

Kommissie voor Toegepast Wetenschappelijk Onderzoek
in de Zeevisserij (T.W.O.Z.)

(Voorzitter : F. LIEVENS, directeur-generaal)

=====

Werkgroep "Visverwerkende Bedrijven" (I.W.O.N.L.)

Spektrofotometrische bepaling van fenolen in gerookte vis

D. DECLERCK

augustus 1973

1. Inleiding.

Met het oog op de kwaliteit van gerookte vis is een betere kennis van de kwaliteit en de kwantiteit van de opgenomen rookbestanddelen gedurende het rookproces van groot belang.

De apparatuur die de rooksnelheid en -dichtheid bepaalt, geeft een beeld van het aantal rookeenheden dat per tijdseenheid door een rookruimte is gegaan.

Uit rookanalyses kan een idee van de samenstelling van de rook worden gevormd. Aan de hand van deze gegevens kan het rookproces beter worden gecontroleerd en kan worden gemeten welke rookcomponenten worden opgenomen.

De hoeveelheden van deze componenten die door de vis worden opgenomen en een maat vormen voor de graad van gerookt zijn, blijven daarbij nog steeds onbekend. De invloed van bepaalde factoren op de rookopname, zoals temperatuur of relatieve vochtigheid, blijft tevens een open vraag.

In deze optiek vormt de kwantitatieve fenolbepaling in gerookte vis een goed uitgangspunt bij de studie van de invloed van deze veranderlijken. De fenolgroep die een aanzienlijke fraktie van de rook uitmaakt, bezit immers belangrijke eigenschappen zoals aromavorming, microbicide werking en kleurvorming. Het is de enige groep van verbindingen die in het onge-rookte produkt totaal afwezig is.

In de literatuur zijn weinig specifieke klassieke methodes om fenolen te doseren, aangegeven. Meestal wordt de toevlucht genomen tot een fotometrische methode, alhoewel er toch enkele andere methodes bestaan, zoals volumetrische en polarografische.

Fenol en cresol kunnen potentiometrisch in zwavelzuur en ethanol (of azijnzuur) midden worden gemeten. In een midden van waterstofchloride

en azijnzuur kunnen fenolen door titratie met thiosulfaat na toevoegen van kaliumjodide worden gedoseerd (1).

Het totale fenolgehalte kan worden bepaald uit het verschil van twee titraties met loog, waarbij in de ene titratie op fenoltaleine en in de andere op nijlblauw wordt getitreerd. Deze eerste twee methodes zijn volumetrische methodes en hierbij wordt verondersteld dat er zich geen andere oxiderende stoffen in de oplossing bevinden.

Verbindingen met een -OH-groep rechtstreeks aan een aromatische kern gebonden, kunnen polarografisch door titratie met paradiazobenzeensulfonzuur worden bepaald (2). Volgende fenolen worden op deze wijze gedoseerd : fenol, resorcine, floroglusine, pyrogallol, orsine en guaiacol.

Bij de fotometrische methodes zijn een drietal methodes gekend, nl. de methode volgens Gibbs (3, 4, 5, 6), de sulfanilmethode (3, 7, 8) en de 4-aminoantipyrinemethode (9, 10, 11, 12). Deze methodes steunen op een koppelingsreactie van fenol in de para-plaats. Voor deze drie methodes reageren de paragesubstitueerde fenolen niet of zeer onvolledig via een van hun ortho-posities. Daarnaast bestaat echter nog een vierde fotometrische methode, waarbij alle verbindingen met fenolische -OH-groepen worden bepaald. Door toevoeging van het fenolreagens van Folin & Ciocalteu wordt een kleurreactie bekomen (13). Deze methode is evenwel zeer gevoelig voor storingen.

