

EERSTE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 13 november 1979

tot vaststelling van communautaire analysemethoden voor de controle van bepaalde voor menselijke voeding bestemde geheel of gedeeltelijk gedehydrerde verduurzaamde melk

(79/1067/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE
GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 76/118/EEG van de Raad van 18 december 1975 houdende onderlinge aanpassing van de wetgevingen der Lid-Staten betreffende bepaalde voor menselijke voeding bestemde geheel of gedeeltelijk gedehydrerde verduurzaamde melk ⁽¹⁾, inzonderheid op artikel 11,

Overwegende dat in artikel 11 van Richtlijn 76/118/EEG is bepaald dat de samenstelling van bepaalde geheel of gedeeltelijk gedehydrerde verduurzaamde melk moet worden gecontroleerd aan de hand van communautaire analysemethoden;

Overwegende dat het wenselijk is een eerste serie methoden waarvoor reeds studies werden voltooid, goed te keuren;

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor levensmiddelen.

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De Lid-Staten treffen alle nodige maatregelen opdat de analyses die noodzakelijk zijn voor de controle van de in bijlage I aangegeven criteria worden verricht in overeenstemming met de in bijlage II omschreven methoden.

Artikel 2

Indien voor een afzonderlijke bepaling alternatieve methoden worden gespecificeerd mag het monster volgens een van beide methoden worden onderzocht, waarbij evenwel in het in bijlage II bedoelde analyserapport de toegepaste methode moet worden vermeld.

Artikel 3

De Lid-Staten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om deze richtlijn na verloop van 18 maanden na haar kennisgeving te volgen; zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Artikel 4

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 13 november 1979.

Voor de Commissie

ÉTIENNE DAVIGNON

Lid van de Commissie⁽¹⁾ PB nr. L 24 van 30. 1. 1976, blz. 49.

BIJLAGE I**TOEPASSINGSGEBIEDEN VAN DE COMMUNAUTAIRE ANALYSEMETHODEN VOOR DE RICHTLIJN INZAKE BEPAALDE GEHEEL OF GEDEELTELIJK GEDEHYDREERDE VERDUURZAAMDE MELK**

- I. Algemene inrichtingen**
- II. Bepaling van het gehalte aan droge stof van:**
- geëvaporeerde melk met hoog vetgehalte (toepassing van methode 1, bijlage II),
 - geëvaporeerde volle melk (toepassing van methode 1, bijlage II),
 - geëvaporeerde gedeeltelijk afgeroomde melk (toepassing van methode 1, bijlage II),
 - geëvaporeerde magere melk (toepassing van methode 1, bijlage II),
 - gecondenseerde volle melk met suiker (toepassing van methode 1, bijlage II),
 - gecondenseerde gedeeltelijk afgeroomde melk met suiker (toepassing van methode 1, bijlage II),
 - gecondenseerde magere melk met suiker (toepassing van methode 1, bijlage II).
- III. Bepaling van het watergehalte van:**
- vette-melkpoeder (toepassing van methode 2, bijlage II),
 - volle-melkpoeder (toepassing van methode 2, bijlage II),
 - gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder (toepassing van methode 2, bijlage II),
 - magere-melkpoeder (toepassing van methode 2, bijlage II).
- IV. Bepaling van het vetgehalte van:**
- geëvaporeerde melk met hoog vetgehalte (toepassing van methode 3, bijlage II),
 - geëvaporeerde volle melk (toepassing van methode 3, bijlage II),
 - geëvaporeerde gedeeltelijk afgeroomde melk (toepassing van methode 3, bijlage II),
 - geëvaporeerde magere melk (toepassing van methode 3, bijlage II),
 - gecondenseerde volle melk met suiker (toepassing van methode 3, bijlage II),
 - gecondenseerde gedeeltelijk afgeroomde melk met suiker (toepassing van methode 3, bijlage II),
 - gecondenseerde magere melk met suiker (toepassing van methode 3, bijlage II),
 - vette-melkpoeder (toepassing van methode 4, bijlage II),
 - volle-melkpoeder (toepassing van methode 4, bijlage II),
 - gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder (toepassing van methode 4, bijlage II),
 - magere-melkpoeder (toepassing van methode 4, bijlage II).
- V. Bepaling van het sucrosegehalte van:**
- gecondenseerde volle melk met suiker (toepassing van methode 5, bijlage II),
 - gecondenseerde gedeeltelijk afgeroomde melk met suiker (toepassing van methode 5, bijlage II),
 - gecondenseerde magere melk met suiker (toepassing van methode 5, bijlage II).
- VI. Bepaling van het gehalte aan melkzuur en lactaten van:**
- vette-melkpoeder (toepassing van methode 6, bijlage II),
 - volle-melkpoeder (toepassing van methode 6, bijlage II),
 - gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder (toepassing van methode 6, bijlage II),
 - magere-melkpoeder (toepassing van methode 6, bijlage II).
- VII. Bepaling van de fosfatasewerking bij:**
- vette-melkpoeder (toepassing van methode 7 of methode 8, bijlage II),
 - volle-melkpoeder (toepassing van methode 7 of methode 8, bijlage II),
 - gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder (toepassing van methode 7 of methode 8, bijlage II),
 - magere-melkpoeder (toepassing van methode 7 of methode 8, bijlage II).

BIJLAGE II**ANALYSEMETHODEN VOOR BEPAALDE VOOR MENSELIJKE VOEDING BESTEMDE
GEHEEL OF GEDEELTELIJK GEDEHYDREERDE MELKPRODUKTEN****ALGEMENE INLICHTINGEN****1. VOORBEREIDING VAN HET MONSTER VOOR CHEMISCHE ANALYSE**

- 1.1. Geëvaporeerde melk met hoog vetgehalte
Geëvaporeerde volle melk
Geëvaporeerde gedeeltelijk afgeroomde melk
Geëvaporeerde magere melk

Schud en kantel het gesloten blik. Open het blik en giet de melk langzaam over in een hermetisch sluitende monsterpot. Meng door herhaald overgieten. Vet en melk die eventueel nog aan de wanden en de uiteinden van het blik kleven, moeten met het monster worden vermengd. Sluit de monsterpot. Indien de inhoud niet homogeen is, moet de monsterpot in een waterbad worden verwarmd bij 40 °C. Schud krachtig om de vijftien minuten. Neem de monsterpot na twee uur uit het waterbad en laat tot kamertemperatuur afkoelen. Neem het deksel weg en meng de inhoud van de recipiënt goed door elkaar met een lepel of een spatel (indien het vet zich uit het mengsel heeft losgemaakt, zal het monster niet worden onderzocht). Op een koele plaats bewaren.

- 1.2. Gecondenseerde volle melk met suiker
Gecondenseerde gedeeltelijk afgeroomde melk met suiker
Gecondenseerde magere melk met suiker

Blik: Verwarm het gesloten blik in een waterbad bij 30 tot 40 °C gedurende ongeveer dertig minuten. Open het blik en meng de inhoud goed met een spatel of een lepel, door het maken van opwaartse, neerwaartse en cirkelvormige bewegingen, ten einde een homogeen mengsel van de bovenste en onderste lagen met de verdere inhoud te verkrijgen. Melk die aan de wanden en het uiteinde van het blik kleeft, moet in het monster worden opgenomen. Giet de inhoud zo volledig mogelijk over in een monsterpot. Sluit de monsterpot met een goed sluitend deksel en bewaar deze op een koele plaats.

Tube: Knip het uiteinde van de tube af en giet de inhoud over in een monsterpot, die van een luchtdicht deksel is voorzien. Knip de tube vervolgens in de lengte open. Schraap alle materiaal, dat nog aan de binnenkant van de tube kleeft, los en meng het zorgvuldig met de rest van de inhoud. Sluit de pot met een goed (hermetisch), sluitend deksel en bewaar deze.

- 1.3. Vette-melkpoeder
Volle-melkpoeder
Gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder
Magere-melkpoeder

Breng het melkpoeder over in een schoon en droog vat (met hermetisch sluitend deksel) waarvan de inhoud ongeveer tweemaal zo groot is als het volume van het poeder. Sluit het vat dadelijk en meng het melkpoeder goed door herhaald schudden en omkeren van het vat. Bij de voorbereiding van het monster moet blootstelling van het melkpoeder aan de lucht zoveel mogelijk worden vermeden, ten einde vochtopname tot een minimum te beperken.

2. REAGENTIA**2.1. Water**

2.1.1. Onder water om op te lossen, te verdunnen of uit te wassen wordt steeds gedestilleerd water of gedemineraliseerd water met een ten minste gelijkwaardige zuiverheid verstaan.

2.1.2. Onder „oplossen“ of „verdunnen“ zonder verdere vermelding wordt steeds „oplossen in water“ of „verdunnen met water“ verstaan.

2.2. Chemicaliën

Tenzij anders vermeld, moeten alle gebruikte chemicaliën van analysekwaliteit (p. a.) zijn.

3. UITRUSTING**3.1. Lijsten met de uitrusting**

In de lijsten met de uitrusting is alleen apparatuur opgenomen die voor een speciaal doel wordt gebruikt, alsmede apparatuur met een speciale kwalificatie.

3.2. Analytische balans

Onder analytische balans wordt verstaan een balans waarmede tot ten minste 0,1 mg kan worden gewogen.

4. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**4.1. Berekening van het percentage**

Tenzij anders vermeld worden de resultaten berekend in gewichtsmassapercenten van het monster zoals dit door het laboratorium is ontvangen.

4.2. Aantal significante cijfers

Het resultaat mag niet meer significante cijfers bevatten dan door de nauwkeurigheid van de toegepaste analysemethode is gerechtvaardigd.

