,39	43,88	3,41	43,90	3,46
63	–	–	44,00	3,46	44,08	3,53	98	44,00	3,44	43,98	3,47	43,95	3,49
64	44,06	3,53	44,06	3,54	44,10	3,59	99	43,69	3,50	43,96	3,52	43,79	3,54
65	43,82	3,43	43,86	3,47	43,86	3,51	100	43,85	3,47	43,96	3,36	44,02	3,30
66	44,51	3,45	44,69	3,45	44,75	3,46	101	43,90	3,49	43,84	3,51	43,96	3,55
67	44,31	3,40	44,28	3,40	–	–	102	44,19	3,47	44,15	3,52	44,14	3,54
68	44,10	3,53	44,19	3,55	44,15	3,60	103	44,44	3,50	44,42	3,51	44,35	3,54
69	44,61	3,35	44,65	3,35	44,55	3,43	104	44,40	3,30	44,26	3,42	44,31	3,43
70	44,10	3,48	44,15	3,50	44,22	3,57	105	44,26	3,50	44,12	3,45	44,09	3,52
71	–	–	44,51	3,31	44,46	3,31	106	44,71	3,31	44,69	3,23	44,69	3,34
72	44,39	3,47	44,42	3,44	44,59	3,49	107	43,99	3,65	43,68	3,65	43,92	3,68
73	44,32	3,43	44,39	3,44	44,21	3,50	108	44,20	3,44	44,54	3,46	44,20	3,48
74	44,74	3,22	44,71	3,18	44,55	3,23	109	44,49	3,39	44,54	3,33	44,55	3,39
75	44,29	3,47	44,31	3,47	44,34	3,48	110	44,55	3,35	44,64	3,31	44,65	3,39
76	44,52	3,36	44,34	3,36	44,48	3,43	111	44,29	3,50	44,21	3,49	44,28	3,60
77	44,21	3,43	44,21	3,40	44,21	3,46	112	44,06	3,51	43,98	3,54	44,10	3,60
78	45,10	3,26	45,31	3,08	45,12	3,16	113	44,59	3,45	44,70	3,47	44,61	3,47
79	44,05	3,47	43,99	3,45	43,88	3,49	114	44,14	3,49	44,24	3,52	44,10	3,56
80	44,52	3,46	44,42	3,44	44,50	3,45	115	44,50	3,45	44,75	3,39	44,84	3,45
81	44,21	3,45	44,32	3,39	44,26	3,41							
82	43,90	3,47	43,89	3,49	44,00	3,56							
83	43,99	3,38	43,94	3,38	43,90	3,47							
84	44,29	3,43	44,19	3,46	44,19	3,51							
85	44,80	3,44	44,91	3,43	44,79	3,43							

R = gemiddelde refractometergetal uitgedrukt in boterrefractometergraden
V = gemiddelde vetgehalte der melk in procenten

TABEL 31. De waarden van refractometergetal en vetgehalte per zuivelfabriek over het tijdvak van 1 juni tot en met 30 september van elk der jaren 1951, 1952 en 1953
Zuivelfabrieken in Friesland, aangesloten bij het botercontrolestation "Friesland" te Leeuwarden en bij de "FRICO" te Leeuwarden

Fa-	1951		1952		1953		Fa-	1951		1952		1953	
briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*	briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*
1	42,94	4,00	42,92	3,95	43,58	3,87	4	43,00	3,82	43,21	3,82	43,54	3,82
2	42,92	3,96	42,80	3,93	43,48	3,92	5	43,01	3,90	43,19	3,86	43,69	3,86
3	42,91	3,94	42,81	3,95	43,39	3,95							

vervolg tabel 31

Fa-	1951		1952		1953		Fa-	1951		1952		1953	
briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*	briek	*R*	*V*	*R*	*V*	*R*	*V*
6	43,00	4,02	42,81	3,98	43,50	4,01	31	43,08	4,01	42,96	3,96	43,62	3,95
7	43,26	3,84	43,28	3,81	43,54	3,82	32	42,84	3,71	42,98	3,72	43,32	3,78
8	42,85	3,95	42,78	3,91	43,51	3,92	33	43,06	3,79	43,14	3,76	43,31	3,81
9	42,86	4,19	42,96	4,11	43,46	4,17	34	42,84	3,84	42,92	3,77	43,36	3,82
10	42,98	4,02	43,12	3,95	43,66	4,05	35	42,91	4,02	42,72	3,97	43,54	3,93
11	42,84	4,11	42,84	4,05	43,38	4,06	36	43,18	3,85	43,31	3,80	43,68	3,88
12	43,09	3,77	43,36	3,77	43,75	3,75	37	42,81	4,07	42,89	4,00	43,46	4,05
13	43,18	3,81	43,24	3,82	43,71	3,83	38	43,14	4,00	43,10	3,98	43,60	4,01
14	43,10	3,95	43,12	3,92	43,44	3,96	39	43,02	3,80	43,18	3,76	43,32	3,83
15	43,11	3,81	43,09	3,80	43,46	3,82	40	43,00	3,81	43,05	3,82	43,34	3,78
16	43,09	3,85	43,08	3,79	43,40	3,87	41	42,86	3,85	42,90	3,85	43,40	3,89
17	42,75	4,05	42,75	4,01	43,19	4,05	43	42,78	3,99	42,98	3,97	43,45	3,94
18	43,05	3,85	43,10	3,81	43,44	3,87	44	42,95	3,76	43,06	3,75	43,46	3,82
19	42,96	3,86	43,12	3,85	43,54	3,89	45	42,91	3,85	43,01	3,85	43,34	3,87
20	42,99	3,85	43,08	3,80	43,42	3,83							
21	42,92	3,79	43,09	3,87	43,48	3,87	46	43,20	3,92	43,02	3,91	43,59	3,91
22	43,08	3,94	43,02	3,82	43,58	3,94	47	43,06	4,00	43,26	3,96	43,54	3,94
23	42,55	3,89	42,68	3,86	43,19	3,85	48	43,14	3,86	43,02	3,87	43,69	3,76
24	42,82	4,02	42,88	3,99	43,40	4,01	49	43,09	3,91	43,01	3,91	43,35	3,93
25	43,14	4,09	42,92	4,02	43,52	4,01	50	43,20	3,80	43,30	3,72	43,66	3,84
26	42,92	3,95	42,91	3,90	43,48	3,92	51	43,05	3,94	42,92	3,88	43,44	3,92
27	43,18	3,86	43,10	3,82	43,64	3,83	52	42,90	4,11	42,90	4,03	43,30	4,03
28	42,76	3,92	42,98	3,92	43,44	3,91	53	42,98	3,82	43,06	3,83	43,36	3,85
29	43,02	3,91	43,04	3,91	43,44	3,91							
30	43,01	3,78	43,12	3,76	43,61	3,81							

R = gemiddelde refractometergetal uitgedrukt in boterrefractometergraden
V = gemiddelde vetgehalte der aangevoerde melk in procenten

TABEL 32. Uitkomsten der statistische bewerking van refractometergetallen en vetgehalten voor de zuivelfabrieken, aangesloten bij BCME, BCGO en BCF

		n	$\bar{R}$	$\bar{V}$	ϱ_{rv}	b_{rv}	$s_{b_{rv}}$	$t_{b_{rv}}$	$\hat{R}_{rv}$
	BCME	107	43,927	3,458	–0,5186	–1,7294	0,27826	6,22	49,91–1,729*V*
1951	BCGO	110	44,177	3,472	–0,7378	–2,1641	0,19054	11,36	51,69–2,164*V*
	BCF	52	42,986	3,912	–0,2737	–0,3628	0,18031	2,01	44,41–0,363*V*
	BCME	106	44,187	3,419	–0,5798	–1,9269	0,26553	7,26	50,78–1,927*V*
1952	BCGO	114	44,201	3,471	–0,7023	–1,9579	0,18753	10,44	51,00–1,958*V*
	BCF	52	43,021	3,881	–0,5526	–0,9424	0,20100	4,69	46,68–0,942*V*
	BCME	107	44,496	3,456	–0,4659	–1,4207	0,26331	5,40	49,41–1,421*V*
1953	BCGO	114	44,184	3,512	–0,7515	–2,1011	0,17429	12,06	51,56–2,101*V*
	BCF	52	43,481	3,902	–0,1472	–0,2159	0,20520	1,05	44,32–0,216*V*

Voor verklaring der symbolen en de betekenis der uitkomsten: zie tekst.

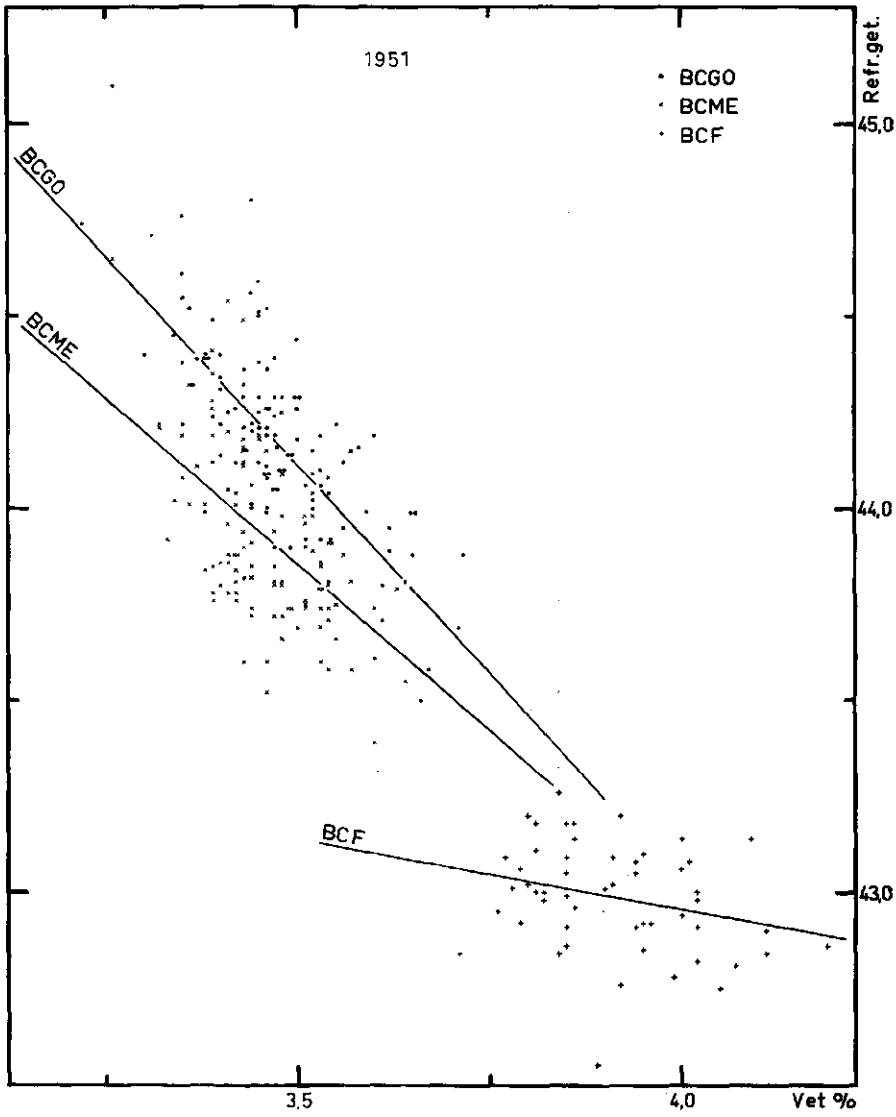


FIG. 18. Het verband tussen het refractometergetal van het melkvet en het vetpercentage der melk.
Verklaring: Refr. get. = gemiddelde refractometergetal per fabriek over het tijdvak van 1 juni tot en met 30 september.
Vet % = gemiddelde vetpercentage van de melk, welke gedurende het bovengenoemde tijdvak bij de fabriek is aangevoerd.
BCGO = botercontrolestation "Gelderland-Overijssel".
BCME = botercontrolestations "Maastricht" en "Eindhoven".
BCF = botercontrolestation "Friesland".
——— = regressielijn van het refractometergetal t.o.v. het vetpercentage.