Om de p-ongesubstitueerde fenolen te bepalen, zijn alleen die fotometrische methodes bruikbaar die steunen op een koppelingsreactie met fenol in de p-positie. Het totale fenolgehalte kan met de methode van Folin & Ciocalteu worden gedoseerd. De p-gesubstitueerde fenolen, die verantwoordelijk zijn voor de rookgeur en -smaak en voor de microbicide werking, worden met geen enkele methode rechtstreeks gemeten. Nochtans zijn deze fenolen rijkelijk in houtsmook vertegenwoordigd, hetgeen op grond van de structuur van lignine te verwachten is.

Het gehalte aan p-gesubstitueerde fenolen, die voornoemde eigenschappen bezitten, kan evenwel onrechtstreeks worden bekomen door aftrekking van de gevonden waarden voor het gehalte aan p-ongesubstitueerde fenolen van het totale fenolgehalte.

Er wordt geopteerd voor de spectrofotometrische methodes ; zij zijn te verkiezen boven de polarografische of volumetrische, omwille van de grotere gevoeligheid en de snelheid van de methodes.

De p-ongesubstitueerde fenolen worden volgens de 4-aminoantipyrine-methode en het totale fenolgehalte wordt volgens de methode van Folin & Ciocalteu bepaald.

2. Materiaal en methodes.

Principe.

Een aantal gr fijngemalen visvlees of vishuid wordt gestoomdistilleerd bij een welbepaalde pH en gedurende een welbepaalde tijd, zodat een heldere oplossing die de te bepalen fenolfracties bevat wordt bekomen.

Aan de hand van de standaardkurve die onder dezelfde omstandigheden wordt opgesteld, kunnen dan de verschillende fenolconcentraties in het visvlees of in de vishuid worden bepaald. De bekomen fenolconcentraties zijn allen uitgedrukt als gewichtshoeveelheden C_6H_5OH per gewichtshoeveelheid visvlees of vishuid. In onderhavig geval wordt dit : mgr C_6H_5OH per kg of ppm fenol.

A. De 4-aminoantipyrinemethode.

Reagentia.

NaOH : 0,2 N

Boraatbuffer : 24,7 gr H_3BO_3 en 4 gr NaOH worden in een liter gesedimentiseerd water opgelost.

4-Aminoantipyrinereagens : 3 % in water.

Fenolstandaard : 3 gr fenol wordt in een liter gedeseioniseerd water opgelost ; deze oplossing heeft dan een fenolconcentratie van 3000 ppm.

Kaliumferricyanide : $K_3Fe(CN)_6$: 10 % in water.

Werkwijze.

Aan 1 ml van de te onderzoeken oplossing (fenoloplossing of visdestillaat) wordt 1 ml 0,2 N NaOH, 2 ml boraatbuffer, 0,05 ml 4-aminoantipyrinereagens en 0,2 ml kaliumferricyanideoplossing toegevoegd. Er wordt gemeten ten opzichte van een specifieke blanco.

B. De Folin & Ciocalteu methode.

Reagentia.

NaOH : 2 N

Folin & Ciocalteureagens : het is een algemeen fenolreagens dat bestaat uit fosfomolybdatofosfowolfraamzuur en lithiumsulfaat ; de kleurreactie wordt veroorzaakt door de reductie van Mo^{6+} , waarbij een blauwgekleurde verbinding ontstaat ; het lithiumsulfaat zorgt ervoor dat geen neerslag van Na-complexen optreedt (14).

Werkwijze.

Aan 5 ml van de te onderzoeken oplossing (fenolverdunning of visdestillaat) wordt 0,4 ml NaOH 2N en 0,2 ml Folin en Ciocalteureagens toegevoegd. Er wordt eveneens ten opzichte van een specifieke blanco gemeten.

Voor beide methoden werd de invloed van veranderlijken op de lichtabsorptie en op de destillatie nagegaan.

Een standaardkurve werd opgesteld en de bruikbaarheid ervan werd met behulp van statistische technieken uitgetest (15). Verder werd een ijklijn in het juiste concentratiegebied opgesteld.

De stoomdestillaties werden uitgevoerd met het toestel van Antonacopoulos (16) en de fenolconcentraties werden gemeten met een "Unicam SP 500".

