FAM-INFORMATION

August 1990/202 W

Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld

Die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Rahm

I. Entwicklung einer automatisierten potentiometrischen Titrationsmethode in nichtwässerigem Milieu und Vergleich mit der visuellen Titration nach Deeth*

The Determination of Free Fatty Acids in Milk an Cream

I. Development of an Automatic Potentiometric Titration Method in Non Aqueous Solutions ant its Comparison with the Visual Titration Method According to Deeth

J.-O. Bosset, Miroslava I. Imhof und G. J. Steiger

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 81, 296-318 (1990)

Einleitung

Zahlreiche Analysenmethoden wurden schon für die Bestimmung der Fettschädigung von Milch und Rahm vorgeschlagen (1–13). Keine scheint jedoch entscheidende Vorteile zu bieten. Die Titration der freien Fettsäuren (FFS) nach Deeth (4) ist wegen ihrer Einfachheit eine in der Praxis häufig angewandte Bestimmungsmethode. Ihr Hauptnachteil ist die Subjektivität der visuellen Erfassung des Titrationsequivalenzpunktes (Abhängigkeit von der visuellen Empfindlichkeit der Bedienungsperson beim Farbumschlag, Einfluss der Beleuchtung, unbewusste Beeinflussung durch den ersten Titrationswert bei der Wiederholung der Bestimmung usw.). Ein weiteres Problem ist die praxisbedingte Unmöglichkeit, die visuelle Methode zu automatisieren. Eine potentiometrische Bestimmung würde diese Mängel beseitigen, hat aber den Nachteil, dass die Titration einer Mischung von verdünnten schwachen Fettsäuren in einem nichtwässerigen Milieu, besonders in Anwesenheit von Kohlendioxid aus der Luft, schwierig ist.

* In memoriam Frau Prof. Dr. E. Hamburger (EPF-Lausanne)
Die Grundlagen dieser neuen Methode wurden am 2. September 1988 anlässlich der 100. Jahresversammlung der SGAAC in Neuchâtel als Kurzreferat präsentiert. Inzwischen wurde die Methode für den Einsatz in der Routineanalytik weiterentwickelt.

Die modernen mikroprozessorgesteuerten Titrationsgeräte sind mit hochohmigen Differenzverstärkern ausgestattet, die zusammen mit neuen, asymmetrisch abgeschirmten Messelektroden Störungen, verursacht durch elektrostatische Felder, unterdrücken. Dies gilt vor allem für Titrationen in nichtwässerigen Medien (14). Ferner sind diese Titratoren für die Automatisierung der Titrationen mit Probenwechslern nachrüstbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die wichtigsten Parameter der potentiometrischen Titration in nichtwässerigem Milieu zu optimieren und die daraus resultierende Bestimmungsmethode mit der klassischen visuellen Titration nach Deeth zu vergleichen.

Experimenteller Teil

Probenwahl

- Rohmilch aus eigener Versuchskäserei, hand- oder maschinengemolkene Milch, pasteurisiert, homogenisiert, 3,6% Fettgehalt
- «Milch-Drink», pasteurisiert, homogenisiert, 2,8% Fettgehalt
- Rohrahm aus eigener Versuchskäserei
- Rahm, pasteurisiert, homogenisiert, aus eigener Versuchskäserei
- Rahm, UHT-behandelt, homogenisiert, aus eigener Versuchskäserei.

Chemikalien

In Tabelle 1 sind die für die Vorversuche und vorgeschlagene Methode gebrauchten Chemikalien zusammengestellt.

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien

Isopropanol	p. A., Merck 9634
Petrolether	Ph. H. VI, Siegfried 103700-00, dest. (Sdp. 40–60 °C)
Heptan	p. A., Merck 4379
Methanol	p. A., Merck 6009
Ethanol absolut	p. A., Merck 983
Ethanol technisch	(94 Gew.-% mit 5% Methanol), Eidg. Alkoholverwaltung
Wasser	entionisiert (Milli-Q-Anlage)
Schwefelsäure konz.	p. A., Merck 731
Salzsäure 10 mmol/l*	Titrisol, Merck 9974
Myristinsäure (> 99,5% GC)	puriss., Bezugssubstanz, Fluka 70079
Thymolblau wasserlöslich*	Standard Fluka 89350
Kalilauge 0,5 mol/l in Methanol	Merck 9351
Kalilauge, ca. 47%*	Merck 5547
Stickstoff*	Klasse 2, Carbagas

* Nur für die Deeth-Methode

Reagenzien

Extraktionsgemisch (für die Extraktion der FFS aus Milch- und Rahmproben nach Deeth)

Isopropanol:	800 ml
Petrolether:	200 ml
Schwefelsäure 2 mol/l:	20 ml

Standardlösung S (für die Titerbestimmung der Titrierlösung)

Myristinsäure in Blindprobenextrakt: c = 2,5 mmol/l

N. B.: Da die Lösung schnell verdunstet und sich somit die Konzentration schnell ändert, wurde diese Standardlösung täglich frisch aus einer Myristinsäure-Stammlösung (c = 50 mmol/l in Blindprobenextrakt; 1 Monat lagerbar bei 4 °C) durch Verdünnung mit dem Blindprobenextrakt hergestellt. Um den Titer zu berechnen, muss der Blindwert des Blindprobenextraktes B substrahiert werden.

Lösung Z (für die Zusatzmethode)

Myristinsäure in Heptan (für die Zusätze zum Blindprobenextrakt, zu den Extrakten der Milch- und Rahmproben und zu der Standardlösung S):

c = 5 mmol/l

Titrierlösung

Kalilauge in Methanol: c = 5 oder 10 mmol/l

Farbindikatorlösung (für die visuelle Titration nach Deeth)

Thymolblau in Isopropanol: c = 0,01%

Waschlösung für Stickstoff (für die visuelle Titration nach Deeth)

Kalilauge: c = ca. 47%
Heptan (um N_2 mit Heptan zu sättigen)

Für die potentiometrische Titration (vorgeschlagene Methode)

Geräte/Zubehör:	manuell	man. + aut.	automatisch
Titroprocessor 686 (mit eingebautem Differenzverstärker)		1 × 2.686.0100	
Interface für Analogausgang/ Fernsteuerung			1 × 3.540.2191
Dosimat 665			1 × 2.665.0010
Dosimat Titrierstand 665 (inkl. Magnetrührer 649)	1 × 2.665.0030		
Wechseleinheit (Zylindervolumen 5 ml)		1 × 6.3006.153	

Geräte/Zubehör:	manuell	man. + aut.	automatisch
Bürettenspitze mit Erdung		1 × 6.1540.010	
separate Glaselektrode (für PW*, ohne Kabel)			1 × 6.0104.100
separate Glaselektrode (Std. Länge, ohne Kabel)	1 × 6.0102.100		
abgeschirmte Referenzelektrode (PW*, ohne Kabel)			1 × 6.0729.110
abgesch. Referenzelektrode (Std. Länge, ohne Kabel)	1 × 6.0729.100		
Platin-Hilfselektrode (PW*, ohne Kabel)			1 × 6.0331.040
Platin-Hilfselektrode (Std. Länge, ohne Kabel)	1 × 6.0331.000		
Elektrolyt: LiCl sat. in Ethanol, 250 ml (für Ref.-Elektrode)		1 × 6.2312.000	
Kabellitze, 100 cm für Referenz-Elektrode	1 × 6.2106.020		
Kabellitze, 200 cm für Referenz-Elektrode			1 × 6.2106.060
Elektrodenkabel abgeschirmt, 100 cm	2 × 6.2104.020		
Elektrodenkabel abgeschirmt, 200 cm			2 × 6.2104.030
Titriergefäss Unterteil	mindestens 10 × 6.1415.220		
Titriergefäss Deckel	1 × 6.1414.010		
Stabrührer 622, mit PP Flügelrührer	1 × 2.622.0034		
Glasrührspirale (Std. Länge)	1 × 6.1904.040		
Probenwechsler-Steuergerät 664			1 × 2.664.0010
Verbindungskabel: Titroprocessor 686-Steuergerät 664			1 × 3.980.2930
Probenwechsler 673 für 10 Proben (inkl. Stabrührer 622)			1 × 2.673.0010
Glasrührspirale (für Probenwechsler)			1 × 6.1904.020
Titrierbecher (PP, Vol. 20 . . . 250 ml)		mindestens	10 × 6.1434.320
Glaseinsatzbecher (Vol. 20 . . . 200 ml) zu Std. Titrierbecher		mindestens	10 × 6.1433.220