5. ANALYSERAPPORT

In het analyserapport moeten de toegepaste analysemethode en de verkregen resultaten worden vermeld. Voorts moeten alle details van de werkwijze worden vermeld die niet in de analysemethode zijn genoemd of die facultatief zijn, alsmede alle omstandigheden die van invloed kunnen zijn geweest op de verkregen resultaten.

Het analyserapport moet alle informatie bevatten die nodig is voor een volledige identificatie van het monster.

**METHODE 1: BEPALING VAN HET GEHALTE AAN DROGE STOF
(Droogstoof 99 °C)****1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED**

Aan de hand van deze methode wordt het gehalte aan droge stof bepaald van:

- geëvaporeerde melk met hoog vetgehalte,
- geëvaporeerde volle melk,
- geëvaporeerde gedeeltelijk afgeroomde melk,
- geëvaporeerde magere melk,
- gecondenseerde volle melk met suiker,
- gecondenseerde gedeeltelijk afgeroomde melk met suiker,
- gecondenseerde magere melk met suiker.

2. DEFINITIE

Gehalte aan droge stof van gecondenseerde melk: het volgens de aangegeven methode bepaalde gehalte aan droge stof.

3. PRINCIPE

Een berekende hoeveelheid van het monster wordt verdund met water, vermengd met zand en gedroogd bij een temperatuur van 99 ± 1 °C. Het nettogewicht na de droging is het gewicht van de droge stof, het gehalte wordt berekend als gewichts(massa)percenten van het monster.

4. REAGENTIA

Met zoutzuur behandeld kwartszand of zeezand (korrelgrootte: 0,18 tot 0,50 mm), dat een zeef van 500 micron passeert en wordt tegengehouden door een zeef van 180 micron. Het moet aan de volgende controleproef voldoen:

Verwarm ongeveer 25 g zand gedurende twee uur in de droogoven (5.3) en weeg op de wijze die is beschreven in 6.1 tot en met 6.3. Voeg 5 ml water toe, verwarm opnieuw in de oven gedurende twee uur, laat afkoelen en weeg. Het verschil tussen beide massa's mag niet meer dan 0,5 mg bedragen.

Behandel het zand indien nodig met een zoutzuuroplossing van 25 % gedurende drie dagen, onder af en toe roeren. Was met water totdat de zure reactie verdwenen of het waswater chloridevrij is. Droog bij 160 °C en onderzoek opnieuw zoals boven.

5. APPARATUUR

5.1. Analytische balans

5.2. Metalen schaaltes, bij voorkeur van nikkel, aluminium of roestvrij staal. De schaaltes moeten zijn voorzien van een goed passend deksel, dat echter gemakkelijk af te nemen is. Geschikte afmetingen zijn: diameter 60 tot 80 mm en diepte ongeveer 25 mm.

5.3. Droogstoof (atmosferische druk), met goede ventilatie en met thermostaat (geregeld op 99 ± 1 °C). De temperatuur moet in de hele oven uniform zijn.

5.4. Exsiccator met versgedroogd silicagel met vochtigheidsindicator, of een gelijkwaardig droogmiddel.

5.5. Glazen staafjes, aan één uiteinde afgeplat en met een zodanige lengte dat zij in de metalen schaaltes (5.2) passen.

5.6. Kokend waterbad

6. WERKWIJZE

6.1. Breng ongeveer 25 g zand (4) en een kort glazen staafje (5.5) in het schaalte (5.2).

6.2. Plaats het schaalte met inhoud en het afgenomen deksel in de stoof (5.3) en verwarm gedurende twee uur.

6.3. Leg het deksel weer op het schaalte en plaats het schaalte in de exsiccator (5.4). Laat afkoelen tot kamertemperatuur en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig (M_0).

6.4. Laat het zand naar één zijde van het scheef gehouden schaalte lopen. Breng in de open ruimte ongeveer 1,5 g van het monster indien dit uit gecondenseerde volle melk met suiker bestaat en 3,0 g indien het bestaat uit geëvaporeerde volle melk. Leg het deksel weer op het schaalte en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig (M_1).

6.5. Neem het deksel weg, voeg 5 ml water toe en vermeng de vloeistoffen en vervolgens het zand en het vloeibare deel met behulp van het glazen staafje. Laat het staafje in het mengsel liggen.

6.6. Plaats het schaalte op het kokend waterbad (5.6) tot het water is verdampt; doorgaans zijn hier twintig minuten mee gemoeid. Roer het mengsel van tijd tot tijd met het staafje, ten einde de massa luchtig te houden zodat zij bij het drogen geen koek gaat vormen. Laat het staafje in het schaalte liggen.

6.7. Plaats schaalte en deksel in de oven gedurende ongeveer anderhalf uur.

6.8. Leg het deksel weer op het schaalte, breng het schaalte in de exsiccator, laat afkoelen tot kamertemperatuur en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig.

6.9. Plaats het schaalte met het deksel erop opnieuw in de oven, neem het deksel af en verwarm schaalte en deksel nog gedurende één uur.

6.10. Herhaal behandeling 6.8.

6.11. Herhaal de behandelingen 6.9 en 6.10 totdat het verschil in massa tussen twee opeenvolgende wegingen minder bedraagt dan 0,5 mg of totdat de massa toeneemt. Bij toename van de massa moet het laagste verkregen gewicht bij de berekening (7.1) worden gebruikt. Stel dat dit eindgewicht M_2 is.

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**7.1. Berekeningswijze**

Het gehalte aan droge stof, berekend in de gewichtspersenten van het monster, wordt verkregen aan de hand van de volgende formule:

$$\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

Hierin is:

M_0 = massa in g van schaalte, deksel en zand na behandeling 6.3;

M_1 = massa in g van schaalte, deksel, zand en monster na behandeling 6.4;

M_2 = massa in g van schaalte, deksel, zand en gedroogd monster na behandeling 6.11.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen in hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 0,2 g droge stof per 100 g produkt.

8. BEREKENING VAN HET TOTAALGEHALTE AAN MELKDROGESTOF EN HET GEHALTE AAN VETVRIJE MELKDROGESTOF**8.1. Het totaalgehalte aan melkdrogestof van gecondenseerde volle melk met suiker wordt als volgt verkregen:**

totaalgehalte aan droge stof (verkregen volgens methode 1, bijlage II) — sucrose (verkregen volgens methode 5, bijlage II).

8.2. Het gehalte aan vetvrije melkdrogestof van gecondenseerde volle melk met suiker wordt als volgt verkregen:

totaalgehalte aan droge stof (verkregen volgens methode 1, bijlage II) — sucrosegehalte (verkregen volgens methode 5, bijlage II) en vetgehalte (verkregen volgens methode 3, bijlage II).

8.3. Het gehalte aan vetvrije melkdrogestof van geëvaporeerde volle melk wordt als volgt verkregen:

totaalgehalte aan droge stof (verkregen volgens methode 1, bijlage II) — vetgehalte (verkregen volgens methode 3, bijlage II).

**METHODE 2: BEPALING VAN HET WATERGEHALTE
(Droogstoof 102 °C)****1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED**

Aan de hand van deze methode wordt het watergehalte bepaald van:

- vette-melkpoeder.
- volle-melkpoeder,
- gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder,
- magere-melkpoeder.

2. DEFINITIE

Watergehalte: het volgens de aangegeven methode bepaalde gewichtsverlies na droging.

3. PRINCIPE

Het restgewicht van een gewogen hoeveelheid monster wordt bepaald na droging tot constant gewicht bij atmosferische druk in een oven bij 102 °C ± 1 °C. Het gewichtsverlies wordt berekend als massaprocenten van het monster.

4. APPARATUUR

- 4.1. Analytische balans
- 4.2. Schaaltjes, bij voorkeur van glas, nikkel, aluminium of roestvrij staal of glas. De schaaltjes moeten zijn voorzien van een goed passend deksel, dat echter gemakkelijk af te nemen is. Geschikte afmetingen zijn: diameter 60 tot 80 mm en diepte ongeveer 25 mm.
- 4.3. Droogstoof (atmosferische druk), met goede ventilatie en met thermostaat (geregeld op 102 ± 1 °C). De temperatuur moet in de hele oven uniform zijn.
- 4.4. Exsiccator met versgedroogd silicagel en met een vochtigheidsindicator, of een gelijkwaardig droogmiddel.

5. WERKWIJZE

- 5.1. Neem het deksel van het schaaltje (4.2) en plaats schaaltje en deksel in de oven (4.3); verwarm gedurende ongeveer één uur.
- 5.2. Leg het deksel weer op het schaaltje en plaats het schaaltje met het deksel erop in de exsiccator (4.4). Laat het tot kamertemperatuur afkoelen en weeg het tot op 0,1 mg nauwkeurig (M_0).
- 5.3. Breng ongeveer 2 g melkpoedermonster in het schaaltje, leg het deksel op het schaaltje en weeg het schaaltje met het deksel erop zo snel mogelijk tot op 0,1 mg nauwkeurig (M_1).
- 5.4. Neem het deksel van het schaaltje weg en plaats schaaltje en deksel in de oven gedurende twee uur.
- 5.5. Leg het deksel weer op het schaaltje en plaats het geheel in de exsiccator, laat het tot kamertemperatuur afkoelen en weeg het zo snel mogelijk tot op 0,1 mg nauwkeurig.
- 5.6. Neem het deksel van het schaaltje weg en verwarm schaaltje en deksel gedurende één uur in de oven.
- 5.7. Herhaal behandeling 5.5.
- 5.8. Herhaal de behandelingen 5.5. en 5.6 totdat het verschil in massa tussen twee opeenvolgende wegingen niet meer bedraagt dan 0,5 mg of de massa toeneemt. Bij toename van de massa moet het laagste verkregen gewicht bij de berekening (6.1) worden genomen. Stel dat dit eindgewicht M_2 is.