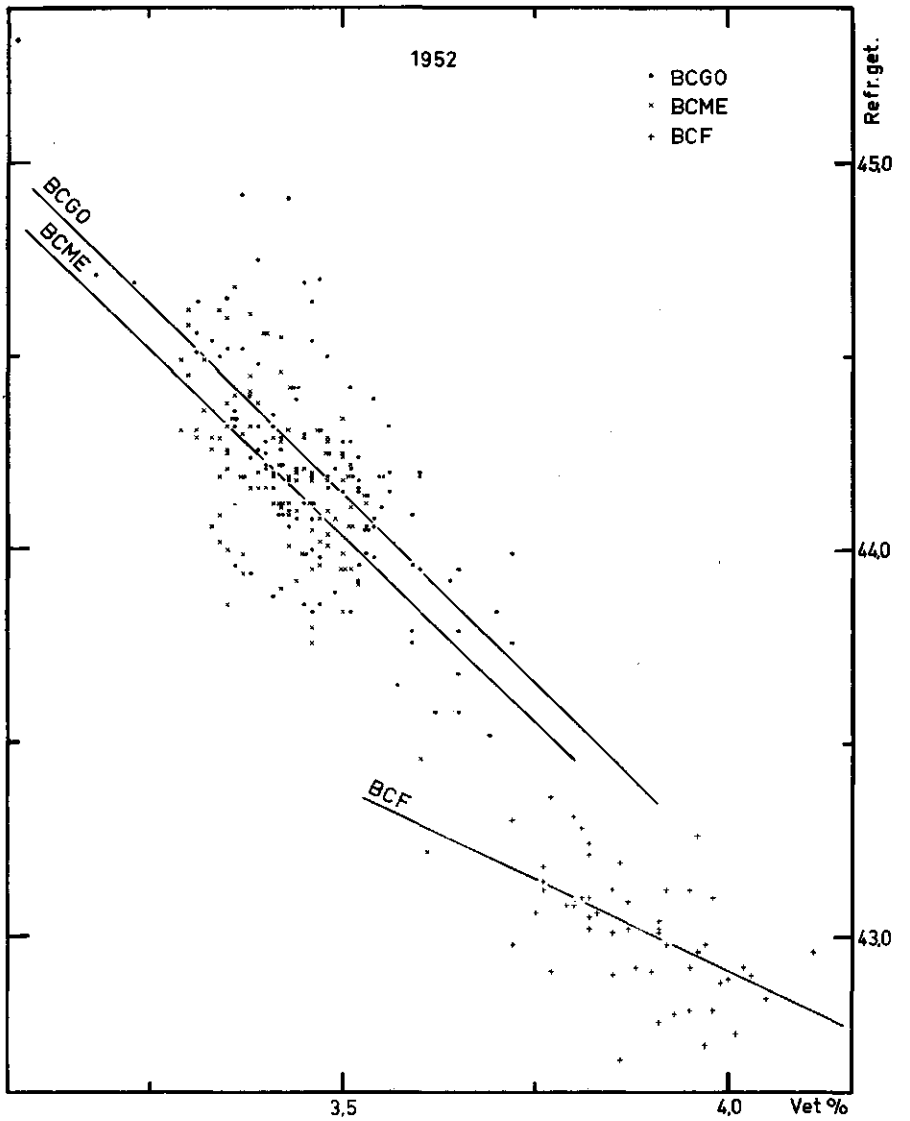


FIG. 19. Het verband tussen het refractometergetal van het melkvet en het vetpercentage der melk.
Verklaring: zie figuur 18.

lijkheid, dat er inderdaad een verband bestaat tussen het refractometergetal en het vetgehalte der melk in de door de regressiecoëfficiënt aangegeven zin. Ten slotte werd nog de regressievergelijking

$$\hat{R}_{rv} = \text{const.} + b_{rv}V$$

berekend. De uitkomsten dezer berekeningen zijn opgenomen in tabel 32, teza-

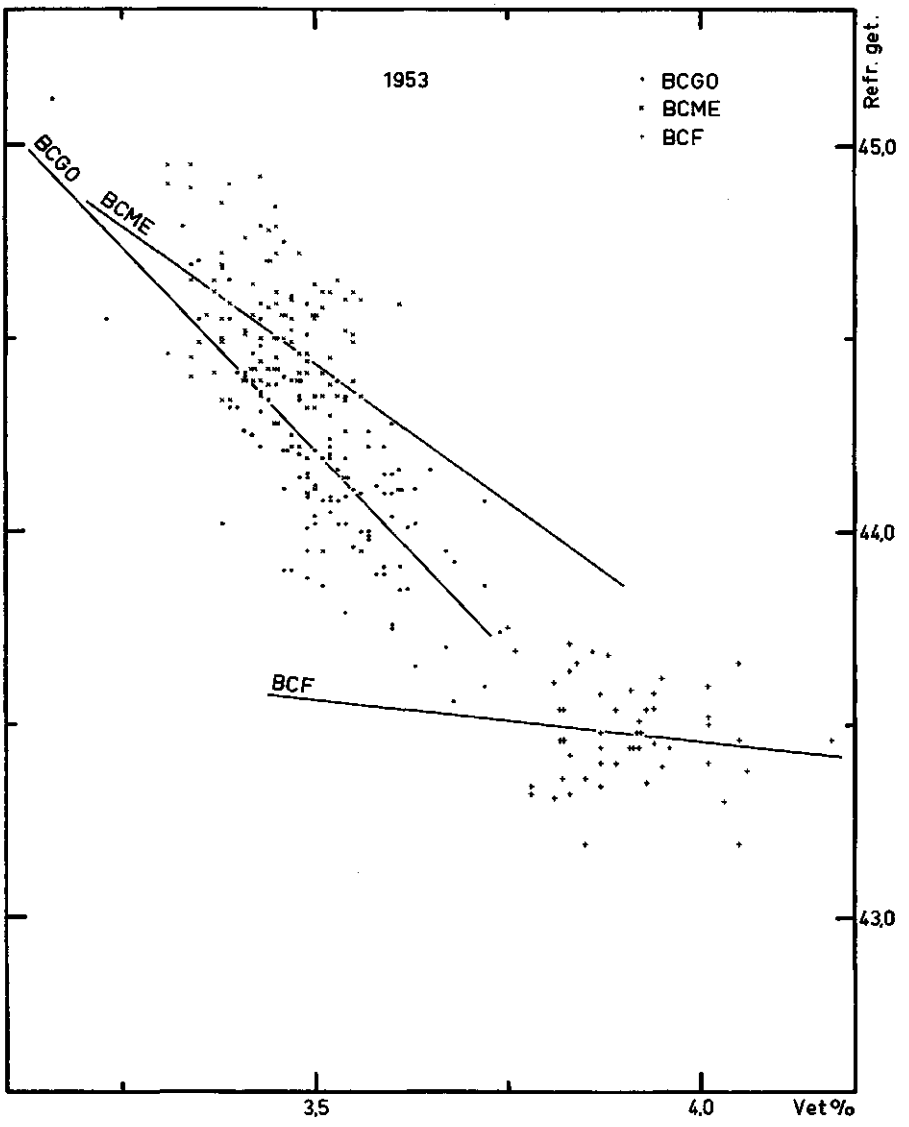


FIG. 20. Het verband tussen het refractometergetal van het melkvet en het vetpercentage der melk.
Verklaring: zie figuur 18.

men met het aantal (n) der fabrieken, waarover voor elk controlestation en elk jaar gegevens ter beschikking stonden. De berekende regressielijnen zijn tevens ingetekend in de grafieken (fig. 18, 19 en 20).

d. Bespreking der uitkomsten. Een beschouwing der regressiecoëfficiënten leert ons, dat deze alle zonder uitzondering negatief zijn en liggen tussen

–0,2159 en –2,1641. Voorts blijkt de absolute waarde dezer coëfficiënten voor de gebieden van BCME en BCGO aanzienlijk groter te zijn dan voor het gebied van BCF-FRICO. Uit de waarden voor $t_{b_{ry}}$ blijkt, dat de gedachte dat er geen verband zou bestaan tussen refractometergetal en vetgehalte, de "nulhypothese", met grote stelligheid kan worden verworpen. Wanneer wij de waarden van deze statistische grootheid voor elk gebied en elk jaar afzonderlijk bezien, zouden wij deze gedachten ten aanzien van BCF in 1953 niet kunnen verwerpen, doch de gevonden regressiecoëfficiënt is toch negatief. Gezien de uitkomsten voor de overige berekeningen kan deze laatste uitkomst niet worden gezien als een bewijs van onafhankelijkheid van refractometergetal en vetgehalte.

De betekenis der gevonden regressiecoëfficiënten blijkt wanneer wij berekenen hoe groot de daling van het refractometergetal zou zijn bij een stijging van het vetgehalte der melk van 3,45% (ongeveer het gemiddelde voor BCME en BCGO) tot 3,90% (ongeveer het gemiddelde voor BCF). Deze daling bedraagt voor BCME circa $1{,}7 \times 0{,}45 = 0{,}76$ eenheden en voor BCGO $2{,}1 \times 0{,}45 = 0{,}94$ eenheden. Deze dalingen zijn zeer aanzienlijk en brengen het gemiddelde refractometergetal voor BCME op ongeveer 43,5 en voor BCGO op 43,3 hetgeen vrijwel overeenstemt met het Friese gemiddelde 43,1.

Rechtstreekse vergelijking van onze uitkomsten met literatuurgegevens is helaas niet mogelijk. BROUWER (1932a) berekende echter wel de samenhang tussen joodadditiegetal en vetgehalte en de door hem verkregen regressiecoëfficiënten kunnen bij benadering worden omgerekend tot die voor de samenhang tussen refractometergetal en vetgehalte. Deze omrekening is reeds in hoofdstuk 4 vermeld en wij herhalen hier slechts de aldaar verkregen omgerekende waarde voor het gemiddelde van deze coëfficiënten, namelijk –1,70. ADRIANI e.a. (1945) berekenden de regressiecoëfficiënten voor de samenhang tussen "refractie" en de reciproke van het vetgehalte. Ook van deze gegevens is de omrekening reeds in hoofdstuk 4 beschreven. Deze auteurs vonden gemiddeld –0,876. Onze uitkomsten voor BCME en BCGO zijn in vergelijking met de beide literatuurgegevens in absolute waarde dus aanzienlijk groter. Doch men verlieze niet uit het oog, dat de literatuurgegevens slechts op geringe aantallen koeien betrekking hebben, waardoor toevallige fouten in de waarnemingen de absolute waarden van de regressiecoëfficiënten belangrijk zouden kunnen verlagen. Voorts heeft ook de omrekening van de coëfficiënten een verkleining van de absolute waarde ten gevolge.

Onze uitkomsten voor BCF zijn daarentegen in absolute waarde gelijk of zelfs aanzienlijk lager. Hierbij kan geen sprake zijn van een verlaging van de absolute waarden door een gering aantal waarnemingen. Wij kunnen een mogelijke verklaring voor de verschillen tussen de onderscheiden coëfficiënten vinden in de door ons in hoofdstuk 3 ontwikkelde theorie omtrent de invloed van de onverzadigde vetzuren uit het voeder op de samenstelling van het melkvet. Op grond van deze theorie leidden wij de volgende formule af:

$$J = \frac{fE}{S}\left(42{,}3\,\frac{G+300}{K} + 141\,\frac{1}{V} + 52{,}875\right)$$

(hoofdst. 3, form. 8).

In algemene gedaante luidt deze formule:

$$J = a\,\frac{G+300}{K} + b\frac{1}{V} + c. \qquad (1)$$

Aangezien reeds vele auteurs (o.a. VAN DAM, 1938) hebben aangetoond dat er een zeer nauw lineair verband bestaat tussen het J-getal en het refractometergetal van het melkvet, kunnen wij bovenstaande formule vervangen door:

$$eR + g = a\frac{G + 300}{K} + \frac{b}{V} + c, \tag{2}$$

waarin a, b, c, e en g constanten zijn, waarvan a, b en e beslist positief zijn. In deze formule komen naast V ook nog G (gewicht der koe) en K (vetproduktie per koe) voor en daar wij zoeken naar het verband tussen R en V moeten wij trachten deze beide grootheden te elimineren.

Nu vond BROUWER (1932a) een positieve correlatie (coëfficiënt + 0,2569) tussen K en V bij een aantal proeven, waarbij de koeien gedurende een vrij lange tijd werden geobserveerd. Onder de proefdieren bevonden zich zowel voorjaars- als herfstkalvers en deze positieve correlatie werd dus gevonden ondanks het feit, dat de dieren zich in zeer verschillende stadia van de lactatieperiode bevonden. Het is immers welbekend, dat naarmate de lactatie voortschrijdt het vetpercentage stijgt en de vetopbrengst daalt, hetgeen een negatieve correlatie zou moeten geven. Ook ons eigen onderzoek van de gegevens omtrent de Friese zuivelfabrieken levert een positieve correlatie tussen K en V; de correlatiecoëfficiënten tussen de fabrieksgemiddelden voor de jaren 1951, 1952 en 1953 zijn nl. resp. + 0,6098, + 0,5728 en + 0,5970. Uit deze gegevens mogen wij een causaal verband tussen K en V afleiden; dit verband is mogelijk lineair of wijkt althans in het normale K- en V-traject weinig daarvan af. We mogen dus schrijven:

$$K = hV + j, \tag{3}$$

waarbij h positief is.