Geräte/Zubehör:	automatisch
Membranpumpe 683 zum Spülen am Probenwechsler	1 × 2.683.0024
Steuerkabel zu Membranpumpe 683	1 × 6.2121.010
Rotordüse 6.1823.000	1 × 6.2740.000
Schaft zu Rotordüse 6.2740.000	1 × 6.1823.000
Führungshülse zu Schaft 6.1823.000	1 × 6.1236.020
Netzverteiler mit Störschutz	1 × 2.615.0010

* PW = Probenwechsler

Für die visuelle Titration nach Deeth

Dosimat Titrierstand 665 (inkl. Magnetrührer)	1 × 2.665.0030
Wechseleinheit (Zylindervolumen 5 ml)	1 × 6.3006.153

Geräteeinstellung

Bei der vorgeschlagenen Methode wurde mit den in Tabelle 2 angegebenen Parametereinstellungen (Analysenparameter) der Datenerfassung gearbeitet. Abweichende Einstellungen sind erwähnt.

Tabelle 2. Einstellung der Analysenparameter (Titroprocessor 686)
- für den Blindprobenextrakt: Methode 10
- für die Standardlösung: Methode 11
- für die Probenextrakte: Methode 12

GET U:	Methodennummer	10	11	12
prep step:	pause (s)		15	
	electr. input		12	
parameters:	titr. rate (ml/min)		1,00*	
	anticip.		10*	
	stop V (ml)	1,80	4,20	2,60
	start V (ml)	0,20	2,00	0,35
	temp. (°C)		25	
	EP crit.		4*	
def. records:	report		25	
	m	RS1; 05	RS1; 03	RS1; RS2; RS3; 02
	com. var.	mR1; C30	mR1; C31	--

* Für Vorversuche: titr. rate (ml/min) = 0,40, anticip. = 0, EP crit. = 3

Aus Tabelle 3 sind die gespeicherten Konstanten und Formeln (rechnerische Parameter) der Datenverarbeitung ersichtlich.

Tabelle 3. Einstellung der rechnerischen Parameter (Titroprocessor 686):

— für den Blindprobenextrakt: Methode 10
— für die Standardlösung: Methode 11
— für die Probenextrakte: Methode 12
} (siehe auch Tab. 2)

2nd fmla:	Methode 10	F1 = EP1; 3; ml
	11	F1 = C01/(EP1-C30); 3
	12	F1 = (EP1-C30); 3; ml
		F2 = (RS1* C31* C02* C03* C04)/C00; 2[1]
		F3 = RS2/C20; 3; mol/kg[2]
fmla const.:	Methode 11	C01 = 2.500
		C30 = ...
	Methode 12	C02 = 0.005
		C03 = 9.2
		C04 = 200
		C30 = ...
		C31 = ...
silo simpl data:	Methode 12	silo line 1 41
		method 12
		id. # 1 Proben-Nr.
		id. # 2 Proben-Nr.
		C20 Fettgehalt (g/kg)
		C00 E (g) der Milchprobe

[1] F2: Zwischenresultat, ausgedrückt in mmol FFS/kg Milch
[2] F3: Schlussresultat, ausgedrückt in mol FFS/kg Milchfett

Erläuterungen zu den Geräte-Parametern (siehe auch Tabelle 3):

GET U = General Equivalence-point Titration (Titration mit quasi-kontinuierlicher Reagenzdosierung und automatischer Equivalenzpunktauswertung)
electr. input = Definition der Elektrodenanschlüsse (zwei hochohmige Eingänge für Differenzpotentiometrie)
pause = Wartezeit vor dem Titrationsbeginn (Durchmischungszeit des zur Probe zugegebenen Ethanols und des Myristinsäurezusatzes)
titr. rate = Titrationsgeschwindigkeit
anticip. = Anpassung der Titrationsgeschwindigkeit an die Potentialänderung
stop V = Stopvolumen (maximales Titriervolumen)
start V = Startvolumen (wird beim Titrationsbeginn mit der max. Bürettenausstossgeschwindigkeit zudosiert)
EP crit. = Empfindlichkeit bei der Equivalenzpunkterkennung

Bestückung des Titrierkopfes

Abbildung 1 zeigt die empfohlene Bestückung des Titrierkopfes für die potentiometrische Titration.

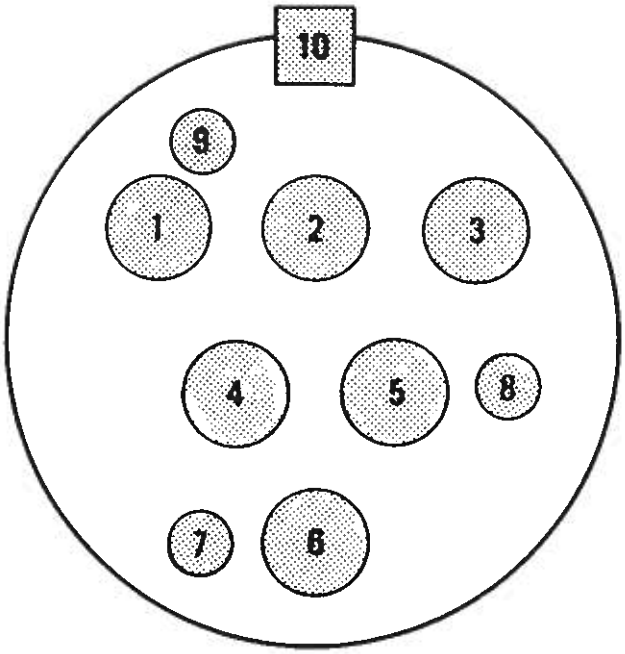

Abb. 1. Bestückung des Titrierkopfs
Pos. 1: Pt-Hilfselektrode
Pos. 2: pH-Messelektrode
Pos. 3: Spüldüse (Ethanol techn.)
Pos. 4: Ag/AgCl-Referenzelektrode
Pos. 5: Stabrührer (Spirale aus Klarglas)
Pos. 6: Bürettenspitze, eingetaucht (Titriermittel)
Pos. 7–10: Blindstopfen

Probenvorbereitung (Extraktion der FFS nach Deeth)

Milchprobenextrakt (= Lösung M)

Ca. 5 g Milchprobe wurden in ein 30-ml-Reagenzglas mit Schraubverschluss auf 1 mg genau eingewogen und 10,00 ml Extraktionsgemisch, 6,00 ml Petrolether und 4,00 ml Wasser zugegeben. Das Gemisch wurde 30 s geschüttelt (17) und während 5 min bei 1000 UpM mit einer Gerber-Zentrifuge (Typ P60/63) getrennt (dieser Extrakt ist höchstens 5 Tage im Kühlschrank lagerbar). 5 ml der freie Fettsäuren enthaltenden organischen Phase wurden für die Titration entnommen.

Rahmprobenextrakt (= Lösung R)

Gleiche Probenvorbereitung wie für Lösung M, aber mit ca. 1 g Rahmprobe und 4,00 ml Wasser (anstelle von 5 g Milchprobe)

Blindprobenextrakt (= Lösung B)

Gleiche Vorbereitung wie für Lösung M, aber mit 5,00 ml Wasser (anstelle von 5 g Milchprobe).

N. B.: Für die monatliche Herstellung der Myristinsäurestammlösung sind ca. 15 Blindprobenextrakte nötig. Für die tägliche Herstellung von 50 ml Standardlösung S (c = 2,5 mmol/l) genügen 6 Blindprobenextrakte zur Verdünnung der Stammlösung.