6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**6.1. Berekeningswijze**

Het massaverlies na droging van het monster, uitgedrukt in gewichtsprocenten, wordt verkregen aan de hand van de volgende formule:

$$\frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

Hierin is:

- M_0 = massa in g van schaaltje en deksel na behandeling 5.2;
- M_1 = massa in g van schaaltje, deksel en monster na behandeling 5.3;
- M_2 = massa in g van schaaltje, deksel en droogrest na behandeling 5.5.

6.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen in hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 0,1 g water per 100 g produkt.

METHODE 3: BEPALING VAN HET VETGEHALTE (METHODE VOLGENS RÖSE-GOTTLIEB)**1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED**

Aan de hand van deze methode wordt het vetgehalte bepaald van:

- geëvaporeerde melk met hoog vetgehalte,
- geëvaporeerde volle melk,
- geëvaporeerde gedeeltelijk afgeroomde melk,
- geëvaporeerde magere melk,
- gecondenseerde volle melk met suiker,
- gecondenseerde gedeeltelijk afgeroomde melk met suiker,
- gecondenseerde magere melk met suiker.

2. DEFINITIE

Vetgehalte van gecondenseerde melk; het volgens de aangegeven methode bepaalde vetgehalte.

3. PRINCIPE

Het vetgehalte wordt bepaald door extractie van het vet uit een ammoniak- en alcoholhoudende oplossing van het monster met diëthylether en petroleumether, gevolgd door verdampen van de oplosmiddelen en weging van het residu, alsmede berekening in gewichtspercenten van het monster, overeenkomstig het principe van Röse-Gottlieb.

4. REAGENTIA

Alle reagentia moeten voldoen aan de in de blancobepaling (6.1) aangegeven eisen. Indien nodig moeten de oplosmiddelen opnieuw gedestilleerd worden in aanwezigheid van ongeveer 1 g bortervet per 100 ml oplosmiddel.

- 4.1. Ammoniakoplossing, ongeveer 25 % (m/m) NH_3 (dichtheid bij 20 °C ongeveer 0,91 g/ml) of een sterkere oplossing met bekende concentratie.
- 4.2. Ethanol, 96 ± 2 % (v/v) of, indien niet beschikbaar, met methanol, ethylmethylketon of lichte petroleum gedenatureerde ethanol.
- 4.3. Diëthylether, peroxydevrij

Opmerking 1:

Voeg voor het onderzoek op peroxyden 1 ml vers bereide kaliumjodideoplossing van 10 % toe aan 10 ml ether in een kleine maatcilinder met glazen stop, die van te voren met ether werd gespoeld. Schud en laat één minuut staan. Geen van beide lagen mag een gele kleur vertonen.

Opmerking 2:

Diëthylether kan peroxydevrij worden gehouden door toevoeging van vochtig zinkfolie dat gedurende één minuut volledig werd ondergedompeld in een verdunde aangezuurde kopersulfaatoplossing en vervolgens gewassen met water. Gebruik ongeveer 8 000 mm² zinkfolie per liter; knip deze in stroken die lang genoeg zijn om ten minste tot de helft van de hoogte van het recipient te reiken.

- 4.4. Petroleumether, met elk kooktraject tussen 30 en 60 °C.
- 4.5. Mengsel van oplosmiddelen, kort voor het gebruik bereid door menging van gelijke volumes diëthylether (4.3) en petroleumether (4.4) (waar het gemengde oplosmiddel is voorgeschreven, mag het door diëthylether of door petroleumether alleen worden vervangen).

5. APPARATUUR

- 5.1. Analytische balans
- 5.2. Geschikte extractiebuizen of -kolven, voorzien van geslepen glazen stoppen, kurken of andere sluitingen die niet kunnen worden aangetast door de gebruikte oplosmiddelen.
- 5.3. 150 tot 250 ml-kolven dunwandig met platte bodem.

- 5.4. Droogstoof (atmosferische druk), met goede ventilatie en met thermostaat (ingesteld op 102 ± 1 °C).
- 5.5. Kooksteentjes, vetvrij, niet poreus, niet bros bij gebruik, b. v. glaskralen of stukjes siliciumcarbi-
de (het gebruik van kooksteentjes is facultatief, zie 6.2.1).
- 5.6. Hevel die past op de buizen
- 5.7. Centrifuge

6. WERKWIJZE

6.1. Blancoproef

Voer gelijktijdig met de bepaling van het vetgehalte van het monster een blancobepaling uit met 10 ml water, waarbij hetzelfde type extractieapparatuur en dezelfde reagentia in dezelfde hoeveelheden worden gebruikt en dezelfde werkwijze wordt gevolgd die hierna is beschreven, met uitzondering van alinea 6.2.2. Indien de blanco meer dan 0,5 mg bedraagt, moeten de reagentia worden gecontroleerd en moet(en) het (de) onzuiver(e) reagens (reagentia) worden gezuiverd of vervangen.

6.2. Bepaling

- 6.2.1. Droog een kolf (5.3) (indien nodig samen met enkele kooksteentjes (5.5) om zacht koken gedurende de latere verwijdering van de oplosmiddelen te bevorderen) in de oven (5.4) gedurende een half uur tot één uur. Laat de kolf afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer en weeg de afgekoelde kolf tot op 0,1 mg nauwkeurig.
- 6.2.2. Roer het voorbereide monster om en weeg onmiddellijk daarop 2 tot 2,5 g van het monster gecondenseerde of 4 tot 5 g van het monster geëvaporeerde melk tot op 1 mg nauwkeurig, rechtstreeks of door een verschilweging, suiker in het extractieapparaat (5.2). Voeg water toe tot 10,5 ml en zwenk zacht onder lichte verwarming (40 tot 50 °C) totdat het produkt volledig gedispergeerd is. Het monster moet volledig gedispergeerd zijn; indien dat niet het geval is, moet de bepaling opnieuw worden verricht.
- 6.2.3. Voeg 1,5 ml ammoniak (25 %) (4.1) toe of een overeenkomstig volume van een sterkere oplossing en meng goed.
- 6.2.4. Voeg 10 ml ethanol (4.2) toe en meng de vloeistoffen voorzichtig maar grondig in het apparaat.
- 6.2.5. Voeg 25 ml diëthylether (4.3) toe. Koel zonodig af in stromend water. Sluit het apparaat en schud krachtig gedurende één minuut onder herhaaldelijk omkeren van het apparaat.
- 6.2.6. Neem de stop voorzichtig af en voeg 25 ml petroleumether (4.4) toe, waarbij de eerste milliliters worden gebruikt om de stop en de binnenkant van de hals van het apparaat uit te spoelen. Laat hierbij de spoelvloeistof in het apparaat lopen. Sluit het apparaat met de stop, schud en keer herhaaldelijk om gedurende dertig seconden. Schud niet te krachtig indien niet gecentrifugeerd wordt onder 6.2.7.
- 6.2.7. Laat het apparaat staan tot de bovenste vloeistoflaag helder is geworden en zich scherp van de onderste waterige laag heeft gescheiden. De scheiding kan ook worden bewerkt met een geschikte centrifuge (5.7).

Opmerking:

Indien een niet door een draaistroommotor aangedreven centrifuge wordt gebruikt, kunnen vonken ontstaan, zodat er voorzorgen moeten worden genomen om een explosie of brand door etherdampen uit b. v. een gebroken buis te voorkomen.

- 6.2.8. Neem de stop weg, spoel de stop en de binnenkant van de hals van het apparaat met enkele milliliters van het gemengde oplosmiddel (4.5) en laat de spoelvloeistof (4.5) in het apparaat lopen. Breng zorgvuldig een zo groot mogelijke hoeveelheid van de bovendrijvende vloeistof door decantering of met een hevel (5.6) over in de voorbereide kolf (6.2.1).

Opmerking:

Indien de overbrenging niet met een hevel wordt verricht, moet soms een weinig water worden toegevoegd om het scheidingsvlak tussen de twee lagen te verhogen en daardoor het decanteren te vergemakkelijken.

- 6.2.9. Spoel de buiten- en binnenkant van de hals van het apparaat of het uiteinde en het onderste deel van de hevel met enkele milliliters van het gemengde oplosmiddel. Laat de spoelvloeistof van de

buitenkant van het apparaat in de kolf en dat van de binnenkant van de hals en van de hevel in het extractieapparaat lopen.

- 6.2.10. Verricht een tweede extractie door de bewerkingen 6.2.5 tot en met 6.2.9 te herhalen, waarbij echter slechts 15 ml diëthylether en 15 ml petroleumether worden gebruikt.
- 6.2.11. Verricht een derde extractie door bewerking 6.2.10 te herhalen maar laat de laatste spoeling (6.2.9) achterwege.
- Opmerking:*
Deze derde extractie hoeft niet te worden verricht bij de analyse van monsters van geëvaporeerde magere melk en gecondenseerde magere melk met suiker.
- 6.2.12. Verdamp of distilleer voorzichtig zoveel mogelijk oplosmiddel (ethanol inbegrepen) af. Bij een kleine kolf zal het noodzakelijk zijn wat van het oplosmiddel na iedere extractie te verdampen.
- 6.2.13. Plaats, zodra er geen geur van oplosmiddel meer waarneembaar is, de kolf op haar zijkant liggend in de stoof en verwarm gedurende één uur.
- 6.2.14. Neem de kolf uit de stoof, laat afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig.
- 6.2.15. Herhaal de handelingen onder 6.2.13 en 6.2.14 met verwarmingstijden van 30 tot 60 minuten totdat het verschil in massa tussen twee opeenvolgende wegingen minder bedraagt dan 0,5 mg of totdat de massa toeneemt. Bij toename van de massa moet het laatst verkregen gewicht bij de berekening (7.1) worden gebruikt. Stel dat dit eindgewicht M_1 is.
- 6.2.16. Voeg 15 tot 25 ml petroleumether toe om te controleren of de geëxtraheerde stof volledig oplosbaar is. Verwarm zacht en zwenk tot al het vet opgelost is.
- 6.2.16.1. Indien de geëxtraheerde stof volledig oplosbaar is in petroleumether, is de massa aan vet het verschil tussen de massa's die respectievelijk bij 6.2.1. en 6.2.15 werden bepaald.
- 6.2.16.2. Indien er wel onoplosbare stof aanwezig is of in geval van twijfel en steeds bij geschillen extraheer dan het vet volledig uit de kolven door herhaald wassen met warme petroleumether, waarbij men het onopgeloste materiaal vóór iedere decantering laat bezinken. Spoel de buitenkant van de hals van de kolf driemaal af. Verwarm de op haar zijkant liggende kolf gedurende één uur in de stoof, laat afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer zoals hierboven (6.2.1) aangegeven en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig. De massa van het vet is het verschil tussen de in 6.2.15 gevonden massa en de laatste massa.