Ten aanzien van G valt weinig te zeggen; uit de gegevens van BROUWER valt een zeer zwak positieve correlatie tussen $\frac{G + 300}{K}$ en $\frac{1}{V}$ af te leiden, terwijl uit de publikatie van ADRIANI e.a. (1945) eveneens een positieve correlatie tussen deze beide grootheden kan worden afgeleid. Voorts zal de waarde van G van fabriek tot fabriek weinig verschillen, daar hierbij gemiddeld wordt over grote aantallen dieren.

Op grond van het hiervoor gezegde zullen wij niet ver bezijden de waarheid zijn, wanneer wij in formule (2) $G + 300$ vervangen door een positieve constante (k); de gehele formule wordt dan:

$$eR + g = a\frac{k}{hV + j} + \frac{b}{V} + c, \tag{4}$$

waaruit volgt:

$$\frac{dR}{dV} = -\frac{akh}{e}\frac{1}{(hV + j)^2} - \frac{b}{eV^2} = b_{rv}. \tag{5}$$

Aangezien de constanten a, b, e, h en k positief zijn en de beide kwadraten eveneens, volgt uit (5), dat b_{rv} negatief moet zijn en dat de absolute waarde van b_{rv} bij toenemende V zeer snel kleiner moet worden, aangezien V in een kwadratische functie in de noemers van beide breuken voorkomt. Dit is geheel

in overeenstemming met hetgeen door ons werd gevonden; ook het verschil tussen de regressiecoëfficiënten gevonden door BROUWER en door ADRIANI e.a. is in overeenstemming met deze formule. Het vetpercentage was bij eerstgenoemde auteur gemiddeld nl. 3,27% en bij ADRIANI e.a. 3,57%. Op grond van deze vetpercentages en van onze eigen uitkomsten bij een vetpercentage van ca. 3,47% zou men als regressiecoëfficiënten verwachten ca. –2,5, resp. ca. –1,7; de genoemde auteurs vonden echter –1,275, resp. –0,876. Men dient echter niet te vergeten, dat bij beide onderzoekingen slechts geringe aantallen koeien waren betrokken en dat bij het omrekenen van de oorspronkelijke regressiecoëfficiënten van benaderingen gebruik is gemaakt.

Samenvattend kan worden gezegd, dat de gevonden regressiecoëfficiënten in overeenstemming zijn met de door ons opgestelde theorie omtrent het verband tussen de onverzadigde vetzuren uit het voeder en het refractometergetal van het botervet. Ook bestaat er een redelijke mate van overeenstemming met de schaarse literatuurgegevens. Als bewijs voor onze theorie kunnen deze uitkomsten echter nauwelijks dienen en wij moeten dan ook met grote nadruk wijzen op het belang van uitvoerige proeven, waarbij de opzet zodanig dient te worden gekozen, dat alle voor het bewijzen van onze theorie noodzakelijke gegevens ter beschikking komen.

B. Mogelijke andere factoren welke het refractometergetal bepalen

a. Verwerking van het beschikbare cijfermateriaal. Bij de bewerking van het cijfermateriaal viel het ons op, dat de refractometergetallen in het algemeen niet van plaats tot plaats sprongsgewijze veranderden, doch dat de veranderingen meer geleidelijk optraden. Teneinde na te gaan of deze veranderingen uitsluitend op rekening van het verschil in vetgehalte der melk kunnen worden geschreven of dat ook andere factoren mede een rol spelen, hebben wij als volgt gehandeld. Met behulp van de regressievergelijking, zoals die voor het betrokken jaar en het desbetreffende controlegebied was gevonden, werd voor elke zuivelfabriek het refractometergetal berekend, dat overeenkwam met het gevonden vetpercentage. Vervolgens werd het verschil bepaald tussen het berekende refractometergetal en het refractometergetal zoals dat in werkelijkheid was gevonden. In een formule uitgedrukt dus:

$$\Delta R = R_{\text{gev}} - (b_{rv}V + \text{const.}) = R_{\text{gev}} - \hat{R} \qquad (6)$$

Dit verschil ΔR hebben wij berekend voor alle zuivelfabrieken behorende tot de controlegebieden van BCF, BCGO en BCME en voor elk der jaren 1951, 1952 en 1953. Voor de meeste fabrieken bleek het verschil in elk der drie jaren gelijk gericht en ongeveer even groot te zijn. Wij hebben deze verschillen per fabriek over de drie jaren gemiddeld en vervolgens in kaart gebracht (kaart 1). Aangezien de regressiecoëfficiënt, zoals reeds vele malen eerder door ons is gezegd, in absolute waarde te klein is, bestaat de mogelijkheid dat de invloed van het vetgehalte met deze wijze van berekenen nog niet geheel in rekening is gebracht. Wij hebben in onze kaart daarom ook nog de gemiddelde afwijking van het vetpercentage per fabriek van het gemiddelde voor het betrokken controlegebied (ΔV) aangegeven. Voor de beide grootheden hebben wij de afwijkingen in drie klassen ingedeeld nl.: ΔR, $\Delta V > +0{,}05$; $+0{,}05 > \Delta R$, $\Delta V > -0{,}05$ en ΔR, $\Delta V < -0{,}05$.

b. Bespreking van het bewerkte cijfermateriaal. Bij beschouwing van de overzichtskaart (kaart 1) vallen reeds dadelijk de vrij grote aaneengesloten gebieden op met een gelijk gerichte afwijking van het refractometergetal (ΔR). Van een nog resterend deel van de invloed van het vetpercentage is echter niets te zien; in een klasse van afwijking van het refractometergetal treffen wij vertegenwoordigers aan van alle drie klassen van ΔV. Wij mogen dus aannemen, dat de invloed van V op R vrijwel geheel in rekening is gebracht. Van de grootheden, welke volgens onze theoretische formule (hfdst. 3, form. 8) het refractometergetal bepalen, hebben wij het vetpercentage dus verantwoord. Er resten ons nog: de factor f (bruikbaar deel der onverzadigde vetzuren), E (meq dubbele bindingen per 100 g ds in het gras), S (kg zetmeelwaarde per 100 kg ds gras), G (gewicht der koe) en K (vetproduktie per koe per dag).

De factor f zal hoogstwaarschijnlijk een fysiologisch bepaalde factor zijn, welke van individu tot individu zal verschillen, doch die gemiddeld over een groot aantal koeien van fabriek tot fabriek niet belangrijk zal verschillen; f mag voor de onderhavige beschouwing als een constante worden aangemerkt.

De grootheden E en S worden bepaald door de hoedanigheid van het gras. Deze hoedanigheid is afhankelijk van vele omstandigheden, zoals daar zijn: mate en wijze van bemesting, groeistadium van het gras tijdens de beweiding, wijze van beweiding, grondwaterstand, klimatologische omstandigheden en grondsoort. Al deze omstandigheden zijn min of meer streeksgewijs bepaald; daarnaast kunnen nog vele andere omstandigheden worden genoemd, welke echter meestal van veehouder tot veehouder verschillen en gewoonlijk door het verwerken van de cijfers per fabriek niet erg naar voren treden. Van de hiervóór opgesomde omstandigheden lijken ons de beide laatstgenoemden, klimatologische omstandigheden en grondsoort, het belangrijkst. De klimatologische factor zal bij het bespreken van het overzicht van de refractometergetallen (§2) nader worden bezien. Voor de invloed van de grondsoort dienen wij allereerst een blik op de kaart te werpen.

In de eerste plaats wijzen wij op een groot gebied met in positieve zin afwijkende refractometergetallen, dat zich uitstrekt van Zuid-Beveland door Noordwest-Brabant, het Land van Heusden en Altena, de Bommelerwaard, de Betuwe, de Lijmers en de zuidelijke IJsselstreek tot het gebied ten zuidoosten van Zutphen. Dit gehele gebied bestaat grotendeels uit zee- of rivierklei en vooral in Noordwest-Brabant valt de grens van dit gebied zeer duidelijk samen met de grens tussen de klei en het zand. Hier zou dus van een nauwe binding aan de grondsoort kunnen worden gesproken, ware het niet dat gebieden als Walcheren, Zeeuws-Vlaanderen, het Land van Maas en Waal en de noordelijke IJsselstreek, welke geheel bij het eerder genoemde gebied aansluiten, zich kenmerken door een gemiddelde of negatieve ΔR. Het Maasdal in Limburg, waar ook grotendeels kleigronden worden beweid, kenmerkt zich ook weer door een positieve ΔR, doch hierbij sluit zich aan een gebied door de Peel en oostelijk van het stroomgebied van de Aa en de Zuid-Willemsvaart, dat gelegen is op hoogveen of zandgrond. Het overblijvende deel van Noord-Brabant geeft een enigszins verward beeld, maar vestigt toch de indruk dat op de zandgronden ΔR in het algemeen negatief is. Ook op de zandgronden van de Veluwe ligt een gebied met negatieve ΔR, dat zich echter voortzet in het noordelijke IJsseldal met het Kampereiland en in het gebied rond Staphorst en Dedemsvaart. In deze gebieden treft men klei, zand, laagveen en hoogveen aan. Voor de Achterhoek, Twente en Salland vinden wij merendeels een gemiddelde of negatieve ΔR,

hoewel het beeld in dit gebied nogal verward is. In hoofdzaak vindt men hier zandgrond, welke echter sterk doorsneden is met beekgronden en hoogveen (rond Vriezenveen, ΔR pos.). In de Kop van Overijssel wisselen gebieden met positieve, gemiddelde en negatieve ΔR elkaar af, hoewel hier vrijwel uitsluitend laagveen voorkomt. Voor dit verschijnsel kunnen wij geen verklaring geven.

In de provincie Friesland kan men twee verschillende invloeden onderkennen, namelijk de grondsoort en de wijze van veehouderij. Voor de eerste invloed zij gewezen op het hoogveengebied rond Oosterwolde (ΔR neg.), de Friese Wouden (zandgrond, ΔR gemiddeld), en het laagveengebied rond de Friese meren met een uitloper, eveneens op laagveen, naar Giekerk. De tweede invloed blijkt naar onze mening vrij duidelijk uit het verloop van ΔR op het zeekleigebied: in de Greidhoek (Witmarsum, Wommels, Weidum, Winsum) met overwegend veeteelt, een negatieve ΔR, in de Bouwhoek (Sexbierum, Marrum, Ee) met overwegend landbouw, waarbij de veehouderij nevenbedrijf is, een positieve ΔR met daarnaast een overgangsgebied tussen deze gebieden onderling en het aangrenzende laagveengebied (Achlum, Leeuwarden en omstreken, Birdaard en Dokkum) waar wij een gemiddelde ΔR aantreffen.

Samenvattend kunnen wij dus zeggen, dat er sterke aanwijzingen zijn dat de grondsoort, ook na het uitschakelen van zijn invloed op het refractometergetal via het vetpercentage, waarschijnlijk een aanzienlijke invloed op het refractometergetal uitoefent. Dit wijst nog eens te meer op de invloed van het voeder op het refractometergetal langs andere wegen dan uitsluitend via de calorische waarde.

De grootheid G (gewicht der koe) ontsnapt, voor zover wij kunnen zien, in de overzichtskaart aan onze waarneming. Ongetwijfeld zijn hier ook sterk regionaal gebonden invloeden aan te wijzen. Voorts is er een vrij groot verschil in gewicht tussen de beide belangrijke veeslagen. Bij de bespreking van het overzicht van de refractometergetallen voor geheel Nederland komen wij hier nog even op terug.

Ten slotte de grootheid K (vetproduktie). Zoals uit onze formule blijkt zal deze grootheid een belangrijke rol spelen bij de bepaling van het refractometergetal van het melkvet. In deze paragraaf onder A hebben wij echter al opgemerkt, dat er een vrij sterke samenhang blijkt te bestaan tussen V en K. Wij mogen dus aannemen, dat door het elimineren van de grootheid V ook de invloed van K al grotendeels is geëlimineerd. Men kan dan ook niet verwachten dat hiervan op de overzichtskaart nog veel te merken zal zijn.

Er rest ons nog een opmerking ten aanzien van de betrouwbaarheid van de cijfers omtrent het vetpercentage der melk. Het blijkt namelijk, dat het percentage van de melk, dat ten behoeve van het eigen bedrijf of gezin wordt achtergehouden, van streek tot streek sterk wisselt. Dit is op zichzelf niet belangrijk, daar hierdoor het vetpercentage van de melk zoals dat aan de fabriek wordt bepaald, niet wordt veranderd, mits de melk op het bedrijf maar goed wordt gemengd alvorens er een deel aan te onttrekken. Dit laatste nu is in bepaalde streken niet het geval; hier houdt men welbewust dat deel van ieder melkmaal achter, waarvan het vetpercentage het laagst is. Men bereikt hierdoor dat het vetpercentage van de melk, die aan de fabriek geleverd wordt, iets hoger ligt dan het werkelijk geproduceerde vetpercentage. Dit verschil kan mogelijkerwijze oplopen tot ruim 0,05 %, waardoor in $\hat{R} = b_{rv}V + \text{const.}$ een onzekerheid bestaat ter grootte van max. $0{,}05b_{rv}$. Daar b_{rv} volgens onze berekeningen ten hoogste 2,1 bedraagt, is de maximale onzekerheid in $\hat{R}$, en dus in ΔR, ca. 0,10.