Uiteindelijk werden de betrouwbaarheidsgrenzen (17) berekend, uitgaande van een aantal analyses op gestoomde paling.

3. Resultaten en besprekingen.

A. De 4-aminoantipyrinemethode.

a. Invloed van de veranderlijken op de lichtabsorptie.

1) Invloed van de pH op de absorptie.

De invloed van de pH werd bij kleine en grote concentraties fenol onderzocht (tabel 1).

De golflengte waarbij de metingen werden uitgevoerd, bedroeg 508 nm.

Tabel 1 - Invloed van de pH op de lichtabsorptie.

pH	E (24 ppm)	E (6 ppm)	pH	E (24 ppm)	E (6 ppm)
4	0,035	0,014	9,3	0,751	0,209
6	0,596	0,160	10	0,733	0,206
7	0,681	0,178	12	0,687	0,156
8	0,737	0,203	13	0,009	0,003
9	0,743	0,209			

Zowel bij grote, als bij kleine concentraties is er een max. bij pH 9,3, namelijk de pH-waarde van de boraatbuffer. De absorptie is het meest pH gevoelig bij grotere concentraties.

De afwijkingen bedragen ongeveer 2 % bij pH 8 en 10. Indien met de boraatbuffer wordt gewerkt, zullen geen noemenswaardige fouten door kleine pH variaties optreden.

2) Stabiliteit van de absorptie.

Zowel voor een visdestillaat, als voor zuivere fenolconcentraties (24 en 6 ppm) werd de stabiliteit van de absorptie uitgetest.

Na een uur is er in de absorptie van de zuivere fenoloplossingen een teruggang van ongeveer 2 %, terwijl de teruggang bij het visdestillaat slechts 1 % bedraagt. Bij deze laatste neemt de absorptie zelfs toe na twee uur. Dit dient toegeschreven te worden aan het feit dat de p-gesubstitueerde fenolen op de duur ook enigszins gaan reageren, via hun o-posities. Het gunstige gebied is begrepen tussen 20 min. en een uur, daar de absorptie dan voor de drie gevallen het meest stabiel is.

b. Invloed van de veranderlijken op het rendement van de destillatie.

1) Invloed van de destillatieduur.

De standaardoplossing waarmede de destillaties werden uitgevoerd bedroeg 24 ppm. Vier destillaties werden verricht, waarbij telkens 50 ml van de standaardoplossing voor het experiment werden gebruikt. Er werden respectievelijk 50, 100, 150 en 200 ml als destillaat opgevangen. De extincties werden gemeten en vergeleken met de extincties van de niet ge-distilleerde fenolconcentraties van 24, 12, 8 en 6 ppm (tabel 2).

Tabel 2 - Invloed van de destillatieduur op het rendement van de destillatie.

Destillaat in ml	Concentratie (ppm)	E (rechtstreeks)	E (dest.)	Rendement
50	24	0,760	0,272	36 %
100	12	0,372	0,219	59 %
150	8	0,242	0,196	81 %
200	6	0,190	0,194	86 %

Uit tabel 2 blijkt duidelijk dat naarmate het rendement hoger is de reproduceerbaarheid beter zal zijn. Dit is niet alleen te wijten aan een kleinere relatieve fout op het volume, maar ook aan een kleinere fout op de destillatie.

Hoe meer destillaat anderzijds wordt opgevangen, hoe verdunder dit wordt, voor eenzelfde beginconcentratie (24 ppm). De extinctie van het destillaat daalt niet zo snel als de concentratie, omwille van het rendement, maar toch is er een duidelijke afname.

Rekening houdend met beide factoren werd uiteindelijk 150 ml als beste waarde uitgekozen.

2) Invloed van de pH op het rendement van de destillatie.

Hierbij werd voor iedere destillatie de fenoloplossing in het destillatievat op een andere pH gebracht, waarvan telkens 150 ml destillaat werd opgevangen (tabel 3).

