

Lab. Zuivel  
VERSLAG 82.1

1981-12-29  
Pr.nr. 505.6090

Onderwerp: Melkzuurbepaling in kwark  
                  volgens methode Davidson  
Bijlagen: grafiek + voorschrift.

Verzendlijst: Directeur, sektorhoofd (3x), Directie VKA, afd. Melk en  
                  Zuivel, Normalisatie (Humme), Projectbeheer.

Project: Normalisatie/harmonisatie van onderzoekmethoden voor melk en zuivelprodukten

Onderwerp: Melkzuurbepaling in kwark volgens methode Davidson

Bijlagen: grafiek + voorschrift.

---

Doel:

Nagaan of de melkzuurbepaling volgens Davidson toepasbaar is voor de analyse van kwark.

Samenvatting:

Bij de opstelling van het voorschrift (le ontwerp) is uitgegaan van FIL-IDF 69:1972, de bepaling van melkzuur in melkpoeder en het interne voorschrift B29, de melkzuurbepaling in gecondenseerde melk. Speciale aandacht is besteed aan de blancobepaling en het maken van een ijklijn.

De uitkomsten zijn vergeleken met die van een enzymatische methode (methode Boehringer).

Conclusie:

- De nauwkeurigheid van de melkzuurbepaling volgens Davidson is onvoldoende, dit wordt vooral veroorzaakt door een sterk fluctuerende blanco.
- De in het FIL-IDF 69:1972 voorschrift voorgestelde wijze om de ijklijn te maken is voor de analyse van kwark niet geschikt. De gehalten aan melkzuur van de standaardoplossingen moeten in dezelfde range liggen als die van de extrakten van de kwarkmonsters.

- In een beperkt vergelijkend onderzoek blijkt geen significant verschil op te treden tussen de uitkomsten van de methode Davidson en die van de enzymatische methode.
- Er worden enige wijzigingen in het 1e ontwerp voorgesteld.

---

Verantwoordelijk: ir H. Oortwijn *HO*  
Medewerker/Samensteller: D.M. van Mazijk-Bokslag.



1. Dit onderzoek is verricht om na te gaan of de melkzuurbepaling volgens Davidson ook geschikt is voor kwark (1e ontwerp van de werkgroep "Kwark", blauw 597).

Er is uitgegaan van het voorschrift FIL-IDF 69:1972 voor melkpoeder en het interne voorschrift B29 voor gecondenseerde melk.

2. Principe van de methode:

Het uit de kwark geëxtraheerde melkzuur wordt, na verwijdering en omzetting van de storende verbindingen met behulp van een koper-sulfaat en een calcium-hydroxide-oplossing, met zwavelzuur omgezet in aceetaldehyde. Deze stof vormt met p-hydroxydifenyl een violet-rode kleur waarvan de bij 570 nm gemeten extinctie een maat is voor het melkzuurgehalte.

3. Blanco-bepalingen:

De zeer hoge blanco's worden veroorzaakt door de klaring.

E 570 nm:

Blanco's zonder klaring:

0,041; 0,036; 0,039; 0,038; 0,038; 0,036; 0,058; 0,020; 0,027; 0,021; 0,023; 0,019; 0,024 (gemiddeld: 0,032).

Blanco's met klaring van 1 ml  $\text{CuSO}_4$  opl. + 1 ml  $\text{Ca(OH)}_2$  opl.

0,211; 0,172; 0,152 (gemiddeld: 0,178).

Blanco's met klaring van 5 ml  $\text{CuSO}_4$  opl. + 5 ml  $\text{Ca(OH)}_2$  opl.

0,318; 0,406; 0,446; 0,355; 0,276; 0,304; 0,266; 0,361; 0,242; 0,335; 0,296 (gemiddeld: 0,328).

Waardoor de spreiding in de blanco-bepalingen veroorzaakt wordt, is onbekend.

Ook met verse oplossingen is de eis  $< 0,3$  niet haalbaar. Alle oplossingen zijn gemaakt met tweemaal gedestilleerd water.

4. IJklijn

- 4.1 IJklijn met melkzuuroplossingen zonder klaring.