In verband hiermede hebben wij de middelste klasse van ΔR zowel als van ΔV gekozen van $+0{,}05$ tot $-0{,}05$, waardoor ten hoogste in de grensgebieden tussen de klassen enige verschuivingen van de uiterste klassen naar de middelste of omgekeerd kunnen optreden. De grote lijnen op de overzichtskaart zullen hierdoor echter weinig of niet veranderen.

In het kort samengevat komen de conclusies op grond van de overzichtskaart hier op neer: 1) er is hoogstwaarschijnlijk een van V en K onafhankelijke invloed van de grondsoort op R; 2) de wijze van bedrijfsvoering bepaalt mede het refractometergetal van het melkvet; 3) ten aanzien van de factoren f en G is niets met zekerheid uit de gegevens op te maken.

§ 2. Overzicht van de refractometergetallen voor geheel Nederland

In hoofdstuk 4 en ook in de voorafgaande paragraaf werd de afhankelijkheid van het refractometergetal van V en K bestudeerd, terwijl ook enkele andere factoren, na eliminatie van de regressie t.o.v. V en K, nader werden bezien. In deze paragraaf zullen wij nu enkel het refractometergetal als zodanig beschouwen aan de hand van een uitgebreid cijfermateriaal over geheel Nederland in drie achtereenvolgende jaren.

a. Het cijfermateriaal. De gegevens betreffende de refractometergetallen verkregen wij door de welwillende medewerking van de botercontrolestations "Groningen" (BCG), "Friesland" (BCF), "Assen" (BCA), "Gelderland-Overijssel" (BCGO), "Utrecht" (BCU), "Noordholland" (BCNH), "Zuidholland" (BCZH) en "Maastricht" en "Eindhoven" (BCME). Deze cijfers hadden betrekking op de maanden juni, juli, augustus en september van elk der jaren 1951, 1952 en 1953. De refractometergetallen werden door de controlestations bepaald met een boterrefractometer bij 40 °C in steekmonsters van de boter, welke in een bepaald tijdvak door de desbetreffende zuivelfabriek uit de aangevoerde melk was bereid. Deze bepaling geschiedde in het algemeen één maal in de eerste helft en één maal in de tweede helft van elke maand. Uitzonderingen hierop vormden BCG, alwaar 1 tot 10 bepalingen per fabriek en per maand werden verricht (gemiddeld 4 tot 5) en BCU, dat veelal 3 bepalingen per fabriek en per maand verrichtte. Voorts werden door alle stations nu en dan één of meer bepalingen overgeslagen, zodat slechts één getal of zelfs in het geheel geen uitkomst voor een maand beschikbaar was.

b. De bewerking van het cijfermateriaal. Wij berekenden vervolgens voor elke fabriek en elke maand het gemiddelde refractometergetal; in enkele gevallen, waarin slechts één getal per maand beschikbaar was, werd dit als het gemiddelde voor de betrokken maand beschouwd. Uit deze maandgemiddelden berekenden wij tenslotte het gemiddelde refractometergetal over het gehele tijdvak van vier maanden in elk der drie jaren. In die gevallen, waarin over één of meer maanden geen gemiddelden beschikbaar waren, werden de uitkomsten voor de betrokken fabrieken niet in het overzicht opgenomen. De aldus verkregen gemiddelde refractometergetallen werden verwerkt in de kaarten 3, 4 en 5. Daarnaast geeft kaart 2 een overzicht van alle zuivelfabrieken, waarvan de gegevens werden bewerkt.

De grootte van de klassen waarin de refractometergetallen werden verdeeld (0,25 eenheden), is zodanig gekozen, dat mag worden aangenomen, dat binnen

het gebied van één controlestation een refractometergetal, ten gevolge van de meetfouten in de bepaling van dit getal, ten hoogste één klasse kan verschuiven. Tussen de gemiddelde refractometergetallen, bepaald door verschillende stations, zal veelal een gering systematisch verschil bestaan, aangezien de ijking van de refractometer nauwelijks met een grotere nauwkeurigheid dan 0,2 boter-refractometergraden kan geschieden. Door dit systematische verschil kunnen de gemiddelde refractometergetallen van een geheel controlegebied ten hoogste één klasse verschuiven ten opzichte van die van alle andere gebieden.

c. Beschouwing der gegevens. De gemiddelde refractometergetallen voor geheel Nederland bedroegen in de jaren 1951, 1952 en 1953 achtereenvolgens 43,80, 43,82 en 44,00. Gezien de vrij regelmatige toename van de vetproduktie per koe en van het vetpercentage der melk in de loop der jaren, zou men op grond van de door ons gevonden correlaties tussen het refractometergetal en deze beide grootheden mogen verwachten, dat het refractometergetal langzaam zou afnemen. Niettemin vinden wij voor 1953 juist een vrij belangrijke toename van het refractometergetal, namelijk met 0,18 eenheden. Dit komt overeen met een stijging van het J-getal met 0,5 à 0,7 eenheden. Wij moeten dus aannemen, dat de kwaliteit van het weidegras in 1953 een ongunstige invloed op het refractometergetal heeft gehad, daar dit de enige factor is welke sprongsgewijze kan veranderen. Met andere woorden, in onze formule (8) (hfdst. 3) kunnen alleen de grootheden E (meq dubbele bindingen per 100 g ds) en S (zetmeelwaarde van het gras) zodanig zijn veranderd, dat het refractometergetal is toegenomen. De andere grootheden in deze formule, namelijk f (benutbaar deel van de dubbele bindingen) en G (gewicht der koe) veranderen niet, terwijl K (vetproduktie per koe per dag) en V (vetgehalte der melk) ten gevolge van hun toeneming juist een daling van het refractometergetal zouden veroorzaken. De grootheden E en S kunnen slechts veranderen ten gevolge van klimatologische factoren. Nu is door 'T HART (1960) aangetoond, dat het vooral het verschil tussen de berekende verdamping (E_p) en de neerslag (N) is, dat bepalend is voor de kwaliteit van het gras. Het bleek hem, dat de kwaliteit minder goed werd naarmate het neerslagtekort (E_p -N) kleiner werd, dat wil zeggen naarmate het weer natter was tijdens de groeiperiode van het gras. Uit de beschikbare gegevens bleek ons, dat het neerslagtekort gedurende de maanden april, mei, juni, juli en augustus 1953 veel geringer was dan in de overeenkomstige maanden van 1951 en 1952, waarin dit tekort groter was en ongeveer gelijk voor beide jaren. Hoe en op welke wijze deze verschillen in de klimatologische omstandigheden ten slotte inwerken op de samenstelling van het melkvet, valt uit de ons ter beschikking staande gegevens niet af te leiden.

Gaan wij thans over tot een beschouwing van de overzichtskaarten, dan valt ons op, dat het refractometergetal van het noordwesten naar het zuidoosten vrij snel toeneemt. Het maximum wordt ongeveer bereikt op de lijn Nijmegen-Dordrecht-Roosendaal, waarna het refractometergetal op een enkele uitzondering na (vnl. Zuid-Limburg) constant blijft of zelfs iets afneemt. Dit verschijnsel kan door verschillende factoren worden veroorzaakt, waarvan wij er enkele in het nu volgende deel van deze paragraaf zullen bespreken.

Ten eerste de factoren, vetgehalte der melk en vetproduktie per koe, die volgens onze theorie een hoofdrol spelen bij de totstandkoming van de samenstelling van het melkvet, zoals die wordt weerspiegeld in het refractometergetal. Beide grootheden nemen van het noordwesten naar het zuidoosten tot aan de reeds

genoemde lijn Nijmegen-Dordrecht-Roosendaal over het algemeen vrij sterk af. Dit heeft tot gevolg, dat het refractometergetal toeneemt, zoals op de overzichtskaarten duidelijk te zien is. Ten zuiden van deze lijn blijven zowel het vetgehalte als de vetproduktie gemiddeld genomen vrijwel constant, hetgeen in overeenstemming is met het gedrag van het refractometergetal in deze streken.

Ten tweede is het gewicht der koeien ingevolge onze theorie van belang. Opgemerkt kan worden, dat het gemiddelde gewicht der dieren behorende tot het M.R.IJ.-veeslag enigszins groter is dan dat der dieren behorende tot het F.H.-veeslag. Gemiddeld genomen zou men dus mogen verwachten, dat het melkvet van M.R.IJ.-dieren een iets hoger refractometergetal zal hebben dan het melkvet van F.H.-dieren met een overeenkomstige melk- en vetproduktie. Hiervan is op de overzichtskaarten geen spoor te vinden, zoals blijkt bij vergelijking van zuidelijk Overijssel (M.R.IJ.) met noordelijk Overijssel (F.H.) en van oostelijk Noord-Brabant (M.R.IJ.) met westelijk Noord-Brabant (F.H.).

Binnen de veeslagen zijn er ook verschillen in gewicht der koeien voor verschillende streken van Nederland. In het F.H.-veeslag zijn de verschillen in gewicht gering; in het algemeen is het gewicht in het zuiden des lands en in Zuid-Holland wat groter dan in het overige deel van het land. De hierdoor veroorzaakte verhoging van het refractometergetal is echter niet te onderscheiden van de verhoging die wordt veroorzaakt door het lagere vetgehalte der melk en de lagere vetproduktie in het zuiden vergeleken met het noorden. In het M.R.IJ.-veeslag zijn de gewichtsverschillen iets groter; het gewicht der dieren in oostelijk Noord-Brabant is nl. 5 à 10% groter dan dat der dieren in zuidelijk Overijssel en de Achterhoek. Doch ook hier ontsnappen de daardoor veroorzaakte verschillen in de refractometergetallen aan onze waarneming.

Ten derde zijn daar de klimatologische factoren, zoals die inwerken op de samenstelling van het weidegras en wellicht ook nog rechtstreeks op de dieren. Hierover is reeds eerder in deze paragraaf het een en ander gezegd. Opmerking verdient nog het feit, dat in het algemeen de refractometergetallen in de kustprovincies lager zijn dan in het overige deel van het land. Deze provincies hebben een meer uitgesproken zeeklimaat dan de meer landinwaarts gelegen provincies. Echter kan hierbij ook het verschil in grondsoort een belangrijke factor zijn. In deze provincies komt namelijk vrij veel zeeklei voor en dit kan dan even goed een verklaring voor de waargenomen verschijnselen geven.

Ten vierde is er nog de invloed van verschil in grondsoort; ook hierover is reeds het nodige gezegd. Niettemin willen wij nogmaals wijzen op enkele frappante punten. Er zijn namelijk twee gebieden met relatief hoge refractometergetallen waarvoor wellicht de grondsoort, althans voor een deel, aansprakelijk moet worden gesteld. Dit zijn het laagveengebied in Zuid-Holland en ten zuiden van Amsterdam en het zee- en rivierkleigebied van de Brabantse Noordwesthoek, het Land van Heusden en Altena, de Bommelerwaard, de Betuwe en de Lijmers. De scheidingslijnen zijn echter niet scherp en ook op andere grondsoorten komen gebieden voor met overeenkomstige refractometergetallen.

Samenvattend kan worden gezegd, dat ten aanzien van het refractometergetal Friesland en Noord-Hollands Noorderkwartier de gunstigste waarden te zien geven. Ongunstig is het refractometergetal vooral in de streek tussen Amsterdam en Gouda, de Betuwe, de Bommelerwaard, het Land van Heusden en Altena, rond Geertruidenberg, de zuidrand van de Veluwe, de Lijmers, enkele plaatsen in Twente en Salland en Zuid-Limburg. Ten aanzien van de factoren, welke naast het vetgehalte der melk en de vetproduktie per koe invloed kunnen hebben

op het refractometergetal is weinig met zekerheid te zeggen. Onze gegevens laten noch ten aanzien van het gewicht der koeien noch ten aanzien van de verschillende veeslagen enige conclusie toe omtrent hun mogelijke invloed. De invloed van de klimatologische factoren en meer in het bijzonder van het neerslagtekort is mogelijkerwijze op te maken uit de landelijke gemiddelden van het refractometergetal in de onderscheiden jaren en wel in dien zin, dat een kleiner neerslagtekort samengaat met een hoger refractometergetal. Enkele aanwijzingen zijn verkregen over een samenhang tussen de grondsoort en het refractometergetal. Nader onderzoek van al deze factoren en hun samenhang met het refractometergetal is ongetwijfeld van groot belang, zowel voor het verkrijgen van een beter inzicht in de fysiologie van de opbouw van het melkvet als voor de verbetering van de kwaliteit van de zomerboter.