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

7.1. Berekeningswijze

De massa in grammen van het geëxtraheerde vet wordt verkregen aan de hand van de volgende formule:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

en het vetgehalte van het monster in gewichtsprocenten aan de hand van de volgende formule:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

Hierin is:

M_1 = de massa in g van kolf M met vet na fase 6.2.15;

M_2 = de massa in g van kolf M na fase 6.2.1 of, in geval van niet-opgelost materiaal of bij geschillen, fase 6.2.16.2;

B_1 = de massa in g van kolf B van de blanco na fase 6.2.15;

B_2 = de massa in g van kolf B na fase 6.2.1 of, in geval van niet-opgelost materiaal of bij geschillen, fase 6.2.16.2;

S = de massa in grammen van de ingewogen hoeveelheid.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen aan hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 0,05 g vet per 100 g produkt.

**METHODE 4: BEPALING VAN HET VETGEHALTE
(METHODE VOLGENS RÖSE-GOTTLIEB)**

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Aan de hand van deze methode wordt het vetgehalte bepaald van:

- vette-melkpoeder,
- volle-melkpoeder,
- gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder,
- magere-melkpoeder.

2. DEFINITIE

Vetgehalte van melkpoeder: het volgens de aangegeven methode bepaalde vetgehalte.

3. PRINCIPE

Het vetgehalte wordt bepaald door extractie van het vet uit een ammoniak- en alcoholhoudende oplossing van het monster met diëthylether en petroleumether, gevolgd door verdamping van de oplosmiddelen en weging van het residu, alsmede berekening in gewichtspercenten van het monster, overeenkomstig het principe van Röse-Gottlieb.

4. REAGENTIA

Alle reagentia moeten voldoen aan de in de blancobepaling (6.1) aangegeven eisen. Indien nodig kunnen de reagentia opnieuw gedestilleerd worden in aanwezigheid van ongeveer 1 g botervet per 100 ml oplosmiddel.

4.1. Ammoniakoplossing, ongeveer 25 % (m/m) NH_3 (dichtheid bij 20 °C ongeveer 0,91 g/ml), of een sterkere oplossing met bekende concentratie.

4.2. Ethanol, 96 ± 2 % (v/v) of, indien niet beschikbaar, met methanol, ethylmethylketon of petroleumether gedenatureerde ethanol.

4.3. Diëthylether, peroxydevrij

Opmerking 1:

Voeg voor het onderzoek op peroxyden 1 ml versbereide kaliumjodide-oplossing van 10 % toe aan 10 ml ether in een kleine maatcilinder met glazen stop, die van te voren met ether werd gespoeld. Schud en laat één minuut staan. Geen van beide lagen mag een gele kleur vertonen.

Opmerking 2:

Diëthylether kan peroxydevrij worden gehouden door toevoeging van vochtig zinkfolie die gedurende één minuut volledig werd ondergedompeld in een verdunde aangezuurde kopersulfaat-oplossing en vervolgens gewassen met water. Gebruik ongeveer 8 000 mm² zinkfolie per liter; knip deze in stroken die lang genoeg zijn om ten minste tot de helft van de hoogte van de recipient te reiken.

4.4. Petroleumether, met elk kooktraject tussen 30 en 60 °C

4.5. Mengsel van oplosmiddelen, kort voor het gebruik bereid door menging van gelijke volumes diëthylether (4.3) en petroleumether (4.4) (waar het gemengde oplosmiddel is voorgeschreven, mag het door diëthylether of door petroleumether alleen worden vervangen).

5. APPARATUUR

5.1. Analytische balans

5.2. Geschikte extractiebuizen of -kolven, voorzien van geslepen glazen stoppen, kurken of andere sluitingen die niet kunnen worden aangetast door gebruikte oplosmiddelen

5.3. 150 tot 250 ml-kolven, dunwandig met platte bodem

5.4. Droogstoof (atmosferische druk), met goede ventilatie en met thermostaat (ingesteld op 102 ± 1 °C)

- 5.5. Kooksteentjes, vetvrij, niet poreus, niet bros bij gebruik, b. v. glaskralen of stukjes siliciumcarbi-
de (het gebruik van kooksteentjes is facultatief, zie 6.2.1)
- 5.6. Waterbad, temperatuur 60 tot 70 °C
- 5.7. Hevel die past op de buizen
- 5.8. Centrifuge

6. WERKWIJZE

6.1. Blancoproef

Voer gelijktijdig met de bepaling van het vetgehalte van het monster een blancobepaling uit aan 10 ml water, waarbij hetzelfde type extractieapparatuur en dezelfde reagentia in dezelfde hoeveelheden worden gebruikt en dezelfde werkwijze wordt gevolgd die hierna is beschreven, met uitzondering van 6.2.2. Indien de blanco meer dan 0,5 mg bedraagt, moeten de reagentia worden gecontroleerd en moet(en) het (de) onzuiver(e) reagens (reagentia) worden gezuiverd of vervangen.

6.2. Bepaling

- 6.2.1. Droog de kolf (5.3) (indien nodig samen met enkele kooksteentjes (5.5) om zacht koken gedurende de latere verwijdering van de oplosmiddelen te bevorderen) in de oven (5.4) gedurende een half uur tot één uur. Laat de kolf afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer en weeg de afgekoelde kolf tot op 0,1 mg nauwkeurig.
- 6.2.2. Weeg ongeveer 1 g volle melkpoeder of ongeveer 1,5 g gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder of magere-melkpoeder tot op 1 mg nauwkeurig rechtstreeks of door een verschilweging in het extractieapparaat (5.2). Voeg 10 ml water toe en schud zacht totdat het melkpoeder volledig gedispergeerd is. Bij sommige monsters kan verwarming noodzakelijk zijn.
- 6.2.3. Voeg 1,5 ml ammoniak (25 %) (4.1) toe of een overeenkomstig volume van een sterkere oplossing en verwarm in een waterbad (5.6) gedurende 15 minuten bij 60 tot 70 °C onder af en toe schudden. Koel af, b. v. in stromend water.
- 6.2.4. Voeg 10 ml ethanol (4.2) toe en meng de vloeistoffen voorzichtig maar grondig in het open apparaat.
- 6.2.5. Voeg 25 ml diëthylether (4.3) toe. Koel zonodig in stromend water. Sluit het apparaat en schud krachtig gedurende één minuut onder herhaaldelijk omkeren van het apparaat.
- 6.2.6. Neem de stop voorzichtig af en voeg 25 ml petroleumether (4.4) toe, waarbij de eerste milliliters worden gebruikt om de stop en de binnenkant van de hals van het apparaat uit te spoelen. Laat hierbij de spoelvloeistof in het apparaat lopen. Sluit het apparaat weer met de stop, schud en keer herhaaldelijk om gedurende dertig seconden. Schud niet te krachtig indien niet wordt gecentrifugeerd in 6.2.7.
- 6.2.7. Laat het apparaat staan totdat de bovenste vloeistoflaag helder is geworden en zich scherp van de onderste waterige laag heeft gescheiden. De scheiding kan ook worden bewerkt met een geschikte centrifuge (5.8).

Opmerking:

Indien een niet door een draaistroommotor aangedreven centrifuge wordt gebruikt, kunnen vonden ontstaan, zodat er voorzorgen moeten worden genomen om een explosie of brand door etherdampen uit b. v. een gebroken buis te voorkomen.

- 6.2.8. Neem de stop af, spoel de stop en de binnenkant van de hals van het apparaat met enkele milliliters van het gemengde oplosmiddel (4.5) en laat de spoelvloeistof (4.5) in het apparaat lopen. Breng zorgvuldig een zo groot mogelijke hoeveelheid van de bovenstaande vloeistof door decantering of met een hevel (5.7) over in de voorbereide kolf (6.2.1).

Opmerking:

Indien de overbrenging niet met een hevel wordt verricht, moet soms een weinig water worden toegevoegd om het scheidingsvlak tussen de twee lagen te verhogen en daardoor het decanteren te vergemakkelijken.

- 6.2.9. Spoel de buiten- en binnenkant van de hals van het apparaat of het uiteinde en het onderste deel van de hevel met enkele milliliters van het gemengde oplosmiddel. Laat de spoelvloeistof van de

buitenkant van het apparaat in de kolf en dat van de binnenkant van de hals en van de hevel in het extractieapparaat lopen.