E 570 nm:

			<u>E 570 nm</u>
bl.	0,041-0,036	gemiddeld-blanco	$\mu\text{g}$
2 $\mu\text{g}$	0,469-0,431	0,411	0,205
4 $\mu\text{g}$	0,606-0,617	0,573	0,143
8 $\mu\text{g}$	1,088-1,094	1,052	0,132
12 $\mu\text{g}$	1,473-1,466	1,431	0,119

			<u>E 570 nm</u>
b1.	0,039-0,038	gemiddeld-blanco	<u>µg</u>
2 µg	0,338-0,348	0,304	0,152
4 µg	0,641-0,641	0,602	0,151
8 µg	1,197-1,189	1,154	0,144
12 µg	1,626-1,626	1,587	0,132

			<u>E 570 nm</u>
b1.	0,038-0,036	gemiddeld-blanco	<u>µg</u>
2 µg	0,183-0,195	0,152	0,076?
4 µg	0,342-0,277	0,273	0,068?
8 µg	1,165-1,030	1,098	0,137
12 µg	1,606-1,527	1,530	0,127

			<u>E 570 nm</u>
b1.	0,058-gesneuveld	gemiddeld-blanco	<u>µg</u>
2 µg	0,337-0,340	0,281	0,141
4 µg	0,631-0,633	0,574	0,144
8 µg	1,176-1,148	1,104	0,138
12 µg	1,569-1,585	1,519	0,127

			<u>E 570 nm</u>
b1.	0,020-0,027	gemiddeld-blanco	<u>µg</u>
2 µg	0,296-0,305	0,277	0,138
4 µg	0,556-0,537	0,523	0,131
8 µg	1,120-1,041	1,057	0,132
12 µg	1,524-1,510	1,493	0,124

4.2 IJklijn door middel van melkzuurtoevoegingen aan kwark.

			<u>E 570 nm</u>
kwark + 0 µg	0,948-0,928.	gemiddeld-kwark+0 µg	<u>µg</u>
" + 2 µg	1,192-1,134	0,225	0,113
" + 4 µg	1,372-1,389	0,443	0,111
" + 8 µg	1,620-1,654	0,699	0,087
" + 12 µg	1,780-1,794	0,849	0,071
blanco	0,367-0,316		

4.3 IJklijn door middel van melkzuuroplossingen met klaring (5+5 ml).

			<u>E 570 nm</u>
b1.	0,239-0,214	gemiddeld-blanco	µg
2 µg	0,502-0,548	0,298	0,149
4 µg	0,783-0,781	0,555	0,139
8 µg	1,330-1,334	1,105	0,138

			<u>E 570 nm</u>
b1.	0,361-0,242	gemiddeld-blanco	µg
2 µg	2,687-0,656	0,370	0,185
4 µg	0,828-0,861	0,543	0,136
8 µg	1,287-1,305	0,994	0,124

4.4 IJklijn door middel van melkzuurtoevoegingen aan melkzuurvrije kwark (klaring 5+5 ml).

De kwark is bereid door melk van 30°C met 10 n HCL op pH 4,6 te brengen, te centrifugeren en de wei af te schenken.

			<u>E 570 nm</u>
b1.	0,304-0,266	gemiddeld-blanco	µg
0 µg	0,282-0,401	0,056	
2 µg	0,613-0,746	0,395	0,198
4 µg	0,923-0,876	0,615	0,154
8 µg	1,288-1,302	1,010	0,126

			<u>E 570 nm</u>
b1. = 0 µg	0,231-0,272	gemiddeld-blanco	µg
2 µg	0,669-0,615	0,390	0,195
4 µg	0,820-0,842	0,579	0,145
8 µg	1,297-1,303	1,048	0,131

4.5 Kwark met melkzuurtoevoegingen.

A = kwark; B = kwark + 0,2%; C = kwark + 0,4%; D = kwark + 0,8%.

De klaring is met 1 ml CuSO<sub>4</sub>-oplossing en 1 ml Ca(OH)<sub>2</sub>-oplossing  
b1.: 0,211; 0,172; 0,152 gemiddeld: 0,178.

A: 1,49%

B: 1,61% theoretisch: 1,5 + 0,2 = 1,7%

C: 2,29% " " 1,5 + 0,4 = 1,9%

D: 2,94% " " 1,5 + 0,8 = 2,3%.

Klaring met 5 ml CuSO<sub>4</sub>-oplossing en 5 ml Ca(OH)<sub>2</sub>-oplossing

A: 1,07%

B: 1,05% theoretisch: 1,1 + 0,2 = 1,3%

C: 1,36% " " 1,1 + 0,4 = 1,5%

D: 1,63% " " 1,1 + 0,8 = 1,9%.

5. Absorptie van melkzuur aan het neerslag bij de klaring.

Op de auto-analyzer zijn diverse oplossingen enzymatisch gecontroleerd voor en na de klaring

I voor: 1,05% na: 1,05%

II voor: 1,10% na: 1,06%

III voor: 1,21% na: 1,19%

IV voor: 1,43% na: 1,32%

De absorptie aan het neerslag valt mee. Alleen bij hoge melkzuurgehaltenes wordt een klein gedeelte geabsorbeerd (bij 1,4% melkzuur ca. 7,5% absorptie).