Tabel 3 - Invloed van de pH op het rendement van de destillatie.

pH	1,0	2,0	3,0	7,0
E (gem.)	0,601	0,603	0,562	0,588

Een vergelijking van de verschillende extincties wijst erop dat pH 1,0 de beste waarde is, doch het resultaat is niet zo uitgesproken als kan worden verwacht.

Uit een vergelijking van de extincties bij eenzelfde pH blijkt, dat de meest reproduceerbare resultaten bij pH 1,0 worden bekomen.

De pH van de destillaties schommelt tussen de waarden 3,6 en 4,2. De vraag kan worden gesteld of de boraatbuffer nog sterk genoeg is. Een pH-meting wees uit dat de pH van de kuvet nog steeds 9,3 bedroeg.

c. Opstellen van de standaardkurve.

De standaardkurve werd vooreerst met 1 cm kuvetten opgesteld. De destillaties werden vijfmaal uitgevoerd en voor iedere destillatie werd de extinctie tweemaal bepaald. De bekomen gegevens zijn in tabel 4 opgenomen.

Tabel 4 - Gemiddelde extinctiewaarden in functie van de fenolconcentraties.

Concentratie fenol	3	6	12	18	21	24
E gem. 1 cm kuvet 10 metingen	0,076	0,155	0,305	0,448	0,531	0,607

De vergelijking van de rechte werd berekend met de methode van de kleinste kwadraten en geeft

$$y = 0,02512 x + 0,00180$$

Het testen naar de lineariteit gebeurde met behulp van de variantie-analyse (15).

Uit de variantieanalyse van de kwadraatsom van de afwijkingen enerzijds en de variantieanalyse van de spreidingsbreedte anderzijds kon worden besloten, dat de standaardkurve met een rechte door de oorsprong mag worden gelijk gesteld en dat de afwijkingen tussen de experimentele punten en de berekende rechte aanvaardbaar zijn binnen de grenzen van de proeffouten.

Uit fenolbepalingen op vis bleek dat de concentratie in het destillaat schommelt tussen 1 en 3 ppm.

Aflezings op de standaardkurve, opgesteld met 1 cm kuvetten, zou leiden tot grote fouten en onbetrouwbare gegevens. Er treedt dan immers een fotometrische fout op van 4 %. Om deze reden werden 4 cm kuvetten gebruikt ; zij laten toe een standaardkurve op te stellen in een gebied dat meer voor fenolbepalingen op vis geschikt is (tabel 5).

Tabel 5 - Gemiddelde extinctiewaarden in functie van de concentratie aan fenol.

Concentratie fenol	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm
E gem. 4 cm kuvet 10 metingen	0,107	0,215	0,323	0,428	0,542

Met de methode van de kleinste kwadraten werd de rechte berekend, namelijk :

$$y = 0,1083 x - 0,0021$$

De specifieke extinctiecoëfficiënt heeft hier een waarde van 0,0271/ppm cm. Deze waarde is 8 % hoger dan bij de standaardkurve met 1 cm kuvetten (0,0251/ppm cm).

De reden hiervoor dient niet alleen gezocht te worden bij concentratie- of fotospectrometrische fouten ($\pm 1\%$), maar vooral in het hoger rendement van de destillatie bij kleinere concentraties.

B. De Folin & Ciocalteu methode.

a. Invloed van de veranderlijken op de lichtabsorptie.

1) Stabiliteit van de absorptie.

De stabiliteit van de absorptie van zuiver fenol en voor een visdestillaat werd getest. De golflengte waarbij de metingen worden verricht bedroeg 725 nm.

Na een uur is er een teruggang in de absorptie van de fenoloplossingen van ongeveer 20 %, terwijl de teruggang bij het visdestillaat 15 % bedraagt. Wanneer nog langer wordt gewacht, neemt de absorptie steeds af en na 2 uur treedt er troebeling op, waardoor de extinctie dan zeer vlug gaat stijgen. Om de fouten door teruggang in de absorptie zo klein mogelijk te houden, moeten de metingen onmiddellijk na toevoegen van het reagens worden verricht.