- 6.2.10. Verricht een tweede extractie door de werkingen 6.2.5 tot en met 6.2.9 te herhalen, waarbij echter slechts 15 ml diëthylether en 15 ml petroleumether mogen worden gebruikt.
- 6.2.11. Verricht een derde extractie door werking 6.2.10 te herhalen maar laat de laatste spoeling (6.2.9) achterwege.
- Opmerking:*
Deze derde extractie hoeft niet te worden verricht bij de analyse van monsters van magere-melkpoeder.
- 6.2.12. Verdamp of destilleer voorzichtig zoveel mogelijk oplosmiddelen (ethanol inbegrepen) af. Bij een kleine kolf zal het noodzakelijk zijn wat van het oplosmiddel zoals hierboven na iedere extractie te verdampen.
- 6.2.13. Plaats, zodra er geen geur van oplosmiddel meer waarneembaar is de kolf op haar zijkant liggend in de stoof en verwarm gedurende één uur.
- 6.2.14. Neem de kolf uit de stoof, laat afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer zoals boven aangegeven (6.2.1) en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig.
- 6.2.15. Herhaal de handelingen onder 6.2.13 en 6.2.14 met verwarmingstijden van 30 tot 60 minuten totdat het verschil in massa tussen twee opeenvolgende wegingen minder bedraagt dan 0,5 mg of totdat de massa toeneemt. Bij toename van de massa moet het laagste verkregen gewicht bij de berekening (7.1) worden gebruikt. Stel dat dit eindgewicht M_1 is.
- 6.2.16. Voeg 15 tot 25 ml petroleumether toe om te controleren of de geëxtraheerde stof volledig oplosbaar is. Verwarm zacht en zwenk tot al het vet opgelost is.
- 6.2.16.1. Indien de geëxtraheerde stof volledig oplosbaar is in petroleumether, is de massa aan vet het verschil tussen de massa's die bij 6.2.1 en 6.2.15 werden bepaald.
- 6.2.16.2. Indien wel onoplosbare stof aanwezig is of in geval van twijfel en steeds bij geschillen, extraheer dan het vet volledig uit de kolf door herhaald wassen met warme petroleumether, waarbij men het onopgeloste materiaal vóór iedere decantering laat bezinken. Spoel de buitenkant van de hals van de kolf driemaal af.

Verwarm de op haar zijkant liggende kolf gedurende één uur in de stoof, laat afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer zoals hierboven aangegeven (6.2.1) en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig. De massa van het vet is het verschil tussen de in 6.2.15 gevonden massa en de laatste massa.

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

7.1. Berekeningswijze

De massa in grammen van het geëxtraheerde vet wordt verkregen aan de hand van de volgende formule:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

en het vetgehalte van het monster in gewichtsprocenten aan de hand van de volgende formule:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

Hierin is:

M_1 = de massa in g van kolf M met vet na fase 6.2.15;

M_2 = de massa in g van kolf M na fase 6.2.1 of, in geval van niet-opgelost materiaal of bij geschillen, fase 6.2.16.2;

B_1 = de massa in g van kolf B van de blanco na fase 6.2.15;

B_2 = de massa in g van kolf B na fase 6.2.1 of, in geval van niet-opgelost materiaal of bij geschillen, fase 6.2.16.2;

S = de massa in g van het gebruikte monster.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen aan hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 0,2 g vet per 100 g produkt, met uitzondering van magere-melkpoeder waar dit verschil niet meer dan 0,1 g mag bedragen.

METHODE 5: BEPALING VAN HET SUCROSEGEHALTE (POLARIMETRISCHE METHODE)**1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED**

Aan de hand van deze methode wordt het sucrosegehalte bepaald van:

- gecondenseerde volle melk met suiker,
- gecondenseerde gedeeltelijk afgeroomde melk met suiker,
- gecondenseerde magere melk met suiker.

De monsters moeten geen invertsuiker bevatten.

2. DEFINITIE

Sucrosegehalte van gecondenseerde melk met suiker: het volgens de aangegeven methode bepaalde sucrosegehalte.

3. PRINCIPE

De methode is gebaseerd op het principe van de inversie volgens Clerget, behandeling van het monster met een verdund zuur die een volledige hydrolyse van de sucrose geeft maar nagenoeg geen hydrolyse van lactose of andere suikers. Het sucrosegehalte wordt gevonden aan de hand van de verandering in het draaiingsvermogen van de oplossing.

Er wordt een helder filtraat van het monster, zonder mutarotatie door lactose bereid door behandeling van de oplossing met ammonia gevolgd door neutralisatie en klaring door toevoeging van achtereenvolgens een zinkacetaat- en een kaliumhexacyanoferraat (II)-oplossing.

In een deel van het filtraat wordt de sucrose op een in detail aangegeven manier gehydrolyseerd aangepast aan dit melkfiltraat.

Aan de hand van de draaiing van het filtraat vóór en na de inversie wordt door middel van formules het sucrosegehalte berekend.

4. REAGENTIA

- 4.1. Zinkacetaatoplossing, 1 M: los 21,9 g gekristalliseerd zinkacetaatdihydraat ($Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$) en 3 ml ijszijn in water op en vul tot 100 ml aan met water.
- 4.2. Kaliumhexacyanoferraat(II)-oplossing, 0,25 M: los 10,6 g gekristalliseerd kaliumhexacyanoferraatdihydraat $K_4[Fe(CN_6)] \cdot 3H_2O$ in water op en vul tot 100 ml aan met water.
- 4.3. Zoutzuuroplossing, $6,35 \pm 0,20$ M (20 tot 22 %) of $5,0 \pm 0,2$ M (16 tot 18 %).
- 4.4. Ammoniakoplossing, $2,0 \pm 0,2$ M (3,5 %).
- 4.5. Azijnzuuroplossing, $2,0 \pm 0,2$ M (12 %).
- 4.6. Broomthymolblauw, indicatoroplossing, 1 % (m/v) in ethanol.

5. APPARATUUR

- 5.1. Balans, gevoeligheid 10 mg.
- 5.2. Polarimeterbuis, 2 dm, met een nauwkeurig gekalibreerde lengte.

5.3. Polarimeter of sacharimeter:

- a) polarimeter met natrium of groenkwiklicht (kwikdamplamp met prisma of het speciale Wratten Filter nr. 77A), waarmee ten minste tot op 0,05 booggraden nauwkeurig kan worden gelezen.
- b) sacharimeter met schaal in internationale suikergraden, waarbij gebruik wordt gemaakt van wit licht dat een 15 mm-filter van een kaliumbichromaatoplossing van 6 % passeert, of natriumlicht, dat met een nauwkeurigheid van ten minste 0,1 graad op de schaal in internationale suikergraden kan worden afgelezen.

5.4. Waterbad, van 60 ± 1 °C.

6. WERKWIJZE

6.1. Controlebepaling

Verricht ter controle van de werkwijze, de reagentia en de apparatuur een dublobepaling zoals onder 6.2 beschreven is op een mengsel van 100 g melk en 18,00 g zuivere saccharose of 110 g afgeroomde melk en 18,00 g saccharose pro analyse, overeenkomend met 40,00 g gecondenseerde melk met 45 % suiker.

Bereken het saccharosegehalte met behulp van de formule in paragraaf 7, waarbij in formule 1 voor M, F en P respectievelijk de hoeveelheid afgewogen melk, het vetgehalte en het eiwitgehalte van deze melk en in formule 2 voor M het getal 40,00 ingevuld moet worden.

Het gemiddelde van de gevonden waarden mag niet meer dan 0,2 % van 45 % afwijken.

6.2. Bepaling

6.2.1. Weeg ongeveer 40 g van het goed doorengemengd monster tot op 10 mg nauwkeurig in een be-
kerklas van 100 ml. Voeg 50 ml heet water (80 tot 90 °C) toe en meng goed.

6.2.2. Breng het mengsel kwantitatief over in een maatkolf van 200 ml, waarbij het be-
kerklas enkele malen met water van 60 °C wordt nagespoeld totdat het totale volume 120 tot 150 ml bedraagt.
Meng en koel af tot kamertemperatuur.

6.2.3. Voeg 5 ml verdunde ammoniakoplossing (4.4) toe. Meng opnieuw en laat vervolgens vijftien mi-
nuten staan.

6.2.4. Neutraliseer de ammoniak door toevoeging van een equivalente hoeveelheid van de verdunde
azijnzuuroplossing (4.5). Bepaal het juiste aantal milliliter vooraf door titratie van de ammo-
niakoplossing met broomthylmolblauw als indicator (4.6). Meng.

6.2.5. Voeg, onder voorzichtig mengen door ronddraaien van de schuingehouden kolf, 12,5 ml zink-
acetaatoplossing (4.1) toe.

6.2.6. Voeg op dezelfde wijze als bij de acetaatoplossing 12,5 ml kaliumhexacyanoferraat(II)-oplos-
sing (4.2) toe.

6.2.7. Breng de inhoud van de kolf op 20 °C en vul tot de maatstreep van 200 ml aan met water van
20 °C.

Opmerking:

Tot dit stadium moeten alle toevoegingen van water of reagentia op zodanige wijze geschieden,
dat vorming van luchtbellen vermeden wordt. Om dezelfde reden moeten alle mengingen ge-
schieden door draaien van de kolf in plaats van door schudden. Indien luchtbellen worden opge-
merkt vóór het bijvullen tot 200 ml, kan het verwijderen ervan bevorderd worden door de kolf
met een vacuümpomp te verbinden, waarbij de kolf omgezwenkt wordt.

6.2.8. Sluit de kolf met een droge stop en meng goed door krachtig schudden.

6.2.9. Laat enkele minuten staan en filtreer vervolgens door een droge filter waarbij de eerste 25 ml
van het filtraat worden weggegooid.