6. Vergelijking melkzuurbepaling volgens Davidson en de enzymatische melkzuurbepaling.

	Davidson	enzymatisch	Davidson-enzymatisch
I	0,86-0,92	0,77-0,77	0,12
II	1,06-0,88	0,82-0,84	0,14
III	0,69-0,70	0,66-0,61	0,06
IV	0,51-0,59	0,57-0,57	-0,02
V	0,47-0,40	0,33-0,33	0,11
VI	0,73-0,74	0,79-0,77	-0,04
VII	0,76-0,78	0,77-0,80	-0,01

$\bar{x}$  Davidson: 0,72

$\bar{x}$  enzymatisch: 0,67

$\bar{d}$  0,72 - 0,67 = 0,05

n = 7

$$s_d = \sqrt{\frac{1}{n-1} (d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2 - nd^2)} = 0,076$$

$$t = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{s_d} = \frac{0,05 \sqrt{7}}{0,076} = 1,74$$

kritieke t = 1,94 (95% betrouwbaarheidsinterval).

7. Conclusie:

Het is niet mogelijk om een ijklijn te maken voor langere tijd.  
De extincties fluctueren te veel.

Er zal bij elke bepaling een serie standaarden meegenomen moeten worden, die dezelfde hoeveelheid melkzuur bevat als het monster.  
De ijklijn loopt niet recht. Bij hogere gehalten gaat de lijn vlakker lopen.

Het is daarom niet mogelijk om aan kwark melkzuur toe te voegen en zo een lijn te maken. De ijklijn gemaakt met en zonder melkzuurvrije kwark is eender, zodat volstaan kan worden met een serie standaarden die wel de hele bewerking (inclusief de klaring) ondergaat.