Potentiometrische Titration

In den Vorversuchen wurde meistens ohne, in der vorgeschlagenen Titrationsmethode jedoch mit einer Additionsmethode (bekannter Zusatz Z von Myristinsäure) gearbeitet. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, wurde zuerst ein Blindprobenextrakt (B) inklusive Myristinsäurezusatz (Z) fünffach titriert; danach wurde der Standard (S) zusammen mit dem Blindwert (B) und dem Myristinsäurezusatz (Z) dreifach bestimmt und schlussendlich der Probenextrakt (P = M oder R) zusammen mit dem Blindwert (B) und demselben Myristinsäurezusatz (Z) doppelt bestimmt. Nach 10 Doppelbestimmungen muss der beschriebene Messzyklus wiederholt werden.

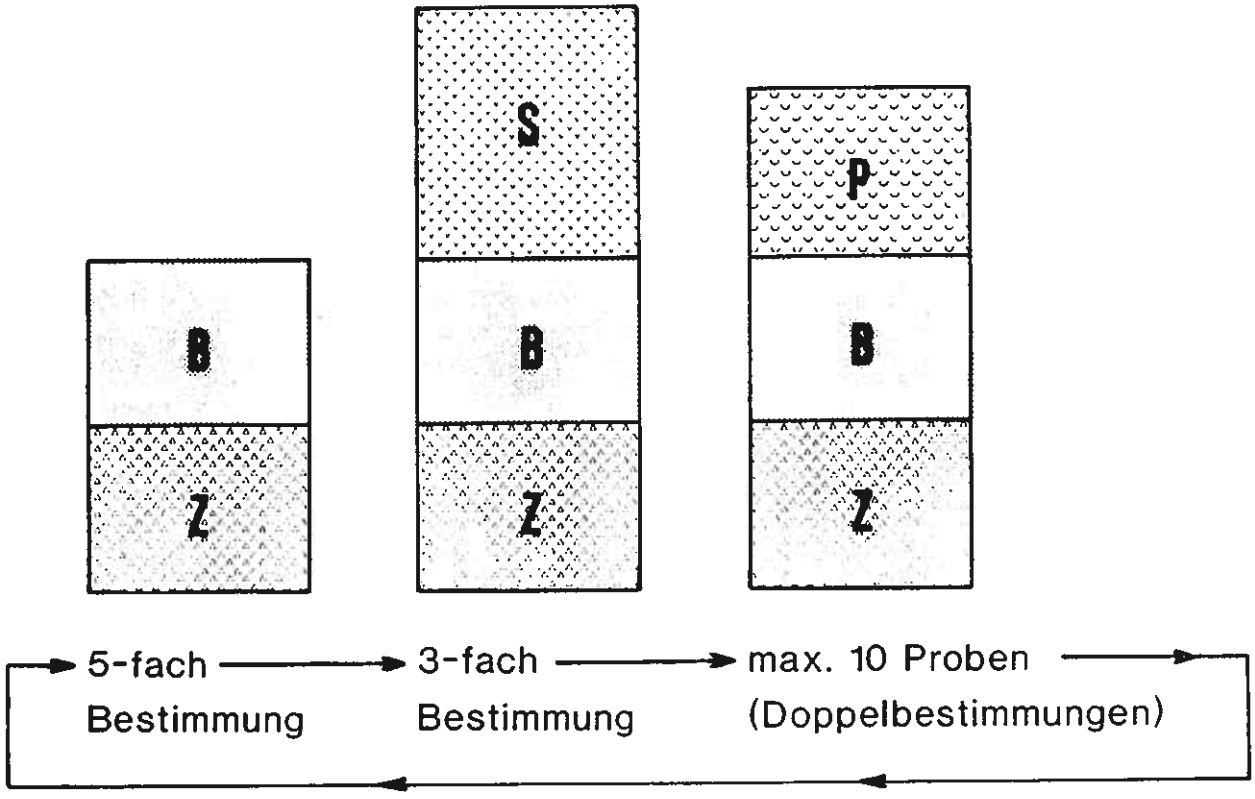

Abb. 2. Messzyklus der vorgeschlagenen Titrationsmethode
S = Standard (Myristinsäure)
P = Probe (freie Fettsäuren)
B + Z = Blindwert inklusive Myristinsäurezusatz

In der Praxis wird die Titration wie folgt ausgeführt:
5,00 ml Lösung (B, S, P = M oder R) wurden nach Zugabe von 0,250 ml Myristinsäurelösung Z (c = 5,00 mmol/l in Heptan) und 25,00 ml Ethanol (Volumenvergrösserung) gemäss den in Tabellen 2 und 3 angegebenen analytischen und rechnerischen Parametereinstellungen potentiometrisch titriert.

Visuelle Titration

Die visuelle Titration nach Deeth, modifiziert nach *Miller* (16), wurde als Vergleichsmethode angewandt. Diese Titration wurde unter Stickstoffspülung (CO_2-Verdrängung aus der Umgebungsluft) ausgeführt.

Resultate und Diskussion

Bei der Entwicklung dieser neuen Titrationsmethode wurden zuerst die Geräte- und Analysenparameter optimiert. Schliesslich wurde diese Methode auf Milch und Rahm angewendet.

Optimierung der Geräte- und Analysenparameter

Volumen und Lösungsmittel für die Volumenvergrösserung des Aliquotanteils

Das Volumen des nach Deeth erhaltenen Milch- oder Rahmprobenextraktes (ca. 9 ml) war zu gering, um mit dem Probenwechsler eine automatische potentiometrische Titration auszuführen. Eine Vergrösserung dieses Volumens war notwendig, um die 3 eingesetzten Elektroden, die Bürettenspitze sowie den Stabrührer vollständig einzutauchen. Beim Rühren dürfen keine Luftblasen erzeugt werden. Um die Schärfe des Equivalenzpunkts beizubehalten und um Mischverzögerungen und unnötigen Chemikalienverbrauch zu vermeiden, sollte das Volumen jedoch nicht übermässig vergrössert werden. Für das eingesetzte Probevolumen (Aliquotanteil von 5 ml, gleich wie bei der Deeth-Methode) hat sich eine Volumenvergrösserung um 25 ml als optimal erwiesen. Das einzusetzende organische Lösungsmittel wurde anhand der in Tabelle 4 angegebenen Messresultate ausgewählt.

Die Titrationskurvenauswertung liefert für Aceton und Acetonitril 3, für die Alkohole aber nur 2 Equivalenzpunkte (EP). Die Anzahl der EP und die ungiftige Beschaffenheit waren ausschlaggebend für die Wahl von Ethanol (absolut) für die Vergrösserung des Probevolumens. Die 2 registrierten EP sind wahrscheinlich dem gelösten Kohlendioxid und den freien Fettsäuren zuzuordnen.

Bestückung des Titrierkopfes

Um die geometrisch geeignetste Messanordnung der Titrierzelle zu bestimmen, wurden die 3 in Tabelle 5 und Abbildung 1 dargestellten Bestückungen des Titrierkopfes geprüft.

