

BESCHIKKING

van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie
betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden
van onderzoek inzake melkpoeder

M (73) 11

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,

Gelet op artikel 1 van het Protocol van 29 april 1969 inzake de afschaffing van controles en formaliteiten aan de binnengrenzen van Benelux en inzake de opheffing van de belemmeringen van het vrije verkeer,

Gelet op de Aanbeveling van het Comité van Ministers van 25 oktober 1965, inzake de harmonisatie der wetgevingen betreffende melkpoeder, M (65) 7,

Overwegende, dat geschillen, voortvloeiende uit het toepassen van verschillende analysemethoden of uit het gebruik van verschillende normen, dienen te worden vermeden,

Overwegende, dat in het bijzonder voor de harmonisatie van het voedingsmiddelentoezicht vereist is, dat gelijke of gelijkwaardige methoden worden toegepast, dezelfde termen worden gebezigd en gelijke of gelijkwaardige normen worden aangelegd,

Overwegende dat de Aanbeveling van het Comité van Ministers van 11 december 1968 inzake de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek betreffende melkpoeder, M (68) 51, dient te worden vervangen door een Beschikking waarin rekening wordt gehouden met de laatste ontwikkelingen op dit gebied, met name op het internationale vlak,

Heeft het volgende beslist :

Artikel 1

De Regeringen der drie Beneluxlanden nemen vóór 1 oktober 1973 de nodige maatregelen om de bijgaande analysemethoden van onderzoek inzake melkpoeder als enig geldige referentiemethoden in hun wetgeving op te nemen.

Artikel 2

De Aanbeveling van het Comité van Ministers van 11 december 1968 inzake de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek behorende bij de Aanbeveling M (65) 7 inzake de harmonisatie der wetgevingen betreffende melkpoeder, M (68) 51, vervalt.

GEDAAN te Brussel, op 17 juli 1973.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

L.J. BRINKHORST

ANALYSEMETHODEN
van onderzoek inzake melkpoeder

M (73) 11, Bijlage

1. — Voorbehandeling van het monster

1.1. — Monster bestemd voor chemisch onderzoek.

Breng de melkpoeder in een schoon en droog vat, voorzien van een goed passend deksel, met een inhoud van ongeveer tweemaal het volume van de poeder. Sluit het vat onmiddellijk en meng de melkpoeder grondig door schudden en herhaaldelijk omkeren. Vermijd zoveel mogelijk dat gedurende de voorbehandeling van het monster de melkpoeder in contact komt met de omringende lucht om vochtopname tot een minimum te beperken.

1.2. — Monster bestemd voor microbiologisch onderzoek (*)

2. — Vochtgehalte

Apparatuur en hulpstoffen

Analytische balans

Schaaltjes bij voorkeur van aluminium, nikkel, roestvrij staal of glas. De schaaltes moeten voorzien zijn van goed passende deksels die gemakkelijk afgenomen kunnen worden. De meest geschikte afmetingen zijn : diameter 6 tot 8 cm, diepte ca. 2,5 cm. Droogstoof goed geventileerd, voorzien van een thermostaat en geregeld op $102 \pm 2^\circ\text{C}$. In de gehele stoof dient een gelijkmatige temperatuur te heersen.

Exsiccator, voorzien van silicagel met vochtigheidsindicator.

2.1. — Werkwijze

2.1.1. — Neem het deksel van het schaaltesje en verwarm schaaltesje en deksel in de droogstoof gedurende 1 h. Plaats het deksel weer op het schaaltesje en zet dit in de exsiccator. Laat afkoelen tot kamertemperatuur en weeg tot op 0,1 mg.

2.1.2. — Breng ca. 2 g melkpoeder in het schaaltesje, sluit dit met het deksel en weeg tot op 0,1 mg.

2.1.3. — Neem het deksel van het schaaltesje en verwarm schaaltesje en deksel gedurende 2 h in de droogstoof.

(*) Deze methode zal worden beschreven in een aanvulling bij deze analysemethoden van onderzoek.