2) Invloed van de hoeveelheden reagens op de absorptie.

Bij het opstellen van de standaardkurve werd met concentraties hoger dan 3 ppm fenol, een afwijking aan de wet van Lambert-Beer bekomen.

Om hieraan te verhelpen, werden de factoren, die op de reactie van het Folin & Ciocalteu-reagens invloed hebben, met fenol onderzocht.

b. Invloed van de verhouding NaOH/reagens.

Van een oplossing van 6 ppm fenol werden telkens 5 ml in een proefbuis gepipeteerd. Verschillende hoeveelheden NaOH werden toegevoegd, terwijl de hoeveelheid reagens gelijk bleef (0,2 ml).

Met de nodige hoeveelheden water werd de fenolconcentratie in ieder proefbuisje gelijk gehouden. De resultaten van de metingen zijn in tabel 6 vervat.

Tabel 6 - Invloed van de hoeveelheid NaOH op de extinctie.

NaOH in ml	0,1	0,2	0,4	0,8	2
pH	3,5	8,5	12,8	13	13,5
E _{gem}	0,088	0,225	0,431	0,269	0,221

Alleen bij 0,4 ml NaOH heeft de oplossing haar normale kleur en bereikt de absorptie een maximum (bij 725 nm).

Uit de tabel blijkt duidelijk dat de reactie pH gevoelig is en dat de optimale pH 12,8 bedraagt. De invloed van de hoeveelheid reagens bij constante hoeveelheid NaOH werd eveneens onderzocht, doch de resultaten die werden bekomen, waren analoog met deze in vorige proef.

Er werd eveneens een maximum absorptie bij 0,2 ml reagens en bij pH 12,8 opgetekend.

Voor andere gevallen werd een vertroebeling en verkleuring in de kuvetten waargenomen.

Uit beide proeven bleek dat de verhouding van de reagentia (0,2 ml reagens / 0,4 ml NaOH) behouden moet blijven.

c. Invloed van de overmaat reagens.

Om het evenwicht van de reactie niet te verstoren, werd de hoeveelheid NaOH als de hoeveelheid reagens gewijzigd (verhouding 2/1).

De resultaten van de metingen zijn in tabel 7 opgenomen.

Tabel 7 - Invloed van de hoeveelheid reagens op de extinctie.

Reagens (ml)	NaOH (ml)	Egem.
0,05	0,1	0,335
0,10	0,2	0,418
0,20	0,4	0,503
0,25	0,5	0,564
0,30	0,6	0,572
0,40	0,8	0,628
0,50	1,0	0,623

Bij hoeveelheden NaOH die > 1 ml treedt er onmiddellijk vertroebeling op, zodat geen waarde van de extinctie kan worden genoteerd.

Vanaf 0,4 ml reagens en 0,8 ml NaOH wordt de absorptie maximaal. Bij het opstellen van de standaardkurve bleek dat deze waarden het best voldoen, daar voor concentraties die groter zijn dan 3 ppm een rechte wordt verkregen (figuur 1).

d. Opstellen van de standaardkurve.

De opstelling van de standaardkurve gebeurde op dezelfde wijze als voor de 4-aminoantipyrinemethode.

De vergelijking van de rechte werd berekend met de methode van de kleinste kwadraten en geeft :