Tabelle 4. Wahl des Lösungsmittels für die Probenvolumenvergrösserung (n = 3 Bestimmungen pro Lösungsmittel)

Lösungsmittel	ml-Verbrauch KOH 5 mmol/l	Anzahl Equivalenzpunkte	Giftklasse
Ethanol abs.*	4,58	2	5
Isopropanol*	4,60	2	5
Methanol*	4,36	2	3
Aceton, p. A., Merck 14	4,54	3	4
Acetonitril, HPLC, Fluka 00692	4,56	3	2

* siehe Qualität und Reinheit in Tabelle 1

Tabelle 5. Einfluss der Bestückung des Titrierkopfes auf die Wiederholbarkeit der Messwerte (ml-Verbrauch KOH 5 mmol/l)

Position nach Abb. 1	1. Bestückung	2. Bestückung	3. Bestückung
1	Pt-Elektrode	Spülung (EtOH)	Pt-Elektrode
2	pH-Glaselektrode	pH-Glaselektrode	pH-Glaselektrode
3	Spüldüse	Pt-Elektrode	Spüldüse
4	Stabrührer	Stabrührer	Ag/AgCl-Elektrode
5	Ag/AgCl-Elektrode	Ag/AgCl-Elektrode	Stabrüher
6	Blindstopfen	Bürettenspitze	Bürettenspitze
8	Bürettenspitze	Blindstopfen	Blindstopfen
9–10	Blindstopfen	Blindstopfen	Blindstopfen
n	10	10	10
$\bar{x}$	26,0	25,2	24,9
S_x	1,25	0,41	0,37
V (%)	4,8	1,6	1,5

n = Anzahl Bestimmungen pro Bestückung
$\bar{x}$ = Mittelwert der Messwerte
S_x = Standardabweichung der Messwerte
V (%) = Variationskoeffizient (in %)

Aufgrund des Variationskoeffizienten wurde die 3. Bestückung für die vorgeschlagene Methode gewählt. Die theoretisch optimale Bestückung des Titrierkopfes ist wegen zu grossen Platzbedarfes nicht realisierbar.

Stabrührer

Tabelle 6 zeigt keinen signifikanten Unterschied, wenn ein Glas- und Polypropylenrührstab miteinander verglichen werden. Aus Platzgründen wurde die Spirale aus Glas gewählt.

Tabelle 6. Einfluss des Rührstabtyps auf die Wiederholbarkeit der Messwerte (ml-Verbrauch KOH 5 mmol/l)

	Spirale aus Glas	Flügel aus Polypropylen
n	20	20
$\bar{x}$	0,850	0,879
S_x	0,0076	0,0079
V (%)	0,89	0,90

n = Anzahl Bestimmungen pro Rührstab
$\bar{x}$ = Mittelwert der Messwerte
S_x = Standardabweichung der Messwerte
V (%) = Variationskoeffizient (in %)

Titrierbürette

Die 3 erhältlichen Bürettengrössen (1 ml, 5 ml und 10 ml) wurden geprüft. Aufgrund ihres speziell günstigen Kolbenhub-/Ausstossvolumen-Verhältnisses ist die 1-ml-Bürette theoretisch die genaueste. Wegen technischer Probleme wurde sie jedoch nicht gewählt: ihre zu geringe Titriergeschwindigkeit (Maximum 0,30 ml/min) ergab keine saubere Titrationskurve. Dichtigkeitsprobleme sowie schwer vermeidbare Luftbläschen im Zylinder würden zudem ihren Einsatz für Routinearbeit beeinträchtigen. Die 10-ml-Bürette war zu gross für eine genaue Ablesung des Ausstossvolumens (ca. 0,1 bis 0,3 ml). Somit stellte die 5-ml-Bürette eine günstige Kompromisslösung dar (max. 15 ml/min; ablesbare Auflösung: 1 μl, absoluter Fehler: $\pm$ 15 μl; Wiederholfehler: 5 μl).

Spülung der Messvorrichtung

Tabelle 7 zeigt die Notwendigkeit, nach jeder Titration eine Spülung (5 s) der Messvorrichtung mit Ethanol (technisch) durchzuführen, um die Verschleppung zu vermeiden.

Tabelle 7. Titration desselben Probenextraktes ohne und mit Spülung mit technischem Ethanol. Spülzeit: 5 s

Position in der Messreihe	ml-Verbrauch von KOH 5 mmol/l bis zur Erkennung des EP	
	ohne Spülung	mit Spülung
1.	0,764	0,760
2.	0,780	0,764
3.	0,792	0,758
4.	0,828	0,770
5.	0,866	0,760
6.	kein EP erkannt	0,766

Bei der Wiederholung der Titration desselben Probenextraktes ohne Zwischenspülung verschlechterten sich die Titrationskurven fortschreitend, bis schliesslich der Equivalenzpunkt der Titration nicht mehr erkennbar war.

Wartezeit auf dem Probenwechsler

Nach Tabelle 8 hatte im Vergleich zu einer sofortigen Titration die Wartezeit der Probenextrakte auf dem Probenwechsler vor der Titration praktisch keinen Einfluss.

Tabelle 8. Einfluss des Stehenbleibens der unbedeckten Probenlösungen im Probenwechsler auf die Wiederholbarkeit der Messwerte (ml-Verbrauch KOH 5 mmol/l)

	Titration mit Probenwechsler	Titration ohne Probenwechsler
	kontinuierlich (10 Positionen)	einzeln (1 Position)
n	20	20
$\bar{x}$	0,623	0,661
S_x	0,0120	0,0098
V (%)	1,93	1,48

n = Anzahl Bestimmungen
$\bar{x}$ = Mittelwert der Messwerte
S_x = Standardabweichung der Messwerte
V (%) = Variationskoeffizient (in %)

Speziell bei erhöhten Temperaturen im Laboratorium ist es jedoch empfehlenswert, jedes Probengefäss mit einem Kunststoffdeckel, z. B. einer Teflonscheibe (eigene Herstellung), zu verschliessen, um Störfaktoren wie Anreicherung der Probenextrakte mit Kohlendioxid sowie Verdunstung der flüchtigsten freien Fettsäuren und des Lösungsmittelgemisches zu begrenzen. Die verwendeten Verschlussdeckel wurden vor der Titration seitlich weggestossen, kurz bevor das Probengefäss von der Hebebühne gefasst und angehoben wurde.

Bei ausgeprägten Schwankungen der Raumtemperatur sind häufige Titerbestimmungen der alkoholischen Kalilaugenlösung zu empfehlen, um ihren hohen Temperaturkoeffizienten zu kompensieren oder eine thermostatisierbare Wechseleinheit einzusetzen (Art.-Nr. für 5 ml: 6.3012.153).

Konditionierung der Glaselektrode

Die Konditionierung der Glaselektrode ist sehr wichtig, aber schwer kontrollierbar (Tabelle 9).

Tabelle 9. Einfluss der Konditionierung der pH-Glaselektrode auf die Wiederholbarkeit der Messwerte (ml-Verbrauch KOH 5 mmol/l)

		ml KOH
über Nacht in dest. Wasser, 1 Stunde vor Gebrauch in Lösungsmittelgemisch	n	10
	$\bar{x}$	1,335
	S_x	0,0497
	V (%)	3,7
über Nacht in dest. Wasser, 1 bis 2 Stunden vor Gebrauch in Blindprobenextrakt	n	10
	$\bar{x}$	1,267
	S_x	0,0240
	V (%)	1,9
über Nacht in Blindprobenextrakt	n	10
	$\bar{x}$	1,284
	S_x	0,0178
	V (%)	1,4
über Nacht in Lösungsmittelgemisch mit 5% Wasserzugabe	n	10
	$\bar{x}$	1,202
	S_x	0,0232
	V (%)	1,9

n = Anzahl Bestimmungen pro Konditionierung
$\bar{x}$ = Mittelwert der Messwerte
S_x = Standardabweichung der Messwerte
V (%) = Variationskoeffizient (in %)

Neben den erwähnten Schwierigkeiten bei Titration in nichtwässerigem Milieu (hohe Impedanz, zugehörige elektrostatische und -dynamische Störpotentiale) hat die zeitliche Veränderung der Quellschicht der Glaselektrode eine starke Auswirkung. Dies ist wahrscheinlich das heikelste Problem der vorgeschlagenen Bestimmungsmethode. Es wird empfohlen, die Glaselektrode über Nacht in destilliertes Wasser oder sogar in eine sehr verdünnte Salzsäurelösung (z. B. 10 mmol/l (18)) zu legen und danach während mindestens 1 Stunde im Blindprobenextrakt zu konditionieren. Die wechselweise Verwendung einer zweiten gleichen Glaselektrode ermöglicht ein kontinuierliches Arbeiten im Routinelaboratorium. Die Quellschichten der Elektroden werden alternierend regeneriert.