6.2.10. Directe polarisatie/draaiing voor inversie: bepaal de optische draaiing van het filtraat bij
 20 ± 1 °C.

6.2.11. Inversie: pipetteer 40 ml van het hierboven verkregen filtraat in een 50 ml-maatkolf. Voeg
6,0 ml 6,35 M of 7,6 ml 5,00 M zoutzuur (4.3) toe.

Plaats de kolf in een waterbad van 60 °C gedurende vijftien minuten, waarbij de kolf tot de hals
ondergedompeld moet zijn. Meng door een draaiende beweging gedurende de eerste vijf minu-

ten, tijdens welke de inhoud van de kolf de temperatuur van het bad moet hebben bereikt. Koel af tot 20 °C en vul tot de maatstreep aan met water van 20 °C. Meng en laat één uur bij deze temperatuur staan.

- 6.2.12. *Invertpolarisatie/draaiing na inversie:* Bepaal de draaiing van de geïnverteerde oplossing bij 20 °C ± 0,2 °C. Indien evenwel de temperatuur T van de vloeistof in de polarisatiebuis gedurende de meting, meer dan 0,2 °C verschilt van 20 °C, moet de temperatuurcorrectie genoemd in 7.2 worden toegepast.

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

7.1. Berekeningswijze

Bereken het sucrosegehalte met behulp van de volgende formules:

$$1. \quad v = \frac{M}{100} (1,08 F + 1,55 P)$$

$$2. \quad S = \frac{D - 1,25 I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{v}{L \times M} \quad \%$$

S = sucrosegehalte,

M = massa van het gewogen monster in g,

F = percentage vet van het monster,

P = percentage eiwit (N × 6,38) van het monster,

V = volume in ml waartoe het monster vóór de filtratie is verdund,

v = correctie in ml voor het volume van het bij de klaring gevormde neerslag,

D = directe aflezing van de polarimeter (draaiing vóór inversie),

I = aflezing van de polarimeter na inversie,

L = lengte in dm van de polarimeterbuis,

Q = inversiefactor, waarvan de waarden hieronder zijn aangegeven.

Opmerkingen:

- a) Indien nauwkeurig 40,00 g gecondenseerde melk wordt gewogen en een polarimeter met natriumlicht, met een schaal in booggraden en een polarimeterbuis van 2 dm wordt gebruikt bij 20,0 °C ± 0,1 °C, kan het sucrosegehalte van normale gecondenseerde melk (C = 9) aan de hand van de volgende formule worden berekend:

$$S = (D - 1,25 I) \times (2,833 - 0,00612 F - 0,00878 P).$$

- b) Indien de invertpolarisatie bij een andere temperatuur dan 20 °C wordt gemeten, moeten de cijfers worden vermenigvuldigd met: [1 + 0,0037 (T - 20)].

7.2. Waarden voor de inversiedeelfactor Q

De volgende formules geven nauwkeurige waarden voor Q voor verschillende lichtbronnen met correcties voor concentratie en temperatuur:

natriumlicht en polarimeter met booggraden:

$$Q = 0,8825 + 0,0006 (C - 9) - 0,0033 (T - 20);$$

groenkwiklicht en polarimeter met booggraden:

$$Q = 1,0392 + 0,0007 (C - 9) - 0,0039 (T - 20);$$

wit licht met bichromaatfilter en sacharimeter met schaal in internationale suikergraden:

$$Q = 2,549 + 0,0017 (C - 9) - 0,0095 (T - 20);$$

In bovenstaande formules is:

C = het totale gehalte aan suikers in procenten in de geïnverteerde oplossing zoals bepaald uit de draaiing,

T = temperatuur van de geïnverteerde oplossing bij aflezing van de polarimeter.

Opmerking 1:

Het totale gehalte aan suikers in procenten (C) van de geïnverteerde oplossing kan worden berekend uit de draaiingen van het polarisatievlak vóór en na inversie, waarbij de gebruikelijke waarden voor de specifieke draaiingen voor saccharose, lactose en invertsuiker worden aangenomen.

De correctie 0,0006 (C - 9) enz. is alleen nauwkeurig als C ongeveer 9 is; voor normale gecondenseerde melk kan deze correctie worden verwaarloosd daar C dan vrijwel 9 is.

Opmerking 2:

Temperatuurafwijkingen van 1 °C bij een meettemperatuur van 20 °C hebben bij de polarimeteraflezingen vóór inversie slechts weinig invloed. Daarentegen zijn bij polarimeteraflezingen na inversie bij afwijkingen van meer dan 0,2 °C correcties noodzakelijk.

De correctie $- 0,0033 (T - 20)$ is alleen nauwkeurig voor temperaturen gelegen tussen 18 en 22 °C.

7.3. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen aan hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 0,3 g sucrose per 100 g gecondenseerde melk.

METHODE 6: BEPALING VAN HET GEHALTE AAN MELKZUUR IN LACTATEN**1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED**

Aan de hand van deze methode wordt het gehalte aan melkzuur en lactaten, uitgedrukt in melkzuur, bepaald van:

- vette-melkpoeder,
- volle-melkpoeder,
- gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder,
- magere-melkpoeder.

2. DEFINITIE

Gehalte van melkpoeder aan melkzuur en lactaten: het volgens de aangegeven methode bepaalde gehalte aan melkzuur en lactaten, uitgedrukt in melkzuur.

3. PRINCIPE

Het vet, het eiwit en de lactose worden gelijktijdig uit een oplossing van het monster verwijderd door toevoeging van kopersulfaat en calciumhydroxyde gevolgd door filtratie.

Het melkzuur en de lactaten in het filtraat worden in acetaldehyde omgezet door geconcentreerd zwavelzuur in aanwezigheid van kopersulfaat.

Het melkzuurgehalte wordt colorimetrisch bepaald met 4-hydroxydifenyl.

Het gehalte aan melkzuur en lactaten wordt uitgedrukt in mg melkzuur per 100 g vetvrije drogestof.

4. REAGENTIA

4.1. Koper(II)sulfaatoplossing: los 250 g koper(II)sulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) op in water en verdun tot 1 000 ml met water.

4.2. Calciumhydroxydesuspensie

4.2.1. wrijf 300 g calciumhydroxyde ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) in een mortier aan met water, waarvan in totaal 900 ml worden gebruikt. De suspensie voor het gebruik moet vers worden bereid.

4.2.2. wrijf 300 g calciumhydroxyde ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) in een mortier aan met water, waarvan in totaal 1 400 ml worden gebruikt. De suspensie voor het gebruik moet vers worden bereid.

4.3. Zwavelzuur-koper(II)sulfaatoplossing: voeg aan 300 ml zwavelzuur, H_2SO_4 van 95,5 tot 97,0 % (m/m), 0,5 ml toe van de koper(II)sulfaatoplossing (4.1).

4.4. 4-hydroxydifenyl ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$)-oplossing: los door schudden en zacht verwarmen 0,75 g 4-hydroxydifenyl op in 5 ml van een oplossing van natriumhydroxyde in water die 5 g NaOH per 100 ml bevat. Verdun in een maatkolf tot 50 ml met water. Bewaar de oplossing in een fles van bruin glas op een donkere en koele plaats. Gebruik de oplossing niet als zij van kleur verandert of troebel wordt. De maximale houdbaarheid bedraagt 72 uren.

- 4.5. Standaard melkzuuroplossing: los, kort voor het gebruik, 0,1067 g lithiumlactaat ($\text{CH}_3\text{CHOH-COOLi}$) op in water en verdun in een maatkolf tot 1 000 ml. 1 ml van deze oplossing komt overeen met 0,1 mg melkzuur.
- 4.6. Standaard gereconstitueerde melk: analyseer van te voren verschillende monsters melkpoeder van hoge kwaliteit. Selecteer voor bereiding van de ijkcurve het monster met het laagste melkzuurgehalte, dat niet meer dan 30 mg melkzuur per 100 g vetvrij droge stof mag bevatten. Bereid de gereconstitueerde melk volgens de werkwijze die hierna in 6.2.1 en 6.2.2 is beschreven.

5. APPARATUUR

- 5.1. Analytische balans
- 5.2. Spectrofotometer, geschikt voor het meten bij een golflengte van 570 nm
- 5.3. Waterbad, temperatuur $30 \pm 2^\circ\text{C}$
- 5.4. Mortier met stamper
- 5.5. Filtreerpapier (Schleicher en Schull 595, Whatman 1 of gelijkwaardig)
- 5.6. Reageerbuisen, pyrex of gelijkwaardig (afmetingen 25×150 mm).

Opmerking: Alle glaswerk moet volkomen schoon zijn en mag uitsluitend bij deze bepaling worden gebruikt. Spoel glaswerk dat neerslagresten bevat voor het wassen uit met geconcentreerd zoutzuur.

6. WERKWIJZE

6.1. Blancobepaling

Voer een blancobepaling uit door 30 ml water in een maatkolf van 50 ml te brengen en deze kolf te behandelen zoals in 6.2.4 tot en met 6.2.11 is beschreven. Indien de tegenover water gemeten blanco een equivalent van 20 mg melkzuur per 100 g vetvrije drogestof overschrijdt, moeten de reagentia worden gecontroleerd en de onzuivere reagentia of het onzuivere reagens worden vervangen. Verricht de blancobepaling tegelijkertijd met de analyse van het monster.

6.2. Bepaling

Opmerking: Vermijd besmetting met onzuiverheden, vooral met speeksel en zweet.