- 2.1.4. — Sluit het schaaljtje, plaats het in de exsiccator, laat afkoelen tot kamertemperatuur en weeg tot op 0,1 mg.
- 2.1.5. — Neem het deksel van het schaaljtje en verwarm schaaljtje en deksel in de droogstoof gedurende 1 h.
- 2.1.6. — Handel als omschreven onder 2.1.4.
- 2.1.7. — Herhaal 2.1.5. en 2.1.6. tot het massaverlies tussen twee opeenvolgende wegingen niet meer dan 0,5 mg bedraagt of tot de massa toeneemt. Neem voor de berekening de kleinste massa.
- 2.1.8. — Bereken het vochtgehalte van het monster, in massa-percenten, met de formule :

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

waarin :

M_1 = massa, in grammen, van het schaaljtje volgens 2.1.2.

M_2 = massa, in grammen, van het schaaljtje volgens 2.1.6. of 2.1.7.

S = massa, in grammen, van de ingewogen hoeveelheid monster.

3. — Vetgehalte

Reagentia

Alle reagentia dienen « pro analyse » kwaliteit te zijn en mogen na verdampen geen grotere rest achterlaten dan aangegeven voor de blancoproef (3.1.). Indien nodig kunnen de reagentia opnieuw gedestilleerd worden na toevoeging van ongeveer 1 g botervet per 100 ml oplosmiddel.

Het benodigde water moet gedestilleerd zijn of van een zuiverheid die tenminste gelijk is aan die van gedestilleerd water.

Ammonia, ca. 25 % (m/m) NH_3 (densiteit bij 20°C ca. 0,91 g/ml), of een meer geconcentreerde oplossing van bekend gehalte.

Ethanol, 96 ± 2 % (v/v) of, indien niet voorhanden, ethanol gedenatureerd met methanol, ethyl-methyl-keton, benzeen, of petroleumether,

Diethylether, peroxidevrij.

Opmerking

Controleer of de diethylether peroxiden bevat. Breng daartoe in een van te voren met koolzuurgas gespoelde konische kolf met ingeslepen stop, 50 ml van de diethylether. Spoel opnieuw met koolzuurgas en breng zo snel mogelijk 15 ml ijsazijn en 1 ml

kaliumjodide 20 % oplossing in de kolf en sluit deze direct af. Schud de kolf zonder dat de vloeistof de glazen stop bevochtigt en bewaar de kolf gedurende 5 min in het donker. Voeg 75 ml water toe, meng en voeg vervolgens 5 ml stijfseloplossing toe. Peroxiden zijn afwezig indien de lagen kleurloos blijven.

Petroleumether, kooktraject tussen 30 en 60°C.

Mengsel van oplosmiddelen, kort tevoren bereid door mengen van gelijke volumina diethylether en petroleumether. (Waar het gebruik van het mengsel van oplosmiddelen is voorgeschreven mag ook diethylether of petroleumether worden gebruikt).

Apparatuur en hulpstoffen

Analytische balans

Extractiebuizen volgens Mojonnier (zie schets blz. 14) voorzien van geslepen glazen stoppen, kurken of andere stoppen die door de gebruikte oplosmiddelen niet worden aangetast.

Extraheer kurken van goede kwaliteit achtereenvolgens met diethylether en petroleumether. Dompel de aldus behandelde kurken in water van tenminste 60°C, houd het water tenminste 20 min op deze temperatuur en laat vervolgens afkoelen zodat de kurken, op het tijdstip van gebruik, met water verzadigd zijn.

Dunwandige kolfjes met platte bodem, van 150 tot 250 ml.

Droogstoof, goed geventileerd, met thermostaat (temperatuur geregeld op $102 \pm 2^\circ\text{C}$) of vacuumstoof (temperatuur 70 — 75°C, druk lager dan 50 mm Hg).

Kooksteentjes, vetvrij, niet poreus of broos, bijvoorbeeld glaskralen of stukjes siliciumcarbide (het gebruik van deze kooksteentjes is facultatief, zie alinea 3.2.1.).

Waterbad van 60-70°C.

3.1. — Blancoproef

Verricht, gelijktijdig met de bepaling van het vetgehalte van het monster, een blancoproef met 10 ml water. Volg daarbij de werkwijze hieronder beschreven met uitsluiting van alinea 3.2.2. Indien het resultaat van de blancoproef meer bedraagt dan 0,5 mg dienen de reagentia gecontroleerd en de onzuivere reagentia gezuiverd of vervangen te worden.

3.2. — Werkwijze

3.2.1. — Droog het kolfje (eventueel met kooksteentjes) in de droogstoof gedurende 30 min. tot 1 h. Laat het kolfje afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer en weeg tot op 0,1 mg.