Wartezeit vor der Titration

Mit dem Titroprocessor 686 ist es möglich, vor der Titration eine Wartezeit mit eingeschaltetem Rührmotor zu programmieren. Wie aus Tabelle 10 ersicht-

lich, hat diese Wartezeit eine Doppelfunktion. Einerseits ermöglicht sie eine sorgfältige Zumischung der 0,250 ml Myristinsäurelösung A (Additionsmethode) und der 25,00 ml Ethanol absolut (Volumenvergrösserung des Aliquotanteils des Probenextraktes). Andererseits berücksichtigt sie die Ansprechzeit der Glaselektrode im nichtwässerigen Milieu ohne unnütze Verlängerung der totalen Analysezeit.

Tabelle 10. Einfluss der Wartezeit («pause» in s) auf die Stabilität des Signals der Messkette zu Beginn der Titration

0 s		15 s		30 s	
V/ml[1]	U/mV[2]	V/ml[1]	U/mV[2]	V/ml[1]	U/mV[2]
0,000	23	0,000	44	0,000	65
0,035	27	0,034	47	0,031	65
0,069	31	0,067	50	0,062	64
0,104	35	0,101	50	0,094	64
0,138	34	0,135	49	0,125	63
0,173	34	0,168	48	0,156	62
0,208	33	0,202	47	0,187	62
0,242	32	0,235	46	0,218	61

[1] V/ml: Volumen der mit der Bürette zugegebenen Titrierlösung.
[2] U/mV: Änderung des Potentials nach der Titrierlösungszugabe.

Das Titriergerät bietet auch die Möglichkeit, ein festgelegtes Startvolumen zu Beginn der Titration schnell zuzudosieren (Start V) und ein maximales Volumen der Titrierlösung (Stop V) zu programmieren. Damit lässt sich die Titrationszeit verkürzen.

Empfindlichkeit der Erkennung des Equivalenzpunktes

Der Titroprocessor 686 bietet 8 verschiedene Möglichkeiten (Pos. 1 bis 8), um die Empfindlichkeit der Erkennung des Equivalenzpunktes (EP crit.) einzustellen (Tabelle 11).

Die geringsten Empfindlichkeitseinstellungen (Pos. 4 und 8) ermöglichen die Ausschaltung zahlreicher Titrationsartefakte. Position 5 bis 8 wirken ähnlich wie Position 1 bis 4, aber mit einer zusätzlichen Signaldämpfung.

Titriergeschwindigkeit

Verschiedene Vorversuche haben gezeigt, dass die höchste geprüfte Titriergeschwindigkeit (1,00 ml/min) noch brauchbar ist, wenn die Geschwindigkeit kurz vor dem Equivalenzpunkt (EP) reduziert wird (anticip.), um eine Übertitration zu vermeiden. Nach Tabelle 12 ist für die höchste geprüfte Titriergeschwindigkeit auch eine erhöhte Reduktion (anticip. 10) zu empfehlen.

Tabelle 11. Optimierung der Empfindlichkeit (EP crit.) auf die Erkennung des Endpunktes der Titration (ml KOH 5 mmol/l)

EP crit.		1	2	3	4	5*	6*	7*	8*
Blindprobe	EP 1	0,221	0,237	n. e.	n. e.	0,221	0,237	n. e.	n. e.
	EP 2	0,370	0,370	0,370	0,370	0,370	0,370	0,370	0,370
Probe	EP 1	0,362	n. e.	n. e.	n. e.	0,362	n. e.	n. e.	n. e.
	EP 2	0,697	0,674	n. e.	n. e.	0,697	0,674	n. e.	n. e.
	EP 3	0,877	0,892	0,909	n. e.	0,877	0,892	0,909	n. e.
	EP 4	1,185	1,187	1,188	1,191	1,185	1,187	1,188	1,191

n. e. = nicht erfasst
* = gleiche Empfindlichkeit wie EP crit. 1 bis 4, aber mit einer zusätzlichen Dämpfung bei starkem Rauschpegel des Signals.

Tabelle 12. Einfluss der Anpassung der Titriergeschwindigkeit (= anticip.) auf den Titrierlösungsverbrauch (in ml KOH) und auf die Wiederholbarkeit der Messwerte (in %) (Grundgeschwindigkeit: 1,00 ml/min)

anticip.	ml-Verbrauch KOH 5 mmol/l			Faktor der Titrierlösung	FFS-Gehalt mmol/kg Milchfett		
	PEL	BEL	Diff.		$\bar{x}$	S_x	V (%)
0	0,761	0,453	0,308	0,978	26	0,502	1,93
1	0,748	0,463	0,285	0,988	24	0,560	2,33
3	0,707	0,449	0,258	0,989	22	1,282	5,83
5	0,705	0,401	0,304	0,984	26	0,539	2,07
7	0,686	0,407	0,279	0,979	24	1,136	4,73
10	0,719	0,406	0,313	0,972	26	0,330	1,27

PEL = Probenextraktlösung
BEL = Blindprobenextraktlösung
Diff. = PEL-BEL
$\bar{x}$ = Mittelwert der Messwerte (n = 5)
S_x = Standardabweichung der Messwerte
V (%) = Variationskoeffizient (in %)

Standardlösung

Für die Titerbestimmung der Kalilauge-Titrierlösung wurden bei den Vorversuchen Salzsäure in Wasser, Kaliumhydrogenphthalat in Wasser sowie Benzoesäure in Blindprobenextrakt verwendet. Aufgrund ihres pK-Wertes wurde eine Myristinsäurelösung (c = 2,5 mmol/l in Blindprobenextrakt) als Standardlösung S gewählt. Diese gewährleistet auch am besten die Standardisierung der Methode mit dem Titroprocessor 686.

Anwendung der Methode auf Milch und Rahm

Unspezifische Titration der freien Fettsäuren

Aus Abbildung 3 und Tabelle 13 ist ersichtlich, dass die freien Fettsäuren (C-4 bis C-22) wegen der geringfügigen Unterschiede zwischen ihren pK_s-Werten (Tabelle 14) nicht nacheinander, sondern gesamthaft titriert werden.

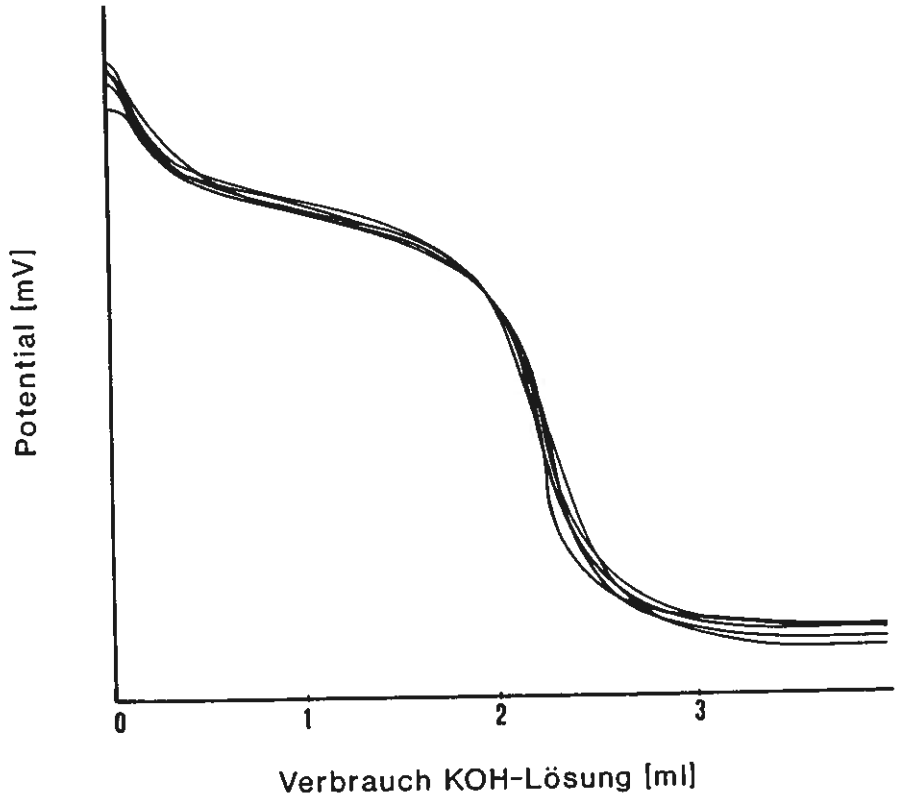

Abb. 3. Titrationskurven einzelner organischer Fettsäuren (c = 10 mmol/l in Blindprobenextrakt). Die Ordinate stellt eine *relative* mV-Skala dar. Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure und Stearinsäure sind nicht differenzierbar