$$y = 0,02512 x + 0,0018$$

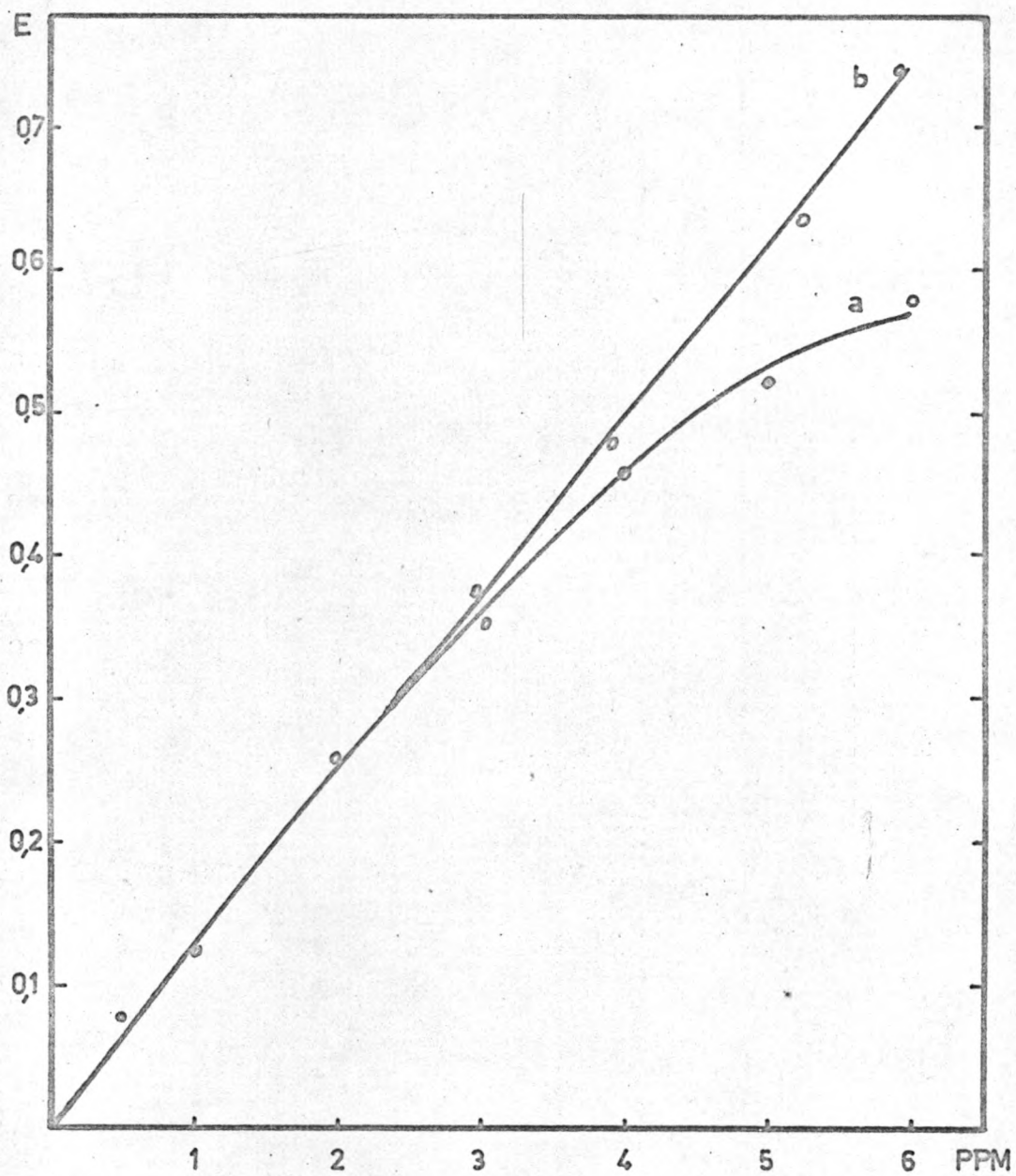


Fig. 1.

(a) Standaardkurve zonder destillatie voor de bepaling van het totaal fenol waarbij 0,4 ml NaOH 2N en 0,2 ml Folinreagens werd gebruikt.

(b) Standaardkurve waarbij het hoeveelheid reagens werd gewijzigd: nl 0,8 ml NaOH 2N en 0,4 ml Folinreagens

4. Fenolbepalingen op gerookte vis.

a. Algemene werkwijze.

Twintig gram gemalen visvlees of 3 gram huid wordt in het destillatievat gebracht.

Na toevoegen van 100 ml water, wordt de pH door aanzuren met HCl op één gesteld. Daarna wordt de oplossing gestoomdestilleerd, waarvan 150 ml destillaat wordt opgevangen.