- 3.2.2. — Weeg, hetzij rechtstreeks in de extractiebuis, hetzij door een verschilweging, ca. 1 g volle melkpoeder of ca. 1,5 g gedeeltelijk ontroomde of magere melkpoeder tot op 1 mg. Voeg 10 ml water toe en schud tot de melkpoeder volledig gedispergeerd is.
- 3.2.3. — Voeg 1,5 ml ammonia 25 % toe of een equivalente hoeveelheid van een meer geconcentreerde oplossing. Verwarm gedurende 15 min in het waterbad van 60-70° C en schud van tijd tot tijd. Koel daarna, bv. in stromend water.
- 3.2.4. — Voeg 10 ml ethanol toe en meng de vloeistoffen voorzichtig maar zorgvuldig in de open extractiebuis.
- 3.2.5. — Voeg 25 ml diethylether toe, sluit de extractiebuis, schud krachtig gedurende 1 min, en keer daarbij de extractiebuis herhaalde malen. Koel zo nodig in stromend water.
- 3.2.6. — Verwijder voorzichtig de stop en voeg 25 ml petroleumether toe ; gebruik de eerste milliliters om de stop en de binnenzijde van de hals van de extractiebuis af te spoelen en laat de spoelvloeistof in de extractiebuis lopen. Sluit de extractiebuis, schud en keer deze herhaaldelijk om gedurende 30 sec. Schud niet te krachtig indien niet gecentrifugeerd wordt volgens alinea 3.2.7.
- 3.2.7. — Laat de extractiebuis staan tot de bovenste vloeistoflaag helder is geworden en zich scherp van de waterlaag heeft gescheiden. Het scheiden van de lagen kan eveneens geschieden met behulp van een geschikte vonkvrije centrifuge.
- 3.2.8. — Verwijder de stop, spoel deze evenals de binnenzijde van de hals van de extractiebuis met enkele milliliters van het mengsel van de oplosmiddelen, laat de spoelvloeistof in de extractiebuis lopen. Breng, door decanteren, de bovenste vloeistoflaag zorgvuldig en zo volledig mogelijk over in het kolfje (3.2.1.). Voeg eventueel een weinig water toe teneinde het scheidingsvlak van de twee vloeistoflagen hoger te brengen en het decanteren te vergemakkelijken.
- 3.2.9. — Spoel de buiten- en de binnenzijde van de hals van de extractiebuis met enkele milliliters van het mengsel van oplosmiddelen. Laat de spoelvloeistof van de buitenzijde van de extractiebuis in het kolfje vloeien en die van de binnenzijde van de hals in de extractiebuis.
- 3.2.10. — Verricht een tweede extractie door de bewerkingen aangegeven in de alinea's 3.2.5. tot en met 3.2.9. te herhalen, gebruik daarbij slechts 15 ml diethylether en 15 ml petroleumether.

3.2.11. — Verricht een derde extractie volgens 3.2.10. doch laat de laatste spoeling (3.2.9.) achterwege.

Opmerking

Bij magere melkpoeder is deze derde extractie niet nodig.

3.2.12. — Verwijder zorgvuldig, hetzij door verdamping hetzij door destillatie, zoveel mogelijk van de oplosmiddelen (ethanol inbegrepen). Indien het kolfje een kleine inhoud heeft zal het noodzakelijk zijn een gedeelte van de oplosmiddelen na elke extractie te verwijderen.

3.2.13. — Verwarm, zodra geen geur van oplosmiddelen meer waarneembaar is, het kolfje liggend in de droogstoof gedurende 1 h.

3.2.14. — Laat het kolfje afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer zoals hierboven (3.2.1.) aangegeven en weeg het tot op 0,1 mg.

3.2.15. — Herhaal de bewerkingen 3.2.13. en 3.2.14. met een verwarming gedurende 30 tot 60 min, tot de massa niet meer afneemt.

3.2.16. — Voeg 15 tot 25 ml petroleumether toe om te controleren of de geëxtraheerde stoffen volledig oplosbaar zijn. Verwarm zacht en zwenk, tot al het vet opgelost is.

3.2.16.1. — Indien de geëxtraheerde stoffen volledig in petroleumether oplossen, is de massa vet het verschil tussen de wegingen 3.2.1. en 3.2.15.

3.2.16.2. — Indien dit niet het geval is of in geval van twijfel en steeds bij geschillen, extraheer dan het vet in het kolfje volledig door herhaaldelijk wassen met warme petroleumether. Laat onopgeloste bestanddelen vóór het decanteren steeds bezinken. Spoel de buitenzijde van de hals van de kolf 3 maal.