Tabelle 13. Vergleich der optischen (Deeth) und der vorgeschlagenen potentiometrischen Methode bei verschiedenen einzelnen freien Fettsäuren (c = ca. 10 mmol/l)

Komponente	Potent. Titration			Optische Titration			Mittl. Diff.	
	1. Mess.	2. Mess.	$\bar{x}$	1. Mess.	2. Mess.	$\bar{x}$	mmol/l	%
Buttersäure	10,00	10,16	10,08	10,14	9,99	10,07	+ 0,01	0,1
Caprylsäure	10,34	10,26	10,32	10,34	10,32	10,33	- 0,01	0,1
Caprinsäure	9,96	10,17	10,07	9,97	10,00	9,99	+ 0,08	0,8
Laurinsäure	10,13	10,26	10,20	10,17	10,14	10,16	+ 0,04	0,4
Myristinsäure	10,10	10,22	10,16	10,16	10,17	10,17	- 0,01	0,1
Palmitinsäure	10,47	10,55	10,51	10,47	10,48	10,48	+ 0,03	0,3
Stearinsäure	10,35	10,26	10,31	10,31	10,33	10,32	- 0,01	0,1

Tabelle 14. pK_s-Werte einiger Carbonsäuren in Wasser

Fettsäuren		pK_s	Bemerkung, Herkunft
Ameisensäure	C1	3,75[1]	Keine Hydrolyseprodukte des Milchfettes
Essigsäure	C2	4,75[1]	
Propionsäure	C3	4,87[1]	
Buttersäure	C4	4,82[1]	Für die Ranzigkeit verantwortliche Hydrolyseprodukte des Milchfettes
Valeriansäure	C5	4,79[1]	
Capronsäure	C6	4,84[2]	
Caprylsäure	C8	4,85[2]	
Caprinsäure	C10	5,00[2]	
Milchsäure	*pKs*	3,08[2]	Vorhanden in fermentierten Milchprodukten
Citronensäure	*pKs* 1	3,08[2]	Spuren in Milch- und Rahmproben
	pKs 2	4,74[2]	Vorhanden in grosser Konzentration in Reinigungs- und Spülmitteln
	pKs 3	5,40[2]	
Kohlensäure	*pKs* 1	6,52	Vorhanden wegen des Luftkohlendioxids
	pKs 2	10,40	

[1] Ref. (19)
[2] Ref. (15)

Die verschiedenen Titrationskurven fallen in ihrem Verlauf und in ihrem Equivalenzpunkt zusammen. Diese Bedingung ist für eine exakte Titration unerlässlich. Selbstverständlich werden auch andere gleichzeitig extrahierte Säuren, wie z. B. Milchsäure (verdorbene und fermentierte Proben) und Citronensäure (Spül- und Reinigungsmittel) sowie Kohlensäure (Kohlendioxid der Luft), mitbestimmt (Tabelle 14).

Verbesserung der Wiederholbarkeit mittels einer Additionsmethode

Tabelle 15 zeigt eine Verbesserung der Wiederholbarkeit der Messwerte um einen Faktor von ca. 2 bei einem Myristinsäurezusatz vor der Titration.

Vergleich der potentiometrischen Titration mit der visuellen Titration nach Deeth

Eine statistische Auswertung der Übereinstimmung der beiden Bestimmungsmethoden wurde aufgrund der entsprechenden Regressionsgerade (visuelle Titration nach Deeth als Abszissenwert, potentiometrische Titration als Ordinatenwert) ausgeführt. Aus den zugehörigen *F*-Tests können mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% folgende Aussagen gemacht werden:

- die Steigung β der Regressionsgerade ist statistisch nicht von 1 verschieden $F_{(\beta = 1;\ P = 0{,}95)} = 0{,}90 < 3{,}84$)
- die Nullpunktordinate α ist statistisch nicht von Null verschieden ($F_{(\alpha = 0;\ P = 0{,}95)} = 0{,}62 < 3{,}84$).

Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0{,}980$ ($n = 130$).
Abbildung 4 zeigt die Übereinstimmung der beiden Methoden.

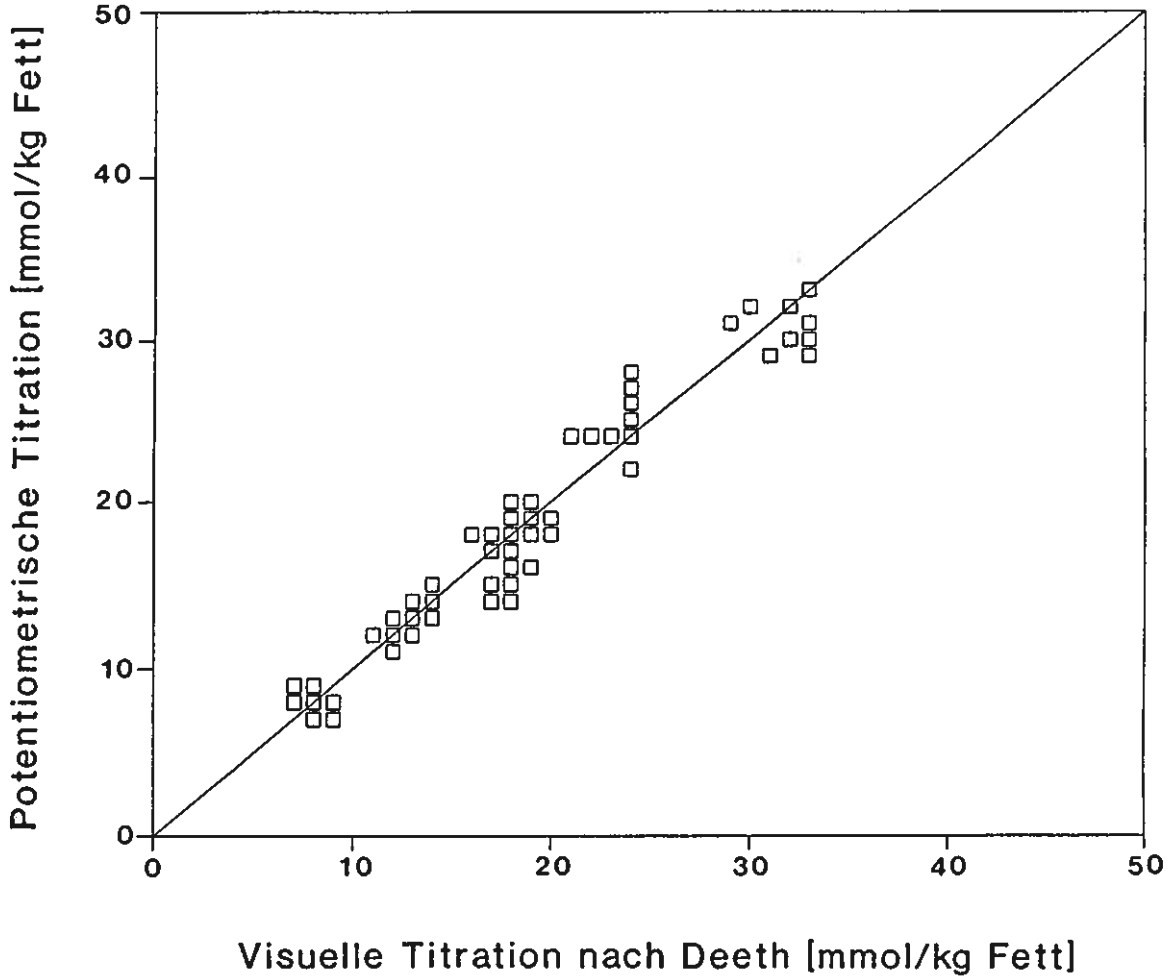

Abb. 4. Vergleich der vorgeschlagenen potentiometrischen Titrationsmethode mit der visuellen Titrationsmethode nach Deeth bei verschiedenen Milchprodukten (Roh-, Past- und UHT-Milch, Roh- und Past-Rahm mit 36% Fettgehalt, Kaffeerahm mit 15% Fettgehalt)
Ein Viereck kann mehrere zusammenfallende Datenpaare darstellen ($n = 130$)

Kurvenverlauf mit verschiedenen Proben

Abbildung 5 zeigt die Anwendung der vorgeschlagenen Methode auf verschiedene Milchprodukte. Die Kurven für Vollmilch, Kaffee- und Vollrahm verlaufen gleich und unterscheiden sich deutlich von derjenigen der Blindprobe. Wenn zufälligerweise 2 Equivalenzpunkte gerechnet werden (wie hier z. B. in Vollmilch und Vollrahm), ist für die Auswertung der zweite Equivalenzpunkt zu verwenden.