8. Voorstel tot wijzigingen in het 1e ontwerp.

8.1.1 Weeg 10 gram kwark af in een bekeerglas van 100 ml en voeg ca. 60 ml water van 60°C toe.

8.1.2 Suspendeer de kwark, spoel over in een maatkolf van 100 ml, koel af tot kamertemperatuur en vul aan.

8.1.3 Pipetteer 5 ml van bovenstaande suspensie in een maatkolf van 100 ml en vul aan.

8.1.4 Pipetteer 5 ml van de oplossing volgens 8.1.3 in een maatkolfje van 50 ml en vul aan tot  $\pm$  35 ml met water.

8.1.5 Voeg 5 ml kopersulfaatoplossing I toe, meng en laat precies 10 minuten staan.

8.4 IJKlijn

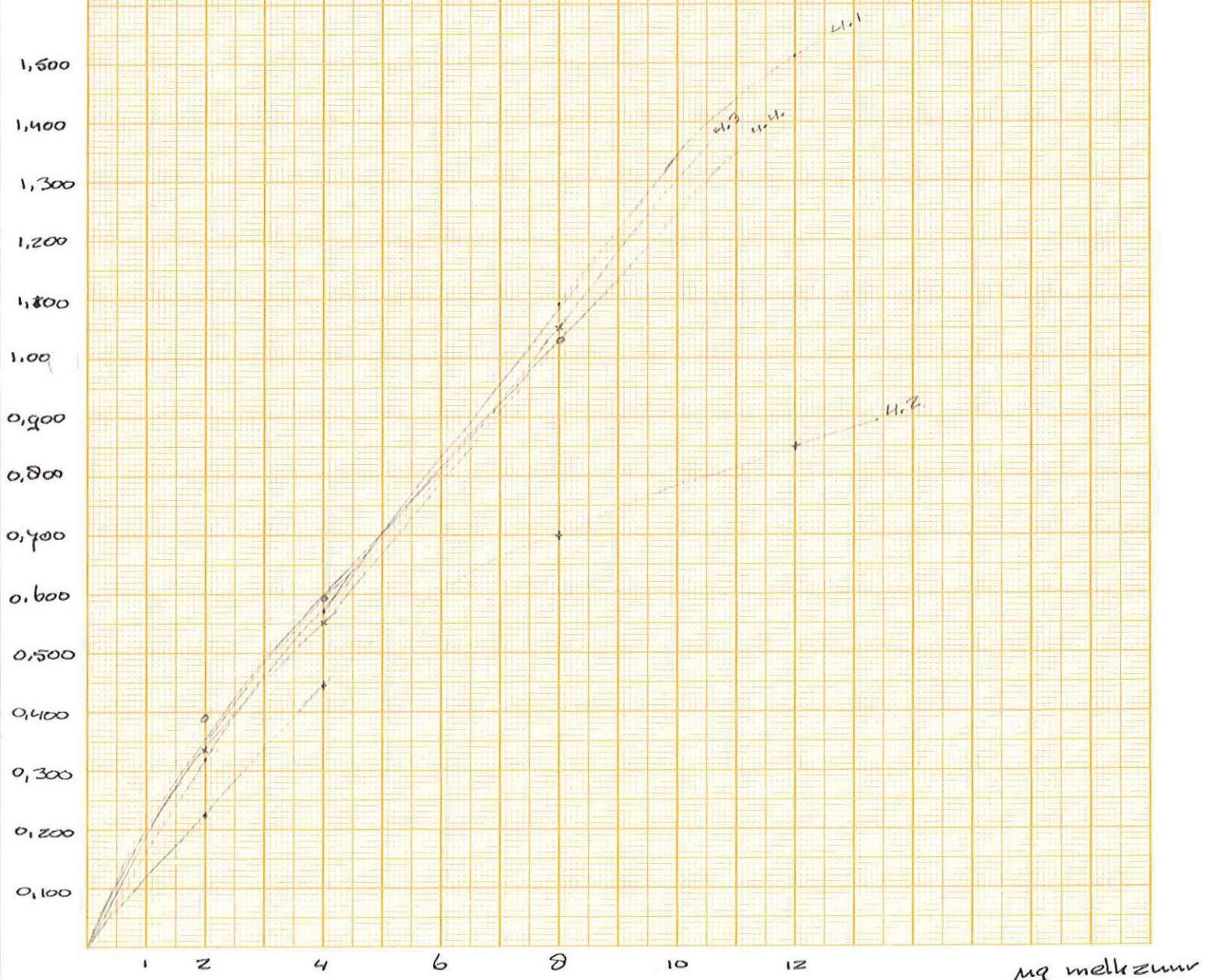
Pipetteer in 5 maatkolven van 50 ml resp. 0, 1, 2, 4 en 6 ml van de standaardoplossing en vul aan tot  $\pm$  35 ml met water. Behandel verder vanaf 8.1.5.



E 570nm

↑

• = 41.1  
+ = 41.2  
x = 41.3  
o = 41.4



WETENSCHAPPELIJKE COMMISSIE INZAKE HET VASTSTELLEN  
VAN METHODEN VAN ONDERZOEK VOOR MELK EN ZUIVELPRODUKTEN

Secretariaat: Vreewijkstraat 12 b  
Leiden

Tel: 130845 (071)

---

Betreft: Werkgroep Kwark

Bepaling van melkzuur in kwark *vgl. Davidson* 1e ontwerp.

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze norm beschrijft een fotometrische methode voor de bepaling van het melkzuurgehalte in kwark.

2. Definitie

Melkzuurgehalte: de hoeveelheid melkzuur uitgedrukt in massa-procenten, zoals bepaald volgens deze norm.

3. Beginsel

Het uit het kwarkmonster geëxtraheerde melkzuur wordt, na verwijdering en omzetting van storende verbindingen met behulp van een kopersulfaat- en een calcium-hydroxide oplossing, met zwavelzuur omgezet in acetaldehyde.

Deze stof vormt met p-hydroxydiphenyl een violet-rode kleur waarvan de bij 570 nm gemeten intensiteit een maat is voor het melkzuurgehalte.

4. Reagentia en hulpstoffen

4.1 Gedestilleerd of gedeïoniseerd water.

4.2 Kopersulfaatoplossing I: los per liter oplossing 250 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  p.a. op.

4.3 Kopersulfaatoplossing II: los per 100 ml oplossing 5 gram  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  p.a. op.

4.4 Calciumhydroxide -suspensie : Wrijf 100 gram  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  in een mortier aan met 300 ml water.

4.5 Zwavelzuur (s.m. 1.84) 95-97 % p.a.

- 4.6 Zwavelzuur-kopersulfaatoplossing.  
Voeg 1 ml kopersulfaat-oplossing II toe aan 100 ml zwavelzuur.
- 4.7 p-Hydroxydiphenylreagens: los 1.5 gram p-hydroxydiphenyl op in 10 ml 5% natronloog door verwarmen en roeren en vul aan tot 100 ml. Bewaar deze oplossing in een fles van bruin glas in het donker. Het reagens is niet langer dan 4 weken houdbaar.
- 4.8 Standaard melkzuuroplossing: los onmiddellijk voor het gebruik 0,1067 g lithiumlactaat (p.a) op in gedestilleerd water en vul aan tot 1000 ml. De oplossing bevat 0.100 mg melkzuur per ml.