Verwarm het kolfje liggend gedurende 1 h in de droogstoof, laat het afkoelen tot de temperatuur van de weegkamer zoals boven aangegeven (3.2.1.) en weeg tot op 0,1 mg. De massa vet is het verschil tussen de massa vastgesteld bij weging 3.2.15. en de massa bij deze uiteindelijke weging.

3.2.17. — Bereken het vetgehalte van het monster, in massaprocenten, met de formule :

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

Waarin :

- M_1 = massa, in grammen, van het kolfje met het vet na de bewerking 3.2.15.
 M_2 = massa, in grammen, van het kolfje na de bewerking 3.2.1. of indien onoplosbare bestanddelen aanwezig waren, zie 3.2.16.2., na de bewerking 3.2.16.2.
 B_1 = massa, in grammen, van het kolfje van de blancoproef na de bewerking 3.2.15.
 B_2 = massa, in grammen, van het kolfje van de blancoproef na de bewerking 3.2.1. of, indien onoplosbare bestanddelen aanwezig waren, zie 3.2.16.2., na de bewerking 3.2.16.2.
S = massa, in grammen, van de ingewogen hoeveelheid monster.

4. — Melkzuurgehalte

Reagentia

Alle reagentia dienen « pro analyse » kwaliteit te zijn.
Het benodigde water moet gedestilleerd zijn of van een zuiverheid die tenminste gelijk is aan die van gedestilleerd water.

Kopersulfaat-oplossing : los 250 g kopersulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) op in water en verdun tot 1.000 ml.

Calciumhydroxide-suspensie : wrijf 300 g calciumhydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) aan met water in een mortier ; gebruik in totaal 900 ml.
Bewaar de verkregen suspensie in een goed gesloten fles.

Zwavelzuur : 95,5 — 97 % (m/m) H_2SO_4 .

Zwavelzuur-kopersulfaat-oplossing : voeg 0,5 ml kopersulfaat-oplossing toe aan 300 ml zwavelzuur en meng.

p.HydroxidifenyI-reagens : los 1,5 g p.hydroxidifenyI ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) op in 10 ml 5 % NaOH-oplossing onder roeren en zacht verwarmen.

Vul aan tot 100 ml met water.

Bewaar deze oplossing in een fles van bruin glas in het donker.
Het reagens is niet langer dan 4 weken houdbaar.

Standaard melkzuuroplossing : los kort voor het gebruik 0,1067 g lithiumlactaat ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$) op in water en verdun tot 1.000 ml. Deze oplossing komt overeen met 0,1 mg melkzuur per ml.

Apparatuur en hulpstoffen

Analytische balans

Spectrofotometer of colorimeter, geschikt voor het meten bij een golflengte van 570 nm.

Waterbad van $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Kokend waterbad

Reageerbuisen (afmetingen 25×160 mm).

4.1. — Werkwijze

870

4.1.1. — Weeg $\frac{\quad}{a}$ g van het monster af tot op 0,1 g.
a — 8,7

(waarin a = het procentisch gehalte aan vetvrije droge melkbestanddelen van het monster). Los deze hoeveelheid op in 100 ml water.

4.2.1. — Pipetteer van de aldus verkregen oplossing 5 ml in een maatkolf van 50 ml en verdun met water tot ongeveer 35 ml. Breng ten behoeve van een blancobepaling in een tweede maatkolf van 50 ml ongeveer 35 ml water. Behandel beide kolven als beschreven in 4.1.3.

4.1.3. — Voeg onder voortdurend schudden 5 ml kopersulfaat-oplossing toe, laat de kolven gedurende 10 min staan bij kamertemperatuur.

Voeg vervolgens op dezelfde wijze 5 ml calciumhydroxide-suspensie toe, laat de kolven wederom gedurende 10 min staan bij kamertemperatuur. Vul aan met water tot 50 ml, schud krachtig tot de inhoud van de kolven homogeen is en filtreer; verwijder de eerste druppels van het filtraat.

4.1.4. — Pipetteer in een reageerbuis 1 ml van het onder 4.1.3. verkregen filtraat en in een andere gelijke buis 1 ml van het filtraat verkregen door behandeling van het water met de klaringsvloeistoffen. Behandel beide buizen als volgt: voeg 6,0 ml zwavelzuur-kopersulfaat-oplossing toe en meng. Verwarm de buizen, los afgedekt, gedurende 5 min. in een kokend waterbad en koel snel af tot kamertemperatuur.