§ 3. Samenvatting

Het onderzoek naar de samenhang tussen het refractometergetal van het melkvet en het vetpercentage der melk gaf in overeenstemming met de literatuur een negatieve correlatie te zien, welke in het algemeen statistisch significant was. Na eliminatie van de invloed van het vetpercentage op het refractometergetal en daarmede tevens van een groot deel van de invloed van de vetproduktie (t.g.v. de nauwe positieve correlatie tussen vetproduktie en vetgehalte) bleken er voor de provincies Friesland, Overijssel, Gelderland, Zeeland, Noord-Brabant en Limburg vrij duidelijke aanwijzingen te zijn, dat op de zandgrond het refractometergetal naar verhouding lager is dan op de klei. Op het specifieke weidebedrijf schijnt melkvet met een lager refractometergetal te worden gewonnen dan bij de overige bedrijfsvormen. Een beschouwing van een overzicht van de refractometergetallen voor geheel Nederland droeg slechts weinig bij tot het verkrijgen van meer inzicht in de samenhang van het refractometergetal met de overige mogelijke factoren.

SAMENVATTING

Volgens Brouwer wordt de consistentie van de boter tijdens de weidegang voor een belangrijk deel bepaald door de onverzadigde vetzuren, welke door de koeien met het gras worden opgenomen. Het doel van dit onderzoek was het toetsen van deze hypothese door middel van gegevens omtrent de vertering van de onverzadigde vetzuren uit het gras en door middel van een statistische analyse van gegevens omtrent de consistentie van de boter in verband met de dagelijkse vetopbrengst per koe en het vetpercentage der melk.

Hoofdstuk I geeft een overzicht van de huidige kennis omtrent het verband tussen de consistentie van de boter, de samenstelling van het melkvet en de voeding van het rundvee. Hierbij blijkt, dat de onverzadigde vetzuren van het melkvet in hoofdzaak bepalend zijn voor de consistentie van de boter. Aangezien de consistentie niet op eenvoudige wijze kwantitatief kan worden uitgedrukt, wordt meestal gebruik gemaakt van het joodadditiegetal of van het refractometergetal, die beiden in hoge mate met de consistentie gecorreleerd blijken te zijn. Voorts blijkt in het algemeen, dat een hoog joodadditieprodukt (hg vet × J-getal) van

het voedervet samengaat met een hoog J-getal en een hoog refractometergetal van het melkvet.

Hoofdstuk 2 vangt aan met een literatuuroverzicht van vroegere onderzoekingen van lipiden uit gras en van de chromatografie dezer stoffen. Voor ons onderzoek werd een adsorptiesysteem gekozen, bestaande uit silicagel als adsorbens en een opeenvolgende reeks elutiemiddelen, namelijk petroleumaether, tetrachloorkoolstof, benzeen, aether en absolute alkohol. Vervolgens wordt een beschrijving gegeven van de methodiek van de chromatografie en van de bepaling van het zuurgetal en het J-getal van de eluaten.

Bij het onderzoek van eenvoudige modelstoffen en mengsels daarvan bleek het mogelijk te zijn de koolwaterstoffen geheel vrij van andere lipiden door petroleumaether te elueren. Sterolesters werden door tetra eveneens vrij van andere stoffen geëlueerd. De overige modelstoffen waren cholesterol, vetzuren, triglyceriden en di- en tricarbonzuren. Deze konden niet geheel vrij van elkaar worden verkregen. Wanneer men deze stoffen afzonderlijk chromatografeert, worden de vetzuren en de triglyceriden door benzeen geëlueerd, cholesterol door aether en de di- en tricarbonzuren in hoofdzaak door absolute alkohol en voor een klein deel door aether. Zodra men echter mengsels dezer stoffen chromatografeert, blijkt een deel van de vetzuren en de triglyceriden pas door aether geëlueerd te worden, terwijl een deel van het cholesterol reeds door benzeen wordt geëlueerd. Vermoedelijk is hier sprake van een wederzijds in elkaar oplossen dezer verbindingen.

De chromatografie van aetherische gras- en mestextracten verliep geheel in overeenstemming met de modelproeven. Bij toevoeging van modelstoffen werden deze voor 95–100 % in het desbetreffende eluens (c.q. eluentia) teruggevonden.

Vervolgens wordt een beschrijving gegeven van de toepassing van de analysemethode op een verteringsproef met weidegras. Uit de uitkomsten dezer proef konden de volgende conclusies worden getrokken:

a. De directe extractie van gras en mest is niet volledig, voornamelijk ten aanzien van de vetzuren.
b. De chromatografie van deze extracten als zodanig geeft vrijwel geen inlichtingen door het grote aantal samenstellende stoffen.
c. Na verzeping van deze extracten worden meer inlichtingen verkregen, die echter ten gevolge van a. niet volledig zijn.
d. Door gras en mest achtereenvolgens te koken met zuur en loog en vervolgens te extraheren met aether wordt een betere opbrengst aan vetzuren verkregen. Toch waren de uitkomsten van deze wijze van extraheren nog niet geheel naar wens.
e. De onverzadigde zuren, welke door benzeen worden geëlueerd, zijn goed "verteerbaar" (tabel 17, verteringscoëfficiënt voor de zuren ca. 80, voor de onverzadigde bindingen ca. 75) en wel beter verteerbaar dan de overige stoffen in dit eluaat; de verteringscoëfficiënt voor het gehele benzeeneluaat bedroeg namelijk ca. 60.
f. De zuren in de aethereluaten zijn minder goed "verteerbaar" (verteringscoëfficiënt ca. 45) en in ieder geval niet beter dan de overige stoffen in deze eluaten. Ten aanzien van de onverzadigde verbindingen zijn hier geen conclusies mogelijk.

Gezien de uitkomsten dezer verteringsproef hebben wij in *hoofdstuk* 3 onze

aandacht vrijwel uitsluitend bepaald bij de vetzuren, welke vrij of gebonden in gras en mest voorkomen. Achtereenvolgens werd onderzocht: a. de extractie van het uitgangsmateriaal, b. de verdeling van het extract in aliquote delen, c. de verzeping van het extract en de verwijdering van de "onverzeepbare" stoffen en d. de hoeveelheid extract per chromatogram. Dit onderzoek leidde tot de volgende essentiële punten voor de analysemethode:

a. Het te analyseren materiaal wordt achtereenvolgens gekookt met alkoholische HCl en KOH, aangezuurd met gec. HCl en daarna wordt de alkohol afgedampt en het droge residu geëxtraheerd met aether.
b. Het extract wordt in aetherische oplossing in vier aliquote delen verdeeld, waarna de aether wordt verdreven en
c. het droge extract, vermengd met papierpoeder, door petroleumaether van de onverzeepbare stoffen wordt bevrijd. Na aanzuren van het papierpoeder-extract-mengsel worden de zuren met petroleumaether uitgewassen.
d. De verkregen zuren, afkomstig van ca. 13 g droog gras of droge mest, worden daarna gechromatografeerd op de in hoofdstuk 3 beschreven wijze.

In het volgende deel van hoofdstuk 3 wordt een uitvoerig voorschrift voor de analyse van de zuren in gras en mest gegeven.

Bij toepassing van deze methode op een verteringsproef met drie koeien bleek, dat door petroleumaether en door tetra geen enkel zuur werd geëlueerd. In de overige drie eluaten bevonden zich verschillende zure stoffen. Hiervan werden zowel het aantal meq zuur als het aantal meq dubbele bindingen (aantal meq H nodig voor de verzadiging van deze bindingen) bepaald. De uitkomsten van deze proef zijn verzameld in tabel 23 en in de figuren 6, 7, 8 en 9.

Ondanks vrij aanzienlijke verschillen in de uitkomsten van de afzonderlijke chromatogrammen blijkt er goede overeenstemming te bestaan tussen de gemiddelde uitkomsten voor de drie koeien. De belangrijkste gemiddelde uitkomsten zijn:

a. Voor de verteerde stoffen, welke tot het benzeeneluaat behoren: equivalentgewicht 296, J-getal 146, verteringscoëfficiënt 68, verteringscoëfficiënt voor de meq zuur 76 en voor de meq dubbele bindingen 95, aantal meq dubbele bindingen per 100 g verteerde droge stof van het gras 14,6.
b. Voor de verteerde stoffen behorende tot het aethereluaat waren deze cijfers achtereenvolgens: 290, 125, 62, 69, 75 en 7,6.
c. Voor het alkoholeluaat zijn de uitkomsten minder betrouwbaar door de geringe hoeveelheden stof in deze eluaten; zij bedroegen resp. 560, 64, 62, 71, 61 en 0,3.

Er blijkt dus een aanzienlijke voorkeur te bestaan voor de vertering van de onverzadigde verbindingen, welke met benzeen geëlueerd kunnen worden.

Voor een nadere beschouwing van de uitkomsten gingen wij uit van de voedernorm voor melkkoeien volgens FREDERIKSEN, waaruit de volgende formule werd ontwikkeld:

$$J = \frac{fE}{S}\left(42{,}3\,\frac{G + 300}{K} + 141\,\frac{1}{V} + 52{,}875\right).$$

J = joodadditiegetal van het melkvet
f = de fractie van de onverzadigde bindingen E, welke in het melkvet worden opgenomen

E = aantal meq onverzadigde bindingen per 100 g "verteerde" droge stof
S = zetmeelwaarde van het gras (kilozetmeeleenheden per 100 kg ds)
G = gewicht der koe (kg)
K = vetproduktie der koe per dag (g)
V = vetpercentage der melk.

Deze formule geeft dus op theoretische gronden een voorspelling van het J-getal, wanneer f, E, S, G, K en V in het rechterlid bekend zijn. Hierbij is aangenomen, dat de koe ongeveer zoveel gras eet als met de norm overeenkomt.

Met behulp van de waarden voor E en S, verkregen bij de verteringsproef, werd deze formule getoetst aan enkele literatuurgegevens. Voor S vonden wij $\pm$ 60, voor E 14,6 of 22,2 of 22,5, alnaargelang wij gebruik maakten van de uitkomsten voor het benzeeneluaat alleen dan wel van die voor het benzeen- en aethereluaat samen, resp. het benzeen-, aether- en alkoholeluaat samen. De factor f stelden wij gelijk aan 1. De uitkomsten van regressieberekeningen van BROUWER (1932a) en van ADRIANI e.a. (1945) gaven, zonodig na omrekening in de grootheden G, K, V en J, waarden voor de regressiecoëfficiënten, die zeer goed overeenstemden met de waarden voor deze coëfficiënten, welke uit bovenstaande formule met $E = 14{,}6$ werden berekend.

Voorts werden voor een aantal waarden van G, K en V en met behulp van $f = 1$, $E = 14{,}6$ en $S = 60$ de bijbehorende waarden van J berekend. Deze zijn verzameld in tabel 24 en blijken geheel binnen de normale waarden voor het J-getal te liggen. De keuze van $E = 14{,}6$ wordt gerechtvaardigd door de grote voorkeur voor de vertering van de onverzadigde zuren uit het benzeeneluaat, zoals uit de verteringsproeven is gebleken. De onverzadigde zuren uit het aethereluaat, welke volgens de modelproeven vermoedelijk voor een groot deel uit afwijkende vetzuren bestaan, worden daarentegen niet met voorkeur opgenomen. Ten slotte geeft ook de goede overeenkomst, die bij de regressiecoëfficiënten werd gevonden met deze waarde van E, steun aan onze keuze.

In het algemeen zijn de uitkomsten van ons onderzoek in overeenstemming met de literatuur en met de hypothese van BROUWER.

Hoofdstuk 4 geeft een beschrijving van de statistische bewerking van gegevens omtrent het refractometergetal, de vetproduktie per koe en het vetpercentage der melk gedurende het tijdvak van 1 juni tot en met 20 september voor een aantal zuivelfabrieken in Friesland. Hierbij werden voor elk der jaren 1951, 1952 en 1953 negatieve regressiecoëfficiënten gevonden tussen het refractometergetal (R) enerzijds en de vetproduktie (K), resp. het vetpercentage (V) anderzijds. Deze coëfficiënten verschilden voor de beide eerstgenoemde jaren statistisch significant van nul. De partiële regressiecoëfficiënten $b_{rk \cdot v}$ en $b_{rv \cdot k}$ waren eveneens negatief, doch alleen voor 1952 statistisch significant van nul verschillend. Tabel 28 geeft een overzicht van onze uitkomsten in vergelijking met de uitkomsten van soortgelijke onderzoekingen door BROUWER en ADRIANI e.a. Uit onze uitkomsten volgt, dat bij een verhoging van de produktie van gemiddeld 500 g vet per koe en een vetgehalte van 3,86% (de gemiddelden voor deze fabrieken) tot 540 g vet en 4,11% vet (de gemiddelden voor een der beste fabrieken), het refractometergetal afneemt met tenminste 0,12 eenheden, overeenkomende met een daling van het J-getal met ca. 0,36 eenheden.