Tabelle 15. Verbesserung der Wiederholbarkeit der Messwerte mit Hilfe einer Additionsmethode. Titrierlösung: KOH 10 mmol/l

Parameter		Ohne Myristinsäurezusatz	Mit Myristinsäurezusatz*
beim Blindprobenextrakt	n	7 **	10
	$\bar{x}$ (ml)	0,145	0,300
	S_x (ml)	0,0095	0,0073
	V (%)	6,5	2,4
beim Probenextrakt	n	10	10
	$\bar{x}$ (ml)	0,505	0,660
	S_x (ml)	0,0166	0,0097
	V (%)	3,3	1,5

* Zusatz von 0,250 ml Myristinsäurelösung 5 mmol/l (wie in der vorgeschlagenen Methode empfohlen).

** 3mal wurde der Endpunkt nicht erfasst

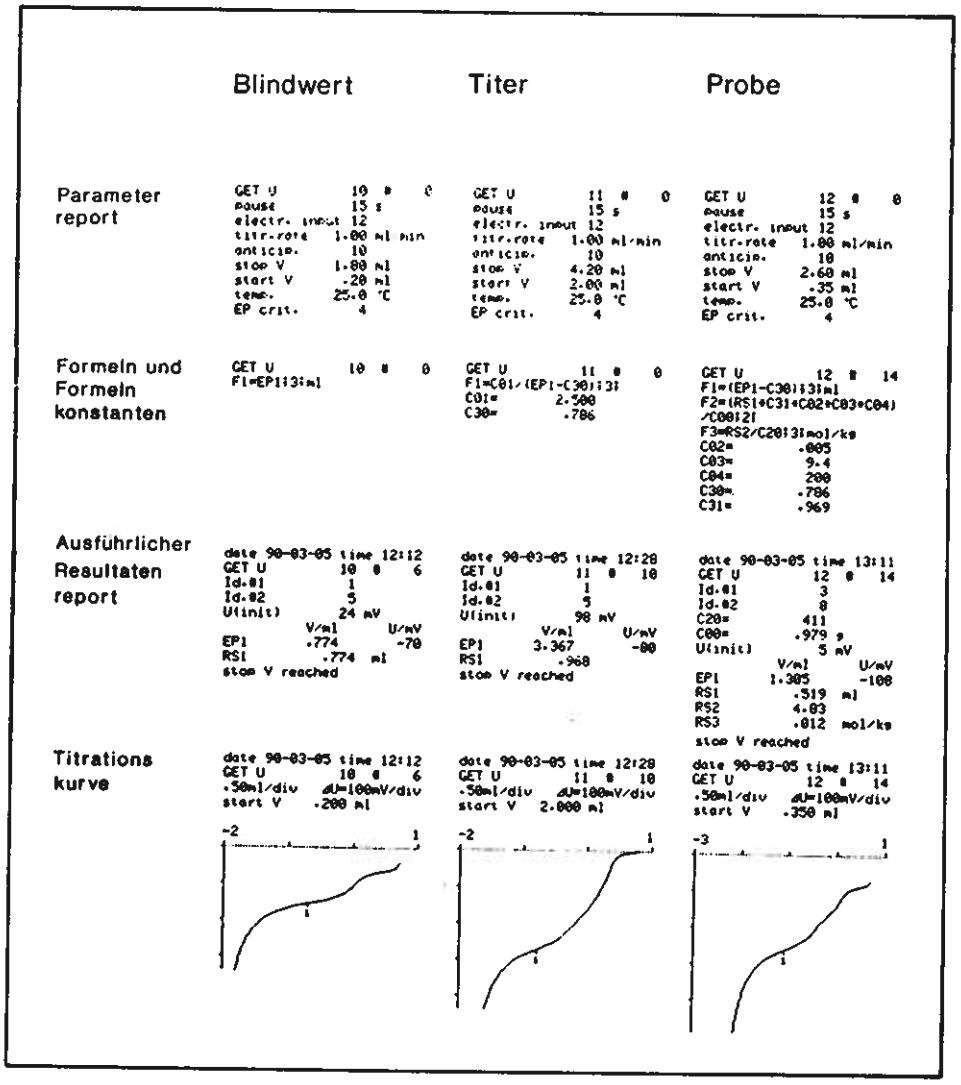

Abb. 5. Verlauf der potentiometrischen Titrationskurven bei verschiedenen Proben. Die Ordinate stellt eine *relative* mV-Skala dar

Schlussfolgerung

Die vorgeschlagene potentiometrische Titrationsmethode ermöglicht eine einfache, objektive und reproduzierbare Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch- und Rahmproben, in denen diese Komponenten als Indikatoren der Fettschädigung betrachtet werden. Da die Methode nicht spezifisch ist, werden alle extrahierten Säuren titriert.

Die neue, potentiometrische Bestimmungsmethode wurde mit Hilfe eines modernen mikroprozessorgesteuerten Titrationsgerätes (Titroprocessor 686 von Metrohm, ausgerüstet mit einem Differenzverstärker), einer Hilfselektrode und einem Paar symmetrischer, abgeschirmter Elektroden (Mess- und Referenzelektrode) entwickelt. Diese Methode ist gerätespezifisch und kann deshalb nicht ohne weiteres auf andere Titrierautomaten übertragen werden.

Mit einer für Titrationen nicht üblichen «Additionsmethode» (Zusatz von Myristinsäure) konnte die Reproduzierbarkeit des Verfahrens ohne grosse Arbeitsbelastung noch deutlich verbessert werden. Die Myristinsäure dient gleichzeitig als Urtitersubstanz bei der Titerbestimmung der Titrierlösung.

Die Reproduzierbarkeit hängt vor allem von der Konditionierung der Glaselektrode (Quellschicht) ab. Der Variationskoeffizient der visuellen Titration nach Deeth (ca. 1–2%) scheint kleiner als derjenige der potentiometrischen Titration (ca. 2–5%). Diese Differenz zugunsten der visuellen Methode erklärt sich zum Teil durch die Beeinflussung der Bedienungsperson bei den wiederholten visuellen Titrationen. Der Hauptvorteil der neuen Titrationsmethode liegt demnach in der Objektivität der potentiometrischen Erfassung des Equivalenzpunktes (Unabhängigkeit von der visuellen Empfindlichkeit der Bedienungsperson beim Farbumschlag, kein Einfluss der Beleuchtung usw.). Die Automatisierung dieser Routinemethode erbringt zudem eine grosse Zeit- und Arbeitsersparnis.

Nach einer Überprüfung der verschiedenen angegebenen Analysenparameter sollte diese Bestimmungsmethode auch für andere Extraktionsgemische wie z. B. nach *Johnson* and *Gould* (2), *Driessen* (11) oder *BLM-Pedia* (5) anwendbar sein.