Voeg 2 druppels p.hydroxidifenylnyl-reagens toe en schud krachtig teneinde het reagens zeer fijn in de vloeistof te verdelen.

Plaats de buizen in een waterbad van $30 \pm 2^\circ\text{C}$, laat ze er gedurende 90 sec in een kokend waterbad en koel vervolgens inhoud van de buizen, waarbij deze wederom los worden afgedekt, gedurende 90 sec. in een kokend waterbad en koel vervolgens snel af tot kamertemperatuur.

4.1.5. — Meet het verschil in extinctie tussen beide vloeistoffen bij een golflengte van 570 nm.

Zet het verschil in extinctie met behulp van de ijklijn (4.2.) om in het percentage melkzuur in de gereconstitueerde melk bereid op de onder 4.1.1. beschreven wijze.

Herhaal het onderzoek, indien het percentage melkzuur in de gereconstitueerde melk groter dan 0,010 % blijkt te zijn, met een passende verdunning van het filtraat, verkregen onder 4.1.3.

4.2. — IJklijn

Pipetteer in een vijftal maatkolven van 50 ml telkens 5 ml gereconstitueerde melk bereid uit melkpoeder op de wijze als aangegeven onder 4.1.1. Dit melkpoeder dient deugdelijk te zijn en bereid uit melk die geen of nagenoeg geen verzuringsmelkzuur bevat.

Breng in deze maatkolven respectievelijk 0-1-2-3 en 4 ml van de standaardmelkzuuroplossing en vul aan met water tot ongeveer 35 ml. Hierdoor ontstaat een reeks met resp. 0 - 0,002 - 0,004 - 0,006 - 0,008 % toegevoegd melkzuur aan de gereconstitueerde melk.

Handel verder als beschreven onder 4.1.3. en 4.1.4. en meet de extinctie tegen water. Zet deze extincties af als functie van het percentage toegevoegd melkzuur. Trek door de punten de best passende rechte en verplaats deze evenwijdig aan zichzelf naar de oorsprong. De ijklijn behoort een rechte te zijn.

4.3. — Beoordeling van het resultaat

Melkzuur wordt geacht slechts in sporen aanwezig te zijn indien het gehalte verkregen volgens 4.1.5. niet meer dan 0,020 % bedraagt.

5. — Fosfatase

Verricht de fosfataseproef volgens het onder 5.1. gegeven voorschrift. Bevestig een positief resultaat met het onder 5.2. gegeven voorschrift.

5.1. — Fosfatase ; kwalitatief

Reagentia

Alle reagentia dienen « pro analyse » kwaliteit te zijn.

Het benodigde water moet gedestilleerd zijn of van een zuiverheid die tenminste gelijk is aan die van gedestilleerd water.

Substraatoplossing : los 0,11 g dinatriumfenylfosfaat

($C_6H_5OPO_3Na_2 \cdot 2H_2O$) op in 80 à 90 ml water, voeg hierbij 3 ml 0,25 natriumcarbonaatoplossing (2,65 g watervrij natriumcarbonaat per 100 ml) en vul aan tot 100 ml. Bereid dagelijks een verse oplossing.

B.C.C.-reagens : los 23 mg 2,6-dibroomchinon-4-chloorimide ($O=C_6H_2Br_2=NCI$) op in 5 ml ethanol 96 % (v/v). Bewaar de oplossing op een koele donkere plaats en niet langer dan 4 weken. Iso-amylalcohol ; neutraal t.o.v. broomthymolblauw. Neutraliseer zo nodig met 0,1 n natriumhydroxide-oplossing.