Aan een uitgebreider cijfermateriaal, betreffende een groot aantal zuivelfabrieken in de gebieden van de botercontrolestations "Friesland", "Gelderland-Overijssel" en "Maastricht-Eindhoven", wordt in *hoofdstuk* 5 voor dezelfde jaren en tijdvakken de correlatie tussen R en V getoetst. Hierbij werden voor elk

der drie jaren en elk der drie gebieden negatieve regressiecoëfficiënten gevonden. Deze waren alle statistisch significant van nul verschillend, behalve die voor "Friesland" over de jaren 1951 en 1953. Voor "Friesland" betekenen deze coëfficiënten, dat bij toeneming van het vetgehalte van 3,90% (gemiddelde) tot 4,15% (beste fabriek) het refractometergetal afneemt met tenminste 0,13 eenheden, overeenkomende met een afneming van het J-getal met ca. 0,4 eenheden. Voor "Maastricht-Eindhoven" neemt het refractometergetal volgens deze uitkomsten af met tenminste 0,27 eenheden (het J-getal met ca. 0,8 eenheden), als het vetpercentage der melk stijgt van 3,44% (gemiddelde) tot 3,60% (beste fabriek). Voor "Gelderland-Overijssel" geeft een toeneming van het vetgehalte van 3,48% (gemiddelde) tot 3,72% (beste fabriek) een daling van het refractometergetal met 0,50 eenheden (J-getal 1,5 eenheden). Zou het gemiddelde vetpercentage van deze beide gebieden stijgen tot het gemiddelde vetpercentage voor "Friesland", dan zou dit een daling van het refractometergetal betekenen met tenminste 0,71 eenheden resp. 0,79 eenheden, overeenkomende met een afneming van het J-getal met ca. 2,1 resp. ca. 2,4 eenheden.

Met behulp van deze regressiecoëfficiënten werd vervolgens voor elke fabriek en voor elk jaar het verschil (ΔR) bepaald tussen het berekende en het gevonden refractometergetal. De gemiddelden van ΔR over de drie jaren werden voor elke fabriek berekend en verwerkt in kaart 1. Bij beschouwing van deze kaart blijkt, dat in sommige streken de grens tussen gebieden met duidelijk verschillende waarden voor ΔR samenvalt met de grens tussen twee grondsoorten. Dit is bij voorbeeld het geval in Friesland met de grens tussen laagveen en klei resp. zand en in Noord-Brabant met de grens tussen zee/rivierklei en zand. In andere streken is dit zeker niet het geval. Ook de wijze van bedrijfsvoering geeft aanleiding tot verschillen (Friesland: grens tussen Greidhoek en Bouwhoek).

Tenslotte wordt in dit hoofdstuk een overzicht gegeven van de refractometergetallen voor geheel Nederland, wederom over dezelfde jaren en tijdvakken. Deze gegevens zijn verwerkt in de kaarten 3, 4 en 5. Dit overzicht droeg slechts weinig bij tot het inzicht in het verband tussen voeding en refractometergetal. Alleen omtrent de klimatologische factoren willen wij nog een opmerking maken. Er werd namelijk een aanwijzing verkregen, dat er enig verband bestaat tussen het zogenaamde "neerslagtekort" in de groeiperiode van het gras en het refractometergetal, in dien zin, dat wanneer de berekende verdamping de hoeveelheid neerslag sterk overtreft, het refractometergetal lager is dan wanneer dit "neerslagtekort" kleiner is.

SUMMARY

THE RELATION BETWEEN THE LIPIDS FROM GRASS AND THE CONSISTENCY OF BUTTER

According to BROUWER (1932a) the consistency of butter during pasture-grazing is to a large extent determined by the unsaturated fatty acids contained in the grass and ingested by the cows. The purpose of this investigation was the testing of this hypothesis by means of data concerning the digestion of the unsaturated fatty acids from the grass, and by means of a statistical analysis of

data concerning the consistency of butter in connection with the daily fat production per cow and the fat content of milk.

Chapter 1 gives a review of the present state of knowledge concerning the relation between the consistency of butter, the composition of milk fat and the diet. From this it becomes evident that the unsaturated fatty acids of the milk fat are mainly determining the consistency of butter. As the consistency cannot be expressed quantitatively in a simple way, the iodine-value (I.V.) or the refractive index are mostly used. Each of these quantities appears to be correlated to a large extent with the consistency. Moreover a high iodine addition product (hg of fat $\times$ I.V.) of the ingested fat is generally correlated with a high I.V. and a high refractive index of the milk fat.

Chapter 2 begins with a review of former investigations of lipids from grass and of the chromatography of these substances. For our investigation an adsorption system was chosen consisting of silicagel as an adsorbant and a succeeding series of eluents, namely light petroleum, carbon tetrachloride, benzene, ether and absolute alcohol. Thereupon a description is given of the chromatographic methods and of the estimation of the acid number and the I.V. of the eluates.

When investigating simple model substances and mixtures of these, it appeared to be possible to eluate the hydrocarbons by means of light petroleum, so that they were entirely separated from other lipids. Sterol esters were also obtained separate from other lipids by elution with carbon tetrachloride. The other model substances were cholesterol, fatty acids, triglycerides and dicarboxylic and tricarboxylic acids. It was impossible to obtain a complete separation of these compounds. When these substances were separately chromatographed, the fatty acids and triglycerides were eluted by benzene, cholesterol by ether and dicarboxylic and tricarboxylic acids mainly by absolute alcohol and to a small extent by ether. However, as soon as mixtures of these substances were chromatographed, part of the fatty acids and triglycerides were retained on the column during elution with benzene. Part of the cholesterol was also eluted by benzene. The fatty acids and triglycerides remaining on the column were afterwards eluted by ether together with the remaining part of the cholesterol. This is probably due to the partial solubility of these compounds into each other.

The chromatography of ethereal extracts of grass and feces went completely in accordance with the model experiments. Model substances when added to these extracts were recovered for 95–100 per cent in the eluent or eluents in question.

Thereupon a description is given of the application of the analytical method to a digestion trial with pasture grass. From the results of this trial the following conclusions were drawn:

a. The direct extraction of grass and feces is not complete, mainly with respect to the fatty acids.
b. The chromatography of these extracts as such gives hardly any information because of the great number of components.
c. After saponification of these extracts more information is obtained which is, however, not complete (as a consequence of a.).
d. By boiling grass and feces with acid and base and by afterwards extracting them with ether, a better recovery of fatty acids is obtained. All the same the results of this method of extraction were not yet completely satisfactory.

e. The unsaturated fatty acids eluted by benzene are well "digestible" (table 17, digestion coefficient for the acids approximately 80, for the unsaturated bonds approximately 75) and certainly better digestible than the remaining substances in this eluate; the coefficient of digestion for the complete benzene eluate being approximately 60.
f. The acids in the ether eluate are less well "digestible" (digestion coefficient approximately 45) and in any case not better digestible than the remaining substances in this eluate. Regarding to the unsaturated compounds no conclusions are possible here.

In view of the results of the digestion trial in *chapter* 3 we chiefly confined our attention to the fatty acids – whether in free or bound form – present in grass and feces. We successively examined: a. the extraction of the original material, b. the partition of the extract into equal parts, c. the saponification of the extract and the removal of the "unsaponifiable matter" and d. the quantity of extract per chromatogram. This examination resulted in the following essential items for the method of analysis:

a. The material to be analysed was successively boiled with alcoholic HCl and KOH, acidified with concentrated HCl and afterwards the alcohol was evaporated and the dry residue was extracted with ether.
b. The extract was divided into four equal parts in ethereal solution after which the ether was removed.
c. The dry extract mixed with filter paper powder was freed from the unsaponifiable matter by light petroleum. After acidification of the above-mentioned mixture the acids were washed out by light petroleum.
d. The acids thus obtained from about 13 g of dry grass or feces were then chromatographed as described in chapter 2.

In the next section of chapter 3 a detailed description is given of the method used for the isolation and determination of the fatty acids in grass and feces.

When applying this method to a digestion trial with three cows it appeared that no acids were eluted by light petroleum and carbon tetrachloride. In the three remaining eluates there were various acid substances. Of these the amount of meq acid as well as the amount of meq double bonds (meq H necessary for the saturation of these bonds) was determined. The results of these experiments are presented in table 23 and in the diagrams 6, 7, 8 and 9.

In spite of considerable variations in the results of the separate chromatograms a good agreement appears to exist between the mean results for the three cows. The most important results were:

a. For the digested substances belonging to the benzene eluate: equivalent weight 296, iodine value 146, digestion coefficient 68, digestion coefficient for meq acid 76 and for meq double bonds 95, amount of meq double bonds per 100 g of digested dry matter of the grass 14.6.
b. For the digested substances belonging to the ether eluate these figures were: 290, 125, 62, 69, 75 and 7.6.
c. For the alcohol eluate the results were less reliable because of the small amount of matter in this eluate; they were 560, 64, 62, 71, 61 and 0.3 respectively.

So there appears to exist a considerable preference for the digestion of the unsaturated compounds eluted by benzene.

For a further consideration of the results we started from the feeding standard for dairy cows according to FREDERIKSEN, from which the following formula was developed:

$$J = \frac{fE}{S}\left(42.3\,\frac{G+300}{K} + 141\,\frac{1}{V} + 52.875\right).$$

J = iodine value of the milk fat
f = fraction of the unsaturated bonds E which are incorporated into the milk fat
E = the amount of meq unsaturated bonds per 100 g of "digested" dry matter
S = starch equivalent of the grass
G = live weight of the cow (kg)
K = daily fat production of the cow (g)
V = fat content of the milk (per cent).

So this formula gives a prediction of the I.V. on theoretical grounds if f, E, S, G, K and V are known. This is, however, only correct if the cow will eat approximately the amount of grass corresponding with the feeding standard.

With the aid of the values for E and S, obtained from the results of the digestion trial, the validity of this formula was tested, using some relevant data derived from the literature. For S we found approximately 60; for E 14.6, 22.2 or 22.5, according to whether we made use of the results for the benzene eluate only, for the benzene- and ether eluates combined or the benzene-, ether- and alcohol eluates together. The factor f was arbitrarily fixed at 1. When the regression coefficients calculated by BROUWER (1932a) and by ADRIANI et al. (1945) were expressed in the quantities G, K, V and J, values were obtained agreeing well with those calculated from the above formula when $E = 14.6$.

Furthermore the corresponding values of J were calculated for a number of values of G, K and V, using $f = 1$, $E = 14.6$ and $S = 60$. These are presented in table 24 and prove to be entirely within the normal range for the iodine value. The choice of $E = 14.6$ is justified by the great preference for the digestion of the unsaturated acids from the benzene eluate as shown by the results of the digestion trial. The unsaturated acids from the ether eluate, on the contrary, are not taken up with preference. According to the model experiments, this eluate probably consists of unsaturated acids other than the normal unsaturated fatty acids. Finally our choice of $E = 14.6$ is once more corroborated by the good agreement between the calculated regression coefficients and those actually found.

In general the results presented in chapter 3 are in accordance with the literature on this subject and with the hypothesis of BROUWER.

Chapter 4 gives a description of the statistical analysis of data concerning the refractive index, the fat production per cow and the fat content of the milk during the period from June 1 to September 21 for a number of dairy-factories in Friesland. For each of the years 1951, 1952 and 1953 negative regression coefficients were found between the refractive index (R) on the one hand and both the fat production (K) and the fat content (V) on the other hand. These coefficients for 1951 and 1952 differed in a statistically significant way from zero. The partial regression coefficients $b_{rk \cdot v}$ and $b_{rv \cdot k}$ were also negative, but only those for 1952 differed significantly from zero. Table 28 gives a compilation of our results in comparison with the results of similar investigations by BROUWER and by ADRIANI et al. From our results it follows that with an increase in the

daily fat production from 500 g of fat per cow and a fat content of 3.86 per cent (the mean values for these factories) to 540 g of fat and 4.11 per cent fat (the mean value for one of the best factories) the refractive index decreases with at least 0.12 units. This decrease corresponds with a decrease of the iodine value with about 0.36 units.

In *chapter* 5 the correlation between R and V for the same years and periods was calculated from a more extensive collection of data concerning a great number of dairy-factories in the districts of the butter control stations "Friesland", "Gelderland-Overijssel" and "Maastricht–Eindhoven" (Zeeland, Noord-Brabant, Limburg). In this case negative regression coefficients were found for each of the three years and each of the three districts. All these were different from zero in a statistically significant way, except those found for "Friesland" concerning the years 1951 and 1953. From the values of these coefficients for "Friesland" it follows that when the fat content increases from 3.90 per cent (mean value) to 4.15 per cent (best factory), the refractive index decreases with at least 0.13 units, corresponding with a decrease of the iodine value with about 0.4 units.