- 6.2.1. Bepaal het gehalte aan vetvrije droge stof (a) van het monster door het vetgehalte (verkregen door toepassing van methode 4) en het watergehalte (verkregen door toepassing van methode 2) af te trekken van 100.
- 6.2.2. Weeg $\left(\frac{1\ 000}{a - 10}\right)$ g van het monster tot op 0,1 g nauwkeurig. Los deze hoeveelheid monster op in 100 ml water en meng goed door elkaar.
- 6.2.3. Pipetteer 5 ml van de verkregen oplossing in een maatkolf van 50 ml en verdun met water tot ongeveer 30 ml.
- 6.2.4. Voeg onder schudden langzaam 5 ml van de kopersulfaatoplossing (4.1) toe en laat tien minuten staan.
- 6.2.5. Voeg onder schudden langzaam 5 ml van de calciumhydroxydesuspensie (4.2.1) toe, of 10 ml van de calciumhydroxydesuspensie (4.2.2).
- 6.2.6. Vul aan met water tot 50 ml, schud krachtig, laat tien minuten staan en filtreer dan. Verwijder de eerste hoeveelheden filtraat.
- 6.2.7. Pipetteer 1 ml van het filtraat in een reageerbuis (5.6).
- 6.2.8. Voeg met een buret of een maatpipet 6,0 ml van de zwavelzuur-kopersulfaatoplossing (4.3) toe. Meng.
- 6.2.9. Verwarm in een kokend waterbad gedurende vijf minuten. Koel onder stromend water af tot kamertemperatuur.

- 6.2.10. Voeg twee druppels 4-hydroxydifenylreagens (4.4) toe en schud krachtig om het reagens gelijkmatig in de vloeistof te verspreiden. Plaats de buis in het waterbad van 30 ± 2 °C; laat vijftien minuten staan onder af en toe schudden.
- 6.2.11. Plaats de buis gedurende 90 seconden in een kokend waterbad. Koel onder stromend water af tot kamertemperatuur.
- 6.2.12. Meet binnen drie uur de optische dichtheid (extinctie) tegen de blancobepaling (6.1) bij de golflengte die in 5.2 is aangegeven.
- 6.2.13. Indien de optische dichtheid die van het hoogste punt van de standaardlijn overschrijdt, het onderzoek herhalen met gebruikmaking van de juiste verdunning van het filtraat (6.2.6).
- 6.3. **IJKLIJN**
- 6.3.1. Pipetteer 5 ml gereconstitueerde melk (4.6) in vijf maatkolven van 50 ml. Pipetteer in deze kolven respectievelijk 0, 1, 2, 3 en 4 ml van de standaard melkzuuroplossing (4.5) ten einde een reeks standaarden te verkrijgen die overeenkomen met 0, 20, 40, 60 en 80 mg toegevoegd melkzuur per 100 g vetvrije drogestof van het melkpoeder.
- 6.3.2. Verdun met water tot ongeveer 30 ml en behandel verder zoals is beschreven in 6.2.4 tot en met 6.2.11.
- 6.3.3. Meet de optische dichtheden van de standaarden (6.3.1) tegen de blancobepaling (6.1) bij de golflengte die in 5.2 is aangegeven. Zet in een grafiek de optische dichtheden uit tegen de hoeveelheden melkzuur aangegeven in 6.3.1, namelijk 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg en 80 mg per 100 g vetvrije drogestof. Trek de best passende rechte lijn door de punten en maak de ijklijn door de eerste lijn zodanig parallel te verschuiven dat zij door de oorsprong loopt.

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

7.1. Berekeningswijze

Zet de in 6.2.12 of 6.2.13 gemeten optische dichtheid om in mg melkzuur per 100 g vetvrije drogestof van het monster met behulp van de ijklijn. Vermenigvuldig dit resultaat met de verdunningsfactor als het filtraat werd verdund overeenkomstig 6.2.13.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen aan hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 8 mg melkzuur per 100 g vetvrije drogestof voor gehalten tot 80 mg. Voor hogere waarden mag dit verschil niet groter zijn dan 10 % van de laagste waarde.

METHODE 7: BEPALING VAN DE FOSFATASEACTIVITEIT (GEWIJZIGDE METHODE VOLGENS SANDERS EN SAGER)

1. DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Aan de hand van deze methode wordt de fosfataseactiviteit bepaald van:

- vette-melkpoeder,
- volle-melkpoeder,
- gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder,
- magere-melkpoeder.

2. DEFINITIE

De fosfataseactiviteit van melkpoeder is een maat van de hoeveelheid werkzame alkalische fosfatase, die aanwezig is. Zij wordt uitgedrukt in hoeveelheid fenol in μg die wordt vrijgemaakt door 1 ml gereconstitueerde melk, zoals bepaald door middel van de hierna beschreven werkwijze.

3. PRINCIPE

De fosfataseactiviteit van melkpoeder wordt bepaald door het vermogen van het fosfatase-enzym om fenol vrij te maken uit dinatriumfenylfosfaat. De onder de voorgeschreven omstandigheden vrijgemaakte hoeveelheid fenol wordt bepaald door spectrofotometrische meting van de met het reagens volgens Gibb ontwikkelde kleur.

4. REAGENTIA**4.1. Oplossing A**

Bariumboraathydroxydebuffer: pH $10,6 \pm 0,1$ bij 20°C .

Los op: 25,0 g bariumhydroxyde ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) in water en verdun tot 500 ml.

Los op: 11,0 g boorzuur (H_3BO_3) in water en verdun tot 500 ml.

Verwarm de twee oplossingen tot 50°C en meng.

Schud en koel het mengsel af tot kamertemperatuur.

Breng de pH op $10,6 \pm 0,1$ met de bariumhydroxydeoplossing en filtreer.

Bewaar de oplossing in een goed gesloten recipiënt.

Verdun de buffer vóór gebruik met een gelijke hoeveelheid water.

4.2. Oplossing B

Kleurontwikkelingsbuffer

Los 6,0 g natriummetaboraat (NaBO_2) (of 12,6 g $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 20,0 g natriumchloride (NaCl) in water op en verdun tot 1 000 ml met water.

4.3. Oplossing C

Buffersubstraatoplossing

4.3.1. Los 0,5 g dinatriumfenylfosfaat ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) op in 4,5 ml oplossing B (4.2). Voeg twee druppels oplossing E (4.5) toe en laat dertig minuten staan. Extraheer de kleur met 2,5 ml butanol (4.10). Herhaal de kleurextractie indien nodig. Werp het butanol na de scheiding weg. Deze oplossing kan verschillende dagen in een koelkast worden bewaard. Ontwikkel en extraheer de kleur nogmaals vóór het gebruik.

4.3.2. Pipetteer 1 ml van deze oplossing in een maatkolf van 100 ml en vul tot het volume aan met oplossing A. Bereid de bufferoplossing onmiddellijk vóór het gebruik.

4.4. Oplossing D

Precipitans

Los 3,0 g zinksulfaat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 0,6 g koper(II)sulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in water op en vul tot 100 ml aan met water.

4.5. Oplossing E

Reagens volgens Gibb

Los 0,040 g 2,6 dibromochino-1,4-chloorimide ($\text{O.C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 \cdot \text{NCl}$) in 10 ml ethylalcohol van 96 % op. Bewaar de oplossing in de koelkast in een fles van donker glas. Werp dit reagens weg wanneer het verkleurt.

4.6. Kleurverdunningsbuffer

Verdun 10 ml oplossing B (4.2), kleurontwikkelingsbuffer, tot 100 ml met water.

4.7. Kopersulfaatoplossing

Los 0,05 g kopersulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in water op en vul tot 100 ml aan met water.

4.8. Standaardfenoloplossing

Los $0,200 \pm 0,001$ g zuiver fenol op in water en vul in een maatkolf tot 100 ml aan met water. Deze oplossing kan enkele maanden in de koelkast worden bewaard. Verdun 10 ml van deze oplossing tot 100 ml met water. Deze verdunde oplossing bevat $200 \mu\text{g}$ fenol per ml en kan worden gebruikt voor het bereiden van andere oplossingen.

4.9. Gekookt gedistilleerd water

4.10. n-Butanol.

5. APPARATUUR

5.1. Analytische balans

5.2. Waterbad, waarvan de thermostaat is ingesteld op $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.3. Spectrofotometer, geschikt voor aflezingen bij een golflengte van 610 nm

5.4. Filtreerpapier (Schleicher en Schull 597, Whatman 42 of gelijkwaardig filtreerpapier)

5.5. Kokend waterbad

5.6. Aluminiumfolie

6. WERKWIJZE

Voorzorgsmaatregelen:

1. Vermijd directe blootstelling aan zonlicht.
2. Alle glaswerk, stoppen en overbrengingsmateriaal moet volkomen schoon zijn. Het verdient aanbeveling een en ander (uit) te spoelen en (uit) te koken met water of (uit) te stomen.
3. Vermijd het gebruik van materiaal van kunststof (stoppen b. v.) omdat het fenolen kan bevatten.
4. Speeksel bevat fosfatase; besmetting door sporen van speeksel moet dan ook zorgvuldig worden vermeden.

6.1. Voorbehandeling van het monster

6.1.1. Weeg 10 g van het monster af tot op 0,1 g nauwkeurig en los dit op in 90 ml water. De temperatuur waarbij het poeder wordt opgelost mag nooit hoger zijn dan 35°C .

6.2. Bepaling

6.2.1. Pipetteer in ieder van de twee reageerbuizen 1 ml gereconstitueerde melk bereid als beschreven in 6.1.1.

6.2.2. Verwarm één van de buizen in kokend water gedurende twee minuten. Bedek de buis en het waterbad (5.5) (b. v. een bekersglas) met aluminiumfolie (5.6), ten einde er zeker van te zijn dat het hele buisje wordt verwarmd. Koel in koud water af tot kamertemperatuur. Gebruik deze buis voor de blancobepaling. Behandel de twee buizen bij alle verdere bewerkingen op dezelfde wijze.