5.1.1. — Werkwijze

- 5.1.1.1. — Maak van het monster met water, zonder verwarming een zodanige oplossing dat de concentratie aan vetvrije droge melkbestanddelen ongeveer overeenkomt met die van ondermelk.
- 5.1.1.2. — Pipetteer in twee reageerbuizen elk 0,5 ml van de aldus bereide oplossing zonder de wanden te bevochtigen. Plaats één der beide buizen gedurende 5 min in een kokend waterbad en koel daarna af tot kamertemperatuur.
- 5.1.1.3. — Voeg aan beide reageerbuizen met een meetpipet 5 ml van de subtraatoplossing toe en bewaar deze afgedekt bij een temperatuur tussen 30 en 35° C gedurende 1 h.
- 5.1.1.4. — Voeg 6 druppels van het B.C.C.-reagens toe en meng. Vergelijk na 5 min. de kleuren van beide buizen.
- 5.1.1.5. — Indien de inhoud van de buis met de verhitte melk zwakker gekleurd is dan die van de andere buis wordt de reactie geacht positief te zijn.
- 5.1.1.6. — Voeg in twijfelgevallen aan beide buizen 2 ml iso-amylalcohol toe. Keer de buizen daarop achtmaal voorzichtig om, telkens wachtend totdat de vloeistoflagen zich gescheiden hebben. Eventueel gevormde blauwe of blauwgroene kleurstof lost in de heldere bovenlaag op, waardoor de kleurvergelijking aanzienlijk wordt verscherpt.

Opmerking

Grote reinheid van buizen, pipetten, stoppen enz. is een eerste eis, daar geringe verontreinigingen bv. met fenolen en daarmee verwante stoffen een positieve reactie kunnen veroorzaken. Voorts bedenken men dat speeksel fosfatase bevat.

5.2. — Fosfatase ; kwantitatief

Reagentia

Alle reagentia dienen « pro analyse » kwaliteit te zijn.

Het benodigde water moet gedestilleerd zijn of van een zuiverheid die tenminste gelijk is aan die van gedestilleerd water en vers gekookt.

Bariumboraatbuffer, pH $10,6 \pm 0,1$

Vermijd intensief contact tussen de buffer en lucht, in verband met ongewenste carbonaatvorming.

Los 25,0 g carbonaatzvrij bariumhydroxide ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) onder verwarmen op in water. Koel af tot kamertemperatuur en verdun tot 500 ml.

Los 11,0 g boorzuur (H_3BO_3) op in water en verdun tot 500 ml. Verwarm beide oplossingen tot 50° C, voeg ze bijeen en meng zorgvuldig. Koel het mengsel af tot kamertemperatuur. Breng zonodig de pH met bariumhydroxide-oplossing op $10,6 \pm 0,1$ en

filtreer snel. Bewaar de oplossing in een goed gesloten fles.

Verdun de oplossing vóór gebruik met een gelijk volume water.
Natriummetabooraat-oplossing : los 6,0 g watervrij natriummetabooraat (NaBO_2) of 12,6 natriummetabooraat ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 20,0 g natriumchloride (NaCl) op in water en verdun tot 1.000 ml.

Gebufferde-substraatoplossing : los 0,5 g dinatriumfenylfosfaat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OPO}_3\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) op in 4,5 ml natriummetabooraat-oplossing. Verwijder uit deze oplossing eventueel aanwezige vrij fenol. Voeg hiertoe 1 druppel B.C.C.-reagens toe en laat de oplossing gedurende 30 min staan. Schud de eventueel gevormde blauwe kleurstof uit met 2,5 ml butanol-1 en werp de butanol weg. Herhaal deze extractie zo nodig totdat de butanol-laag ongekleurd blijft.

Deze geconcentreerde oplossing kan gedurende enkele dagen worden bewaard in een koelkast. Herhaal de kleurontwikkeling en de extractie dagelijks vóór het gebruik van de oplossing.

Pipetteer voor het bereiden van de gebufferde-substraatoplossing 1 ml van de vorige oplossing in een maatkolf van 100 ml en vul deze aan met de bariumboraatbuffer. Bereid deze gebufferde-substraatoplossing onmiddellijk vóór het gebruik.

Zink- kopersulfaat reagens : los 3,0 zinksulfaat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 0,6 g kopersulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) op in water en vul aan tot 100 ml.

B.C.C.-Reagens : los 0,040 g 2,6-dibroomchinon-4-chloorimide ($\text{O}=\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2=\text{NCl}$) op in 10 ml ethanol 96 % (v/v).

Bewaar de oplossing in een fles van bruin glas in een koelkast. Verdunningsvloeistof : verdun 10 ml natriummetabooraat-oplossing tot 100 ml met water.

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

Standaardoplossing, 200 μg fenol per ml : los $0,200 \pm 0,001$ g kleurloze en kristallijne fenol op in water en verdun tot 100 ml. Deze oplossing kan in de koelkast gedurende enkele maanden bewaard worden.

Verdun 10 ml van deze oplossing tot 100 ml met water.