5. Glaswerk en apparatuur *voor de standaardoplossing en de reagensoplossing, te vullen resp. 2,4,8 en 12 ml*

- 5.1 Maatkolven van 100 ml en 50 ml. *12 mg melkzuur per ml.*
- 5.2 Pipetten van 1 - 5 ml.
- 5.3 Glazen buizen met ingeslepen stoppen.
- 5.4 Kokend-waterbad.
- 5.5 Waterbad van 30 °C.
- 5.6 Cuvetten met 1 cm weglengte.
- 5.7 Spektraal fotometer of filter fotometer.

6. Monsterneming en -behandeling  
zie NEN ... en NEN ...

7. Werkwijze

- 7.1 Isolatie melkzuur.
  - 7.1.1. Weeg 1 g kwark in een maatkolf van 100 ml en voeg ongeveer 80 ml water toe.
  - 7.1.2 Dispergeer de kwark door de maatkolf 5 à 10 min in een kokend-waterbad te plaatsen en af en toe te zwenken.
  - 7.1.3 Koel de kwarksuspensie af tot kamertemperatuur en vul aan tot 100 ml.
  - 7.1.4. Pipetteer in een maatkolf van 50 ml een hoeveelheid kwarksuspensie, die 0.1 - 0.6 mg melkzuur bevat (bij 0.5 - 1.0 % melkzuur : 5 ml).
  - 7.1.5. *Out aan tot ± 35 ml met water* Voeg 35 ml water en 5 ml kopersulfaat oplossing I toe, meng en laat precies 10 minuten staan.
  - 7.1.6 Voeg 5 ml Ca(OH)<sub>2</sub> suspensie toe; meng en laat weer precies 10 minuten staan.

- 7.1.7 Vul aan tot 50 ml, schud krachtig, laat enige minuten staan, schud weer en filtreer.
- 7.2 Kleurontwikkeling.
  - 7.2.1 Pippetteer 1 ml filtraat in een glazen buis met ingeslepen stop.
  - 7.2.2 Voeg 6.0 ml zwavelzuurkopersulfaat opl. toe en meng.
  - 7.2.3 Verwarm de buizen gedurende 5 min. in een kokend waterbad (stoppen even optillen).
  - 7.2.4 Na afkoelen tot kamertemperatuur 2 druppels p-hydroxydiphenylreagens toevoegen en het mengsel krachtig schudden.
  - 7.2.5 Plaats de <sup>buisen</sup> kolven gedurende 15 min. in een waterbad van 30° en schud ze van tijd en tijd.
  - 7.2.6 Verwarm hierna de buizen gedurende 90 sec. in een kokend waterbad en koel ze daarna snel af tot kamertemperatuur.
  - 7.2.7 Meet de kleurintensiteit met een fotometer ingesteld op een golflengte van 570 nm tegen de blanco bepaling in 1 cm cuvetten.
- 7.3 Blanco bepaling.
  - Handel vanaf 7.1.4.
  - Voer minstens twee blanco-bepalingen uit (zie opmerkingen).
- 7.4 IJklijn.
  - Pipetteer 1 ml van de standaardoplossingen, die respectievelijk 2, 4, 8 en 12 µg melkzuur per ml bevatten in 4 buizen met ingeslepen stop en handel vanaf 7.2.2. 7.1.5
  - Voor de blanco 1 ml water pipetteren.

8 Berekening

Melkzuurgehalte in procenten (m/m):

$$0.5 \frac{c}{am}$$

- c= µg melkzuur in 1 ml filtraat
- a= ml kwarksuspensie
- m= ingewogen hoeveelheid kwark in grammen.

9 Opmerkingen

- 9.1 De blanco met water gemeten tegen zwavelzuur in een 1 cm cuvet mag niet groter zijn dan 0.3.
- 9.2 Vermijd verontreiniging met speeksel en zweet.
- 9.3 Bij de bepaling is verwaarloosd:
  - a) volume van het neerslag bij de bereiding van het serum.
  - b) de adsorptie van melkzuur aan dit neerslag.

Volgens Davidson kan men de resultaten voor de invloed van deze factoren corrigeren door vermenigvuldiging met 1.06.

H07TS

A handwritten signature or set of initials, possibly 'H07TS', written in dark ink. The signature is stylized and appears to be written over the printed text 'H07TS'.