According to the regression coefficients for "Maastricht-Eindhoven" the refractive index decreases with at least 0.27 units (the I.V. with about 0.8 units) if the fat content of the milk increases from 3.44 per cent (mean value) to 3.60 per cent (best factory). For "Gelderland-Overijssel" an increase in the fat content from 3.48 per cent (mean value) to 3.72 per cent (best factory) gives similarly a decrease of the refractive index with 0.50 units (I.V. 1.5 units). If the mean fat content of these two districts should increase to the mean fat content for "Friesland", then this should result in a decrease of the refractive index with at least 0.71 and 0.79 units respectively. This corresponds with a decrease of the iodine value with about 2.1 and 2.4 units respectively.

Afterwards the difference (ΔR) was determined between the refractive index actually found and the refractive index which was calculated. This calculation was done for each of the three years and each factory by means of the regression coefficients. For each factory the mean of these three values for ΔR was calculated and worked into map 1. When studying this map it appears that in some districts the dividing-line between regions with clearly different values for ΔR coincides with the dividing-line between two soil species. In Friesland this is for example the case with the dividing-line between peat-bog and clay on the one hand and sand on the other hand and in Noord-Brabant with the dividing-line between sea clay/river clay and sand. In other regions this is certainly not the case. The type of farming also gives rise to differences (Friesland: the difference between the Greidhoek where dairy farming is most important and the Bouwhoek where this is a supplementary business).

Finally a review is given in this chapter of the refractive indexes for the whole of the Netherlands, again for the same years and periods. These data were worked into maps 3, 4 and 5. This review contributed only little to the insight into the relation between diet and refractive index. We only want to make one additional comment on the climatic factors, as there was some evidence for a relation between the so-called "lack of atmospheric precipitation" during the growing period of the grass and the refractive index. When the estimated evaporation greatly exceeds the amount of atmospheric precipitation, the refractive index seems to be lower than when this "lack of atmospheric precipitation" is smaller.

LITERATUURLIJST

AAS, G., Meieriposten **32**, 37–42 (1943).

ADRIANI, W., A. F. TAMSMA, M. P. VOGEL en J. GROOT, Onderzoek naar de factoren die de samenstelling van het melkvet beïnvloeden, J. B. Wolters, Groningen, 1945.

BALCH, C. C., D. A. BALCH, S. BARTLETT, C. P. COX en S. J. ROWLAND, J. Dairy Research **19**, 39–50 (1952).

BARTLEY, E. E., J. H. ZALETEL, E. W. BIRD, C. Y. CANNON, G. H. WISE en O. KEMPTHORNE, J. Dairy Sci. **34**, 536–547 (1951).

BERGMAN, T. en K. JOOST, Mejeritekn. Medd. **13**, 61–65 (1952).

BERTRAM, S. H., Chem. Weekblad **24**, 226–229, 319–320 (1927).

BROUWER, E., Verslag. Landbouwk. Onderzoek. **38C**, 15–48 (1932a).

———, Verslag. Landbouwk. Onderzoek. **38C**, 83–126 (1932b).

———, Ned. Weekblad Zuivelbereiding en -handel, 24 aug. (1943).

———, Rec. trav. chim. **63**, 35–38 (1944).

———, Chem. Weekblad **47**, 789–791 (1952).

BROUWER, E. en M. VAN ALBADA, Rec. trav. chim. **62**, 380–382 (1943).

BROUWER, E., N. D. DIJKSTRA en A. M. FRENS, Verslag. Landbouwk. Onderzoek. **49C**, 151–210 (1943).

BROUWER, E. en A. M. FRENS, Verslag. Landbouwk. Onderzoek. **43C**, 213–274 (1937).

DAHL, O., Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. **106**, 81–95 (1957).

DAM, W. VAN, Versl. Mededel. Dir. Landb. no. 4, 663 (1938).

DIJKSTRA, N. D. en E. BROUWER, Verslag. Landbouwk. Onderzoek. **45C**, 1–45 (1939).

ES, A. J. H. VAN, Between-animal variation in the amount of energy required for the maintenance of cows, Diss. Wageningen, 1961.

FISHER, R. A., Statistical methods for research workers, 7th ed., Oliver-Boyd, Edinburgh-London, 1938.

FREDERIKSEN, L. en P. S. ØSTERGAARD, Beretn. Forsøgslab. **136**, 1–256 (1931).

FRIIS, F., Beretn. Forsøgslab. **46**, 1–60 (1900).

GARTON, G. A., Nature (Lond) **187**, 511–512 (1960).

GARTON, G. A. en W. H. R. DUNCAN, Biochem. J. **67**, 340–345 (1957).

GOGOTIDSE, S., Z. Biol. **45**, 354–371 (1904).

HAGLUND, E., G. WODE en T. OLSSON, Kungl. Landtbruks Akademiens Handlingar och Tidskrift **60**, 1147–1172 (1930).

HANSEN, A. P. en V. STEENSBERG, Beretn. Forsøgslab. **134**, 1–99 (1930).

HANSSON, N. en N. E. OLOFSSON, Medd. Centralanstalt. Försöksväsendet jordbruks. Husdjursavdel. **394**, 1–37 (1931).

HART, M. L. 'T, Landbouwk. Tijdschr. **72**, 687–694, 724–729 (1960).

HARTMANN, L., F. B. SHORLAND en I. R. C. MCDONALD, Biochem. J. **61**, 603–607 (1955).

HILDITCH, T. P., The chemical constitution of natural fats, 3rd. ed., Chapman Hall Ltd., London, 1956.

HILDITCH, T. P. en J. PRIESTMAN, Analyst **56**, 354–367 (1931).

HILDITCH, T. P. en H. M. THOMPSON, Biochem. J. **30**, 677–691 (1936).

HOFLUND, S., J. HOLMBERG en G. SELLMANN, Cornell Vet. **45**, 254–261 (1955).

HOLLAND, E. B. en J. P. BUCKLEY, J. Agr. Research **12**, 719–732 (1918).

HOSTETTLER, H., E. FLÜCKIGER en W. LEHMANN, Schweiz. Milchz. **80**, 639–641 (1954).

INABA, R., Biochem. Z. **8**, 348–355 (1908).

KELLNER, O., Die Ernährung der Landwirtschaftlichen Nutztiere, 8e ed., Paul Parey, Berlin, 1919.

KRUISHEER, C. I., Offic. Orgaan Algem. Ned. Zuivelbond F.N.Z. **36**, 297–299 (1941).

KRUISHEER, C. I., P. C. DEN HERDER, B. M. KROL en J. G. VAN GINKEL, Handel. Genoot. Melkkunde, 1–47 (1943).

KUMAGAWA, M. en K. SUTO, Biochem. Z. **8**, 212–347 (1908).

LEROY, A. M. en A. FRANÇOIS, Ann. Zoötech. **1D**, 51–59 (1952).

LEVENE, P. A. en I. P. ROLF, J. Biol. Chem. **51**, 507–513 (1922).

MATTSSON, S., K. E. THOMÉ en P. SWARTLING, Medd. Statens Mejeriförsök **33**, 1–23 (1951).

MAYER, A., Landwirtsch. Vers. Stat. **41**, 15–35 (1892).

MOGHUL, H. K., I. P. SING, T. M. PAUL en C. P. ANANTAKRISHNAN, Indian J. Dairy Sci. **31**, 111–116 (1948).

MULDER, H., Verslag. Landbouwk. Onderzoek. **45**, 649–678 (1939).

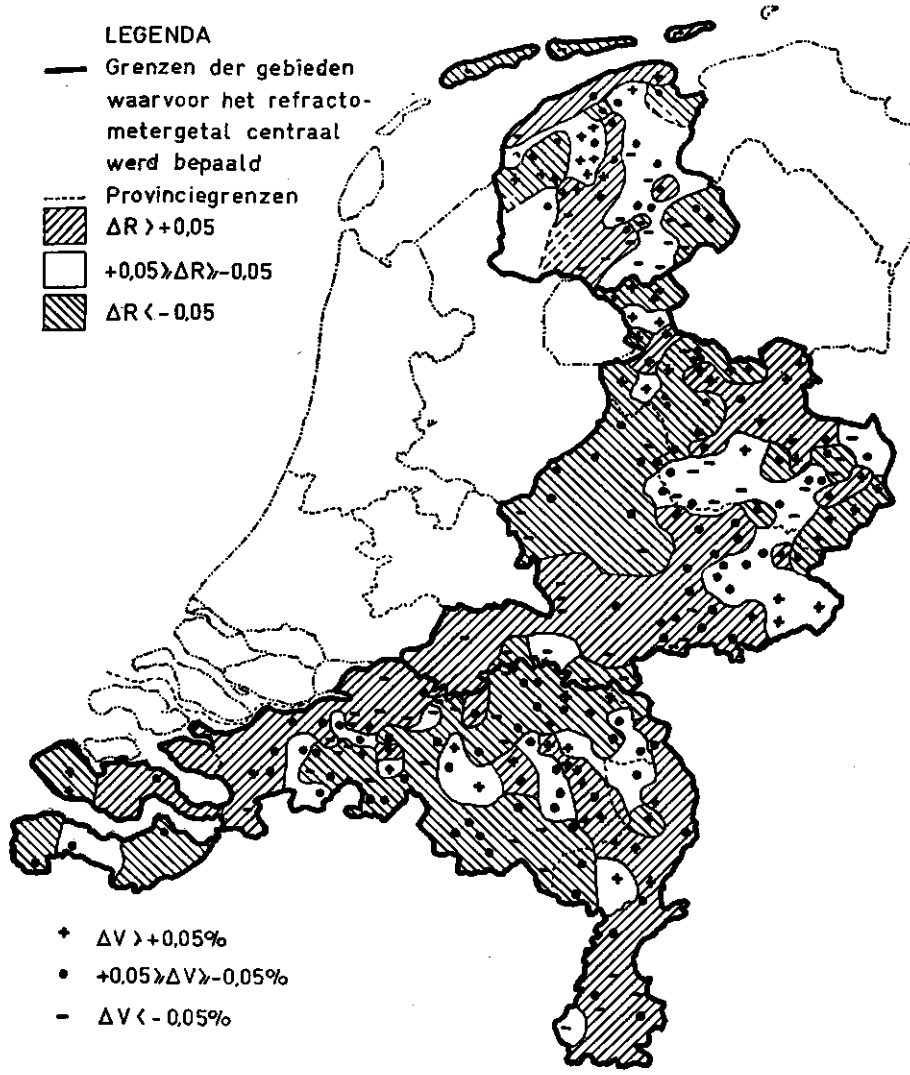
———, Verslag. Landbouwk. Onderzoek. **46**, 21–109 (1940a).

———, Verslag Landbouwk. Onderzoek. **46C**, 305–312 (1940b).