6.2.3. Voeg 10 ml oplossing C (4.3.2) toe. Meng en plaats de buis in het waterbad bij 37°C (5.2).

6.2.4. Incubeer gedurende 60 minuten in het waterbad onder af en toe zwenken.

6.2.5. Breng de buizen onmiddellijk daarop over in een kokend waterbad (5.5) en verwarm gedurende twee minuten; koel in koud water af tot kamertemperatuur.

6.2.6. Voeg 1 ml oplossing D (4.4) toe, meng en filtreer door droog filtreerpapier; werp de eerste filtraten weg totdat een heldere vloeistof wordt verkregen.

6.2.7. Pipetteer 5 ml van elk filtraat in een reageerbuis, voeg 5 ml oplossing B (4.2) en 0,1 ml oplossing E (4.5) toe. Meng.

6.2.8. Laat de kleur bij kamertemperatuur ontwikkelen buiten direct zonlicht gedurende dertig minuten.

6.2.9. Meet de optische dichtheid van de monsteroplossing tegen de blanco bij de in 5.3 aangegeven golflengte.

6.2.10. Herhaal de bepaling, indien de optische dichtheid van de oplossing meer bedraagt dan die van het standaardmonster met $20\ \mu\text{g}$ fenol, bereid overeenkomstig 7.

Verdun, indien deze grens is overschreden, de gereconstitueerde melk overeenkomstig 6.1.1 met een passende hoeveelheid van deze melk die zorgvuldig gekookt is als aangegeven in 6.2.2 om de aanwezige fosfatase te inactiveren.

7. **IJKLIJN**
- 7.1. Pipetteer in vier 100 ml-maatkolven respectievelijk 1, 3, 5 en 10 ml van de standaardoplossing, verdund overeenkomstig 4.8, en vul tot de maatstreep aan met water; deze verdunningen bevatten respectievelijk 2, 6, 10 en 20 µg fenol per ml.
- 7.2. Pipetteer 1 ml water af van iedere standaardoplossing (7.1) in reageerbuizen ten einde een serie monsters (vergelijkingsreeks) bevattende 0, 2, 6, 10 en 20 µg fenol te verkrijgen. (Met 1 ml water wordt de blanco-waarde verkregen.)
- 7.3. Pipetteer achtereenvolgens in iedere reageerbuis 1 ml van de kopersulfaatoplossing (4.7), 5 ml van de kleurverdunningsbuffer (4.6), 3 ml water en 0,1 ml oplossing E (4.5). Meng.
- 7.4. Laat de reageerbuizen dertig minuten bij kamertemperatuur en afgeschermd tegen direct zonlicht staan.
- 7.5. Meet de extinctie/optische dichtheid van de oplossingen in ieder van de buizen, tegen de blanco-waarde, bij de golflengte aangegeven in 5.3.
- 7.6. Construeer de ijklijn door de extinctiewaarden uit te zetten tegen de hoeveelheden fenol in µg als aangegeven in 7.2.
8. **WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**
- 8.1. **Berekeningswijze**
- 8.1.1. Zet de cijfers als bepaald in 6.2.9 in µg fenol om met behulp van de ijklijn.
- 8.1.2. Bereken de fosfataseactiviteit, uitgedrukt in µg fenol per ml gereconstitueerde melk, aan de hand van de volgende formule:
Fosfataserwerking = $2,4 \times P$.
Hierin is P = de hoeveelheid fenol in µg overeenkomstig 8.1.1.
- 8.1.3. Indien het nodig was te verdunnen als aangegeven in 6.2.10 moet het in 8.1.2 verkregen resultaat met de verdunningsfactor worden vermenigvuldigd.
- 8.2. **Herhaalbaarheid**
- Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen aan hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 2 µg fenol vrijgemaakt met 1 ml gereconstitueerde melk.

**METHODE 8: BEPALING VAN DE FOSFATASEACTIVITEIT
(METHODE VOLGENS ASCHAFFENBURG EN MULLEN)**

1. **DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED**
- Aan de hand van deze methode wordt de fosfataseactiviteit bepaald van:
- vette-melkpoeder,
 - volle-melkpoeder,
 - gedeeltelijk afgeroomde-melkpoeder,
 - magere-melkpoeder.
2. **DEFINITIE**
- De fosfataseactiviteit van melkpoeder is een maat van de hoeveelheid actieve alkalische fosfatase die in het produkt aanwezig is. Zij wordt uitgedrukt als de hoeveelheid p-nitrofenol in microgrammen die met 1 ml van het gereconstitueerde monster wordt vrijgemaakt in de beschreven omstandigheden.
3. **PRINCIPE**
- Het gereconstitueerde monster wordt met een buffersubstraat met pH 10,2 verdund en geïncubeerd gedurende twee uur bij een temperatuur van 37 °C. De in het monster aanwezige alkali-

sche fosfatase zal in die omstandigheden p-nitrofenol vrijmaken uit toegevoegd dinatrium p-nitrofenylfosfaat. Het vrijgemaakte p-nitrofenol wordt bepaald door directe vergelijking met standaard gekleurde glazen in een eenvoudige comparator waarbij gebruik wordt gemaakt van teruggekaatst licht.

4. REAGENTIA

4.1. Natriumcarbonaat-bicarbonaatbufferoplossing

Los 3,5 g watervrij natriumcarbonaat en 1,5 g natriumbicarbonaat in water op en verdun in een maatkolf tot 1 000 ml met water.

4.2. Buffersubstraat

Los 1,5 g dinatrium p-nitrofenylfosfaat in natriumcarbonaat-bicarbonaatbuffer (4.1) op en verdun in een maatkolf tot 1 000 ml met deze buffer.

Bij bewaring in de koelkast (4 °C) is deze oplossing stabiel gedurende een maand, maar aan dergelijke opgeslagen oplossingen moet een kleurcontroleproef worden verricht (zie 6, voorzorgsmaatregel 3).

4.3. Klaringsoplossingen

4.3.1. Zinksulfaatoplossing

Los 30,0 g zinksulfaat ($ZnSO_4$) op in water en verdun in een maatkolf tot 100 ml met water.

4.3.2. Kaliumhexacyanoferraatoplossing

Los 17,2 g kaliumhexacyanoferraat(II)-trihydraat ($K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) op in water en verdun in een maatkolf tot 100 ml met water.

5. APPARATUUR

5.1. Analytische balans

5.2. Waterbad met thermostaat ingesteld op 37 ± 1 °C.

5.3. Comparator met speciale schijf met standaard gekleurde glazen, gekalibreerd in μg p-nitrofenol per ml melk, cellen 2×25 mm.

5.4. Vouwfilter

6. WERKWIJZE

Voorzorgsmaatregelen:

1. Na gebruik moeten de reageerbuizen worden geledigd, in heet water, dat een alkalisch detergent bevat worden uitgewassen en vervolgens goed uitgespoeld met zuiver heet leidingwater. Ten slotte moeten zij vóór het gebruik met water worden uitgespoeld en gedroogd. De pipetten moeten onmiddellijk na het gebruik goed worden uitgespoeld met zuiver heet leidingwater en vervolgens vóór het gebruik met water worden uitgespoeld en gedroogd.
2. De stoppen van de reageerbuizen moeten onmiddellijk na het gebruik goed met heet water worden gespoeld en daarna gedurende twee minuten in water worden uitgekookt.
3. De buffersubstraatoplossing (4.2) moet bij bewaring in de koelkast bij 4 °C of minder ten minste één maand stabiel blijven. Gebrek aan stabiliteit blijkt uit het optreden van een gele kleur. Aangezien de test steeds wordt afgelezen in vergelijking met een gekookt controleprodukt dat dezelfde buffersubstraatoplossing bevat, verdient het aanbeveling de oplossing niet te gebruiken indien een kleuraflezing van meer dan 10 μg wordt verkregen bij aflezing in een 25 mm-cel in de comparator bij gebruik van gedestilleerd water in de andere 25 mm-cel.
4. Voor ieder monster moet een afzonderlijk pipet worden gebruikt; besmetting van de pipet met speeksel moet worden vermeden.
5. De proef mag op geen enkel ogenblik blootgesteld zijn aan direct zonlicht.

6.1. Voorbehandeling

Los 10 g van het poeder in 90 ml water op. De temperatuur voor het oplossen van het poeder mag de 35 °C niet overschrijden.

6.2. Bepaling

- 6.2.1. Pipetteer 15 ml van het buffersubstraat (4.2) in een zuiver en droog reageerbuisje en daarna 2 ml van het gereconstitueerde monster (6.1) dat wordt onderzocht. Zet de stop op het buisje, meng door keren en plaats in het waterbad van 37 °C (5.2).
- 6.2.2. Plaats tegelijkertijd in het waterbad een controlebuisje dat 15 ml buffersubstraat en 2 ml gekookt gereconstitueerd monster van dezelfde soort als het onderzochte bevat.
- 6.2.3. Neem na twee uren beide buisjes uit het waterbad, voeg 0,5 ml zinksulfaatoplossing (4.3.1) toe, zet de stop weer op het buisje, schud krachtig en laat drie minuten staan. Voeg 0,5 ml kaliumhexacyanoferraatoplossing (4.3.2) toe, meng goed en filtreer over het vouwfilter (5.4) en vang het helder filtraat op in het schone reageerbuisje.
- 6.2.4. Breng het filtraat over in een 25 mm-cel en vergelijk dit met het filtraat van het gekookte controleproduct in de comparator waarbij gebruik wordt gemaakt van de speciale schijf (5.3).

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**7.1. Berekeningswijze.**

De onder 6.2.4 verkregen directe aflezing wordt vermeld als μg p-nitrofenol per ml monster of per ml gereconstitueerd monster.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerde bepalingen aan hetzelfde monster en in dezelfde omstandigheden mag niet meer bedragen dan 2 μg p-nitrofenol, getitreerd met 1 ml gereconstitueerde melk.