Voor de bepaling van de p-ongesubstitueerde fenolen wordt aan 1 ml destillaat 1 ml 0,2 NaOH, 2 ml boraatbuffer, 0,05 ml 4-aminoantypirine-reagens 3 % en 0,2 ml $K_3Fe(CN)_6$ 10 % toegevoegd.

Na een half uur wordt de extinctie bij 508 nm gemeten. Voor het visvlees moet de bekomen extinctie met 69,252 en voor de huid met 461,68 worden vermenigvuldigd. Hierdoor wordt de concentratie van deze fenolen als mgr C_6H_5OH per kg visvlees of vishuid bekomen.

Bij de bepaling van het totaal fenol wordt aan 5 ml destillaat 0,4 ml fenolreagens en 0,8 ml NaOH 2N toegevoegd. De extinctie wordt onmiddellijk bij 725 nm gemeten. Door de extinctie met de faktor 81,037 voor het visvlees en 540,25 voor de vishuid te vermenigvuldigen, wordt de concentratie van deze fenolen als mgr C_6H_5OH per kg visvlees resp. vishuid verkregen.

Door aftrekking van het gehalte p-ongesubstitueerde fenolen van het totaal aantal fenolen wordt dan het gehalte aan p-gesubstitueerde fenolen in dezelfde concentratieeenheid bekomen.

b) Berekening van de standaardafwijking en betrouwbaarheidsgrenzen uitgaande van analyses op gestoomde paling.

Uitgaande van analyses op gestoomde paling (tabel 8), werd een representatieve waarde voor de standaardafwijking van de p-ongesubstitueerde (so) en het totaal fenol (st) bepaald. De standaardafwijking voor de p-gesubstitueerde fenolen die we bekomen door aftrekking, wordt gegeven door :

$$sg = So^2 + St^2$$

Tabel 8 - Gehalten aan totaal fenol en para-ongesubstitueerde fenolen bij gerookte doornhaai.

Proef	Totaal aantal fenol	Para-ongesubstitueerde fenolen	Para-gesubstitueerde fenolen
1	29,8	9,8	20,0
2	27,1	8,7	18,4
3	28,0	9,1	18,9
4	27,7	9,1	18,6
5	27,9	9,3	18,6
6	26,7	8,6	18,1
7	28,0	9,3	18,7
8	27,7	9,3	18,4
9	29,4	9,5	19,9
10	27,4	8,7	18,7

Er werden 10 metingen verricht waarvan elke bepaling op vier waarnemingen steunt.

De standaardafwijkingen zijn achtereenvolgens : $St = 0,96$; $So = 0,38$ en $Sg = 1,03$.

Procentueel uitgedrukt ten opzichte van het gemiddelde wordt dit : $St \% = 3,4 \%$; $So \% = 4,2 \%$ en $Sg \% = 5,5 \%$.

De 95 % en 99 % betrouwbaarheidsgrenzen voor elke meting worden dan :

- p-ongesubstitueerde fenolen :

$$95 \% \quad 4,2 \times 3,2 = 13 \%$$

$$99 \% \quad 4,2 \times 5,8 = 24 \%$$

- p-gesubstitueerde fenolen :

$$95 \% \quad 5,5 \times 3,2 = 18 \%$$

$$99 \% \quad 5,5 \times 5,8 = 32 \%$$

- totale fenolgehalte :

$$95 \% \quad 3,4 \times 3,2 = 11 \%$$

$$99 \% \quad 3,4 \times 5,8 = 20 \%$$

De berekende betrouwbaarheidsgrenzen houden geen rekening met de fouten op de extinctiecoëfficiënt, die maximum 1 % bedraagt, en met de fout op het bereiden van de fenolstandaard, die maximum 2 % belooft. Alleen de fouten die bij de analyse van de monsters worden gemaakt, worden in rekening gebracht. Bij de fenolbepalingen is het niet zozeer te doen om absolute gegevens, doch eerder om waarden die onderling vergeleken kunnen worden. De fout op het bereiden van de fenolstandaard heeft hierop geen invloed en is bovendien nog klein ten opzichte van de fout op de bepaling zelf.