MULDER, Zuivelonderzoek dl I, F.N.Z., 's-Gravenhage, 1947a.
———, Zuivelonderzoek dl II, F.N.Z., 's-Gravenhage, 1947b.
———, Chapter IV, p. 92–256 in G. W. SCOTT BLAIR, Foodstuffs, their plasticity, fluidity and consistency, North Holland Publ. Cy., Amsterdam, 1953.
NORMBLAD N 1046–50, Voorschrift voor het onderzoek van plantaardige en dierlijke oliën en vetten, Hoofdcommissie voor de Normalisatie in Nederland, 1950.
NORMBLAD N 910, Bepaling van het vetgehalte van melk volgens de butyrometrische methode van Gerber, 2e ed., Hoofdcommissie voor de Normalisatie in Nederland, 1946.
NORMBLAD N 962, Bepaling van het vetgehalte van melk volgens de butyrometrische methode van Gerber, Hoofdcommissie voor de Normalisatie in Nederland, 1951.
NIJKAMP, H. J., Anal. Chim. Acta **5**, 325–331 (1951).
———, Anal. Chim. Acta **10**, 448–458 (1954).
OLSSON, T., Årsskr. Alnarps Lantbruks- Mejeri- Trädgardsinst., 225–252 (1948).
ORTH, A., W. KAUFMANN en E. WEINERT, Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **8**, 569–618 (1956).
PLATON, B. en T. OLSSON, Medd. Statens Mejeriförsök **8**, 1–31 (1942).
POLLARD, A., A. C. CHIBNALL en S. H. PIPER, Biochem. J. **25**, 2111–2122 (1931).
POPJAK, G., Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Engl.) **9**, 37–51 (1952).
RANDLE, S. B., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **26**, 340–346 (1943).
REISER, R., Federation Proc. **10**, 236 (1951).
REISER, R., R. B. R. CHOUDHURY en R. E. LEIGHTON, J. Am. Oil Chemists Soc. **36**, 129–130 (1959).
REISER, R. en H. G. R. REDDY, J. Am. Oil Chemists Soc. **33**, 155–156 (1956).
RIDDETT, W., I. L. CAMPBELL, F. H. MCDOWALL en G. A. COX, New Zealand J. Sci. Technol. **23A**, 80–98, 99–112 (1941).
SCHALL, E. D. en M. H. THORNTON, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **26**, 404–407 (1943).
SHORLAND, F. B., New Zealand J. Sci. Technol. **23A**, 112–120 (1941).
———, Nature (Lond) **153**, 168 (1944).
———, J. Sci. Fd. Agric. **4**, 497 (1953).
———, J. Sci. Fd. Agric. **12**, 39–43 (1961).
SHORLAND, F. B., R. O. WEENINK en A. T. JOHNS, Nature (Lond) **175**, 1129–1130 (1955).
SHORLAND, F. B., R. O. WEENINK, A. T. JOHNS en I. R. C. MCDONALD, Biochem. J. **67**, 328–333 (1957).
SJOLLEMA, B., Mededel. Inst. Mod. Veevoed. De Schothorst Hoogland bij Amersfoort, 1–15 (1943).
SMITH, J. A. B. en A. C. CHIBNALL, Biochem. J. **26**, 218–234 (1932a).
SMITH, J. A. B. en A. C. CHIBNALL, Biochem. J. **26**, 1345–1356 (1932b).
SNEDECOR, G. W., Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology, 5th ed., Ames, Iowa, 1957.
SPENGLER, G. en G. HAUF, Fette, Seifen, Anstrichmittel **57**, 474–478 (1955).
SPENGLER, G. en E. WÖLLNER, Fette, Seifen, Anstrichmittel **56**, 775–784 (1954).
STEENSBERG, V. en J. E. WINTHER, Beretn. Forsøgslab. **250**, 1–121 (1950).
TERROINE, E. F., G. LEPAGE, J. VÉCHOT en A. WOLFF, Ann. Sci. Agron. **43**, 325–336 (1926).
TISCHER, J. en E. TÖGEL, Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's **282**, 103–117 (1947).
TRAPPE, W., Biochem. Z. **305**, 150–161 (1940a).
———, Biochem. Z. **306**, 316–336 (1940b).
———, Biochem. Z. **307**, 97–106 (1940/41).
TWITCHELL, E., J. Ind. Eng. Chem. **13**, 806–807 (1921).
UVEN, M. J. VAN, Mathematical treatment of the results of agricultural and other experiments, 2nd ed., Noordhoff, Groningen-Batavia, 1946.
VORIS, S. S., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **24**, 624 (1941).
WEENINK, R. O., J. Sci. Fd. Agric. **12**, 34–38 (1961).

KAART 1

HET REFRACTOMETERGETAL VAN HET MELKVET IN NEDERLAND



ΔR = het gemiddelde verschil per fabriek tussen het gevonden en het berekende refractometergetal over 1951, 1952 en 1953.

ΔV = het gemiddelde verschil tussen het vetgehalte per fabriek en het gemiddelde vetgehalte over het gehele controlegebied over 1951, 1952 en 1953.

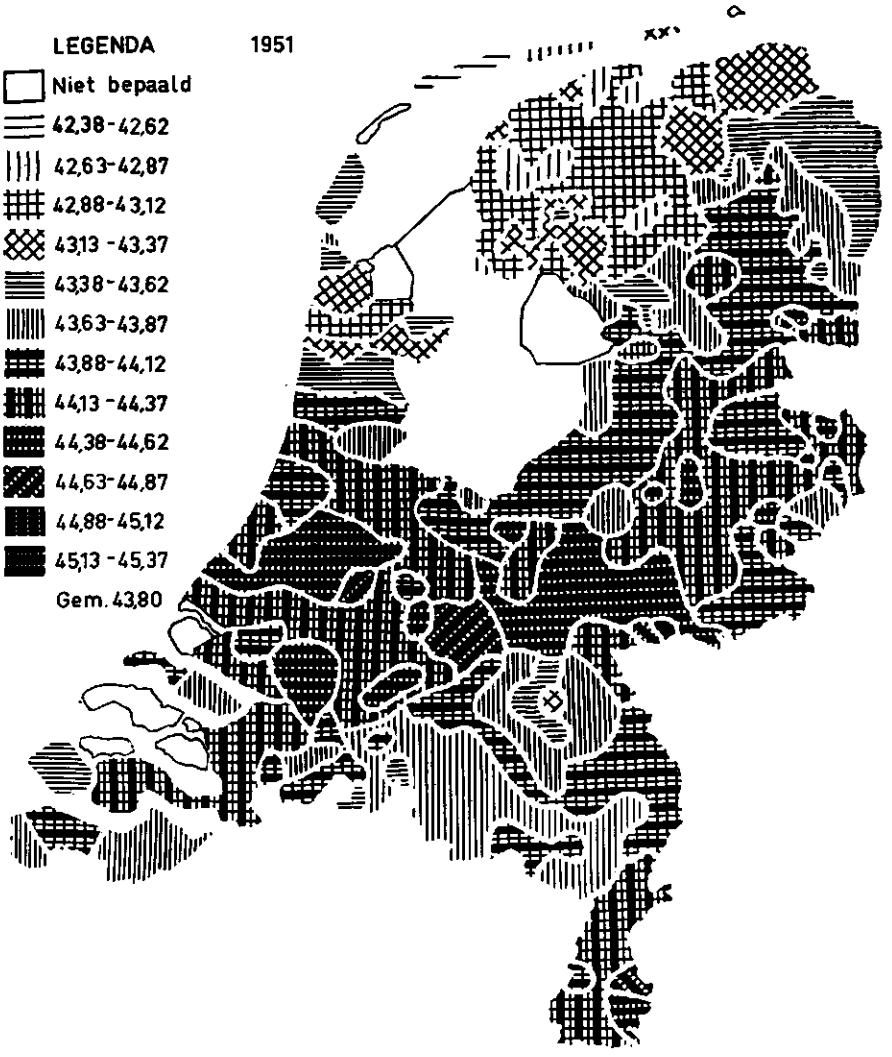
KAART 2

HET REFRACTOMETERGETAL VAN HET MELKVET IN NEDERLAND

Overzicht van de zuivelfabrieken

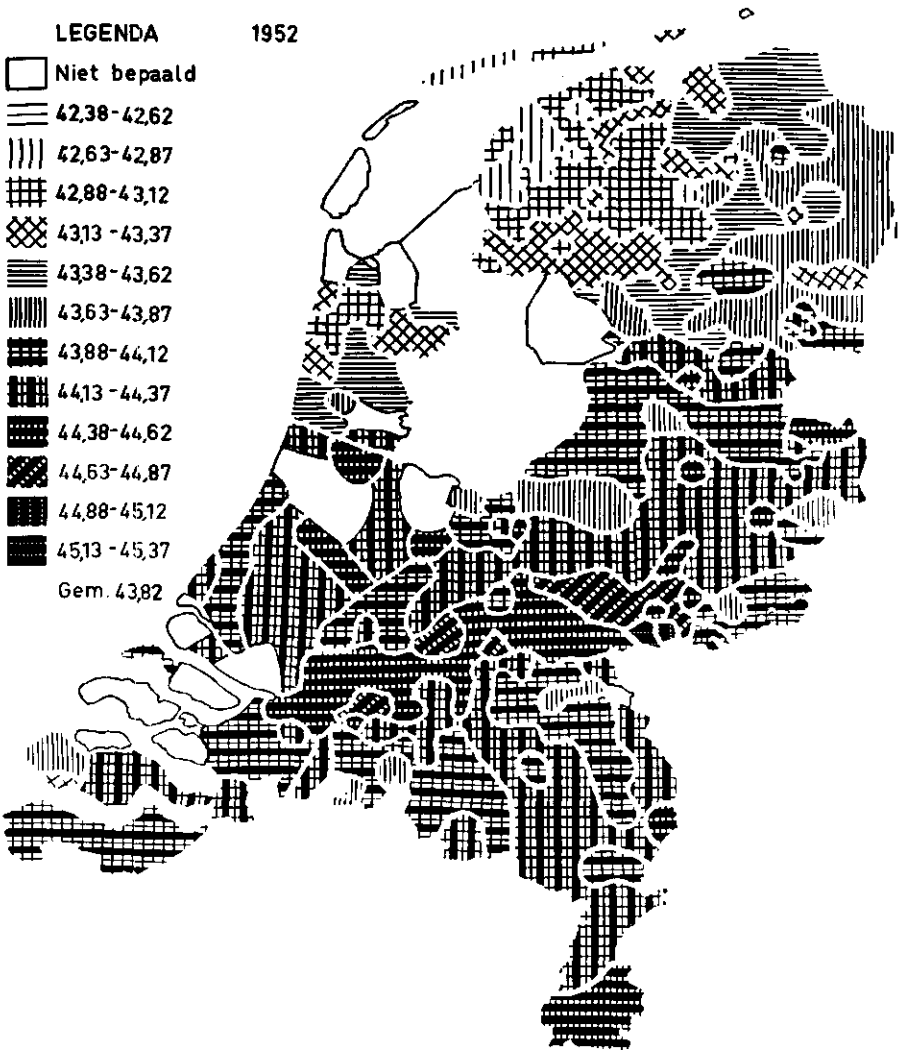
KAART 3

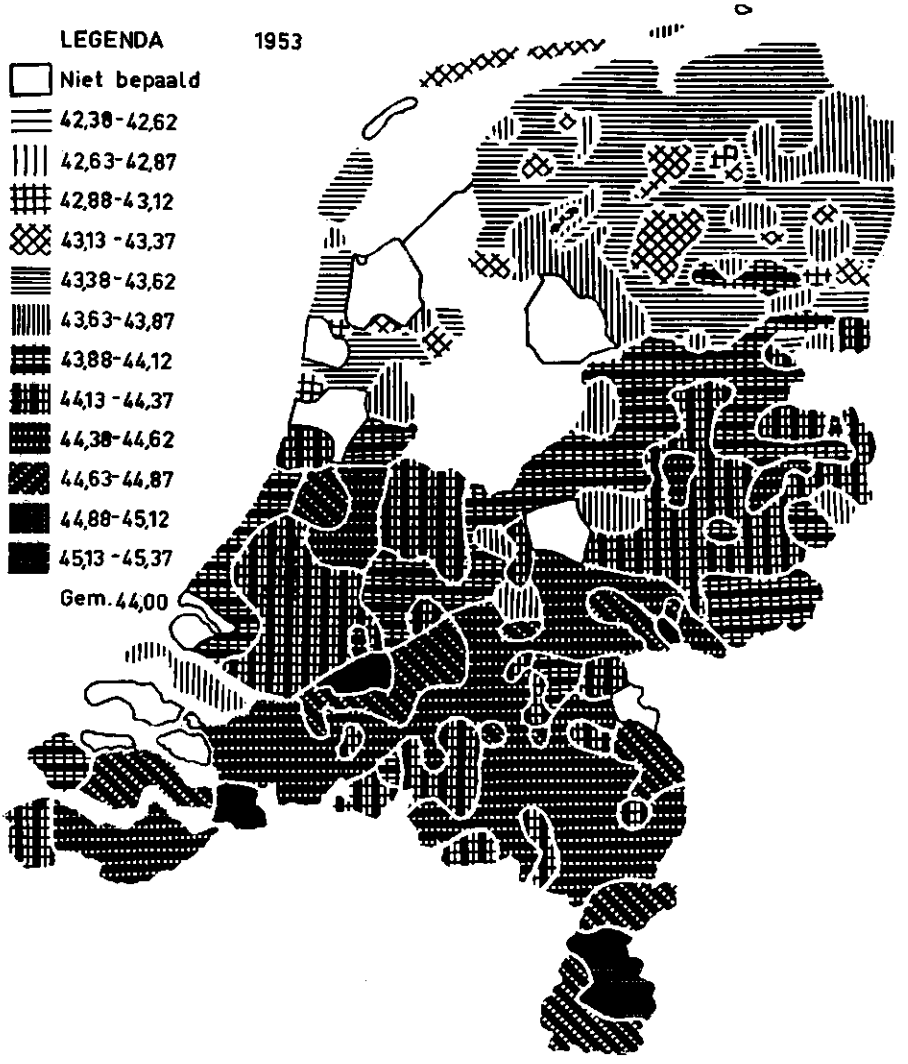
HET REFRACTOMETERGETAL VAN HET MELKVET IN NEDERLAND



KAART 4

HET REFRACTOMETERGETAL VAN HET MELKVET IN NEDERLAND



KAART 5

HET REFRACTOMETERGETAL VAN HET MELKVET IN NEDERLAND