Dank

Die Autoren danken den Herren Dr. *W. Richter, P. Bruttel, P. Künzle* und *H. Peyer* der Firma Metrohm in Herisau für ihre wertvollen Anregungen und Beiträge zu dieser Arbeit sowie ihrem Kollegen Herrn Dr. *R. Sieber* für seine sorgfältige Kritik des Manuskripts.

Zusammenfassung

Zweck dieser Arbeit ist die Entwicklung einer potentiometrischen Methode für die Titration der freien Fettsäuren in Milch und Rahm. Die freien Fettsäuren wurden mit einer Mischung von geeigneten organischen Lösungsmitteln extrahiert. Die neue Methode konnte mit Hilfe des Titroprocessors 686 von Metrohm verwirklicht werden. Dieses moderne mikroprozessorgesteuerte Titrationsgerät war mit einem Differenzverstärker ausgerü-

stet und wurde mit einem symmetrischen, abgeschirmten Elektrodenpaar (Messelektrode und Referenzelektrode) sowie einer Hilfselektrode angewandt. Mit einem Probenwechsler für grosse Probenserien ist die Methode voll automatisierbar. Sie ist zuverlässiger und schneller als die visuelle – und darum subjektive – Titration nach Deeth. Letztere, die bis anhin für die Bestimmung der Fettschädigung in Milchprodukten verwendet wurde, soll durch die neue Methode ersetzt werden. Nach Optimierung der wichtigsten Analysenparameter (Titriergeschwindigkeit, Empfindlichkeit, Volumen, Konzentrationsbereiche, Lösungsmittel usw.) wurde die neue potentiometrische Methode mit der visuellen Methode nach Deeth verglichen. Mittels einer Additionsmethode (bekannter Zusatz von Myristinsäure) konnte die Wiederholbarkeit der Messungen noch verbessert werden (Variationskoeffizient 2–5%). Diese hängt vor allem von der Konditionierung der Glaselektrode in nichtwässrigem Milieu ab.

Résumé

Le présent travail a pour objectif la mise au point d'une méthode de titrage potentiométrique des acides gras libres du lait et de la crème après extraction de ces derniers au moyen d'un mélange adéquat de solvants organiques. Cette nouvelle méthode a été rendue possible par le développement du Titroprocessor 686 de la maison Metrohm, un titrateur moderne piloté par un microprocesseur, équipé d'un amplificateur différentiel, d'une électrode auxiliaire ainsi que d'une paire d'électrodes (mesure et référence) symétriques et blindées. Moyennant l'emploi d'un passeur d'échantillons pour de grandes séries d'analyses, cette méthode est en outre entièrement automatisable. Plus fiable et plus rapide, cette méthode est destinée à remplacer le titrage visuel, donc subjectif, selon Deeth, généralement utilisé pour évaluer le degré d'altération de la matière grasse des produits laitiers. Après une optimisation des principaux paramètres du titrage potentiométrique (vitesse, sensibilité, volumes, domaines de concentration, choix des solvants etc.), la méthode proposée est comparée à la méthode de Deeth. Le recours à une technique d'addition (ajout connu d'acide myristique) permet d'améliorer la répétabilité des mesures (cv de 2 à 5%), qui dépend avant tout du conditionnement de l'électrode de verre en milieu non aqueux.

Summary

The object of this work is to develop a potentiometric method for the titration of the free fatty acids in milk and cream. A mixture of appropriate organic solvents is used for the extraction of free fatty acids. The development of the new method was performed by the use of the titroprocessor 686 from Metrohm. This microprocessor controlled titrator was equipped with a built in differential amplifier, an auxiliary electrode and a couple of symmetrical screened electrodes (measuring electrode and reference electrode). An autosampler for large sample numbers permits full automation. The proposed method is more reliable and faster than visual titration according to Deeth, which is currently used for the determination of fat damages in dairy products. Both titration methods were compared after optimisation of the main parameters (speed, sensitivity, volume, concentration ranges, solvents, etc.) of the potentiometric titration. An addition method (addition of a given amount of myristic acid) allows to improve the repeatability of the measurements (coefficient of variation 2–5%), which principally depends on conditioning of the glass electrode in the non aqeuous medium used.

Literatur

1. *Johnson, B. C.* and *Gould, I. A.:* Variations in the acid degree of milk fat as affected by churning and extraction procedures. J. Dairy Sci. **29**, 504–505 (1946).
2. *Johnson, B. C.* and *Gould, I. A.:* Milk lipase system. III: Further studies of the solvent extraction procedure for obtaining fat from milk for titration. J. Dairy Sci. **32**, 447–451 (1949).
3. *Frankel, E. N.* and *Tarassuk, N. P.:* An extraction-titration method for the determination of free fatty acids in rancidic milk and cream. J. Dairy Sci. **38**, 751–763 (1955).
4. *Deeth, H. C., Fitz-Gerald, C. H.* and *Wood, A. F.:* A convenient method for determination of the extent of lipolysis in milk. Australian J. Dairy Technol. **30**, 109–111 (1975).
5. *Thomasow, J.:* Bestimmung der freien Fettsäuren in flüssigen Milchprodukten nach der BLM-PEDIA-Methode. Deut. Molkerei-Ztg **102**, 906–909 (1981).
6. *Mouillet, L., Luquet, F. M., Nicod, H., Boudier, J. F.* et *Mahieu, H.:* La lipolyse des laits. Etude d'une méthode rapide de mesure. Le Lait **61**, 171–186 (1981).
7. *Biallas, E.:* Die Bestimmung der freien Fettsäuren in wenigen Minuten und ihre milchwirtschaftliche Bedeutung. Molkerei-Ztg Welt der Milch **36**, 236–238 (1982).
8. *Woo, A. H., Kollodge, S.* and *Lindsay, R. C.:* Modified techniques for improved gas chromatographic quantification of the free fatty acids in dairy foods. J. Dairy Sci. **67**, 1517–1520 (1984).
9. *Lindqvist, B., Roos, T.* and *Fujita, H.:* Auto-analyzer determination of free acids in farm milk. Milchwissenschaft **30**, 12–17 (1975).
10. Anon.: Milk, cream and reconstituted dry milk (Routine method using Autoanalyzer), International Dairy Federation FIL/IDF, Group E39 – Free fatty acids – Doc. B31a, January 1986.
11. *Driessen, F. M., Jellema, A., van Luin, F. J. P., Stadhouders, J.* and *Wolbers, G. J. M.:* An adaptation of the BDI method suitable for routine assay. Neth. Milk Dairy J. **31**, 40–55 (1977).
12. *Deeth, H. C.* and *Fitz-Gerald, C. H.:* Lipolysis in dairy products: a review. Australian J. Dairy Technol. **31**, 53–64 (1976).
13. *Koops, J.* and *Klomp, H.:* Rapid colorimetric determination of free fatty acids (lipolysis) in milk by the copper soap method. Neth. Milk Dairy J. **31**, 56–74 (1977).
14. Anon.: Potentiometrischer Differenzverstärker glättet gestörte nichtwässrige Titrationskurven. Metrohm Information **17** (2), 7–8 (1988).
15. *Kuzdzal-Savoie, S.:* Flavour impairment of milk and milk products due to lipolysis. VII. Determination of free fatty acids in milk and milk products. International Dairy Federation FIL/IDF, A-Doc **43**, 63 (1979).
16. *Miller, B.* und *Puhan, Z.:* Das «lipolysierbare» Fett als Indikator für die Fettschädigung in der Rohmilch. Schweiz. Milchw. Forsch. **15**, 10–17 (1986).
17. *Bosset, J. O., Imhof, M. I., Knecht, P., Graber, B.* und *Steiger, G. J.:* Die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Rahm. III. Optimierung und Standardisierung des Extraktionsverfahrens mit Hilfe einer neu entwickelten Schüttelmaschine. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. (in Vorbereitung).

18. *Collomb, M.:* Persönliche Mitteilung (FAM, 3097 Liebefeld-Bern)
19. *Huber, W.:* Titrationen in nichtwässerigen Lösungsmitteln, S. 258. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main 1964.