Besluit.

Twee methoden, namelijk de 4-aminoantipyrine- en de Folin en Ciocalteu methode voor de bepaling van de paraongesubstitueerde fenolen en het totaal fenol in gerookte vis via destillatie werden uitgetest.

De pH in het destillatievat werd op pH = 1 gesteld en de hoeveelheid destillaat op 150 ml gebracht.

Voor de bepaling van de paraangesubstitueerde fenolen in gerookte vis bleken de 4 cm kuvetten beter geschikt te zijn. Als gevolg van de stabiliteit van de absorptie dienen de metingen na 30 minuten te worden uitgevoerd. Bij de Folin methode moeten de metingen echter onmiddellijk na toevoegen van het reagens worden verricht, ten einde de teruggang in de absorptie zo klein mogelijk te houden.

Bij de opstelling van de standaardkurve voor de dosering van het totaal fenol in gerookte vis vertoonde de Folin & Ciocalteumethode, voor concentraties die groter waren dan 3 ppm fenol, ernstige afwijkingen op de wet van Lambert - Beer.

Om hieraan te verhelpen werden de hoeveelheden NaOH/reagens gewijzigd (0,4 ml reagens/0,8 ml NaOH).

Beide methodes geven informatie over de "graad van gerookt zijn" van vis, alhoewel bij het uittesten bleek dat de 4-aminoantipyrinemethode de voorkeur geniet, omwille van de specificiteit van het reagens, de stabiliteit van de kleurreactie en de reproduceerbaarheid van de reactie.

Wanneer echter het chemisch aspekt van het rookproces en meer speciaal de functie van de fenolen worden bestudeerd, kunnen beide methoden hiertoe nuttig zijn.

Bibliografie.

- (1) Ashworth, M.R.F., Titrimetric organic analysis, Chemical analysis, vol. 15 (1964).
- (2) Heyrovsky, J., Zuman, P., Einführung in die praktische polarografie, Verlag Technik Berlin, 1959, blz. 168.
- (3) Dolezal, B., Prumysl Potravin 9 (1958) 609-611.
- (4) Kurko, W.I., Mjasnaja Industria SSSR 30 (1)(1959) 17-18.

- (5) Simon, S., A.A. Rypinski en F.W. Tauber, Food technology 20 (1966) 1494-1498.
- (6) Ziemba, Z., J. Nutr, Dietet (1967) 122-129.
- (7) Spanyol, P., E. Kevei en M. Kiszal, Z. Lebensmittel - Unters. u. Forsch. 112 (1960) 353-364.
- (8) Spanyol, P. en E. Kevei, Z. Lebensmittel - Unters. u. Forsch. 112 (1960) 471-480.
- (9) Foster, W.W. en T.H. Simpson, J. Sci. Food Agric. 12 (1961) 363-374.
- (10) Husaini, S.A. en Cooper, G.E., Food technology 11 (1957), p. 499-502.
- (11) Rusz., J. Technologija Mesa 1962, sp. ed. 10-15.
- (12) Tilgner, D.J.K. Miler, J. Prominski en G. Darnawska - Technologija Mesa 1962 sp. ed. 18-21.
- (13) Folin, O. en Ciocalteu, V., J. Biol. Chem. 73 (1927) 627-650.
- (14) Römpp, H., Chemie Lexikon, 1962, e.a.
- (15) Youden, W.J., Statistical methods for chemists, 1959.
- (16) Antonacopoulos, N., Verbesserte Apparatuur zur quantitativen. Destillation Wasserdampfvlüchtiger Stoffe z. Lebensmittel, Unsters. u. Forsch. 133, 113 (1960).
- (17) Jonckheere, P. en Vanhoutte, A., Beginselen der wiskundige statistiek, 1966, p. 35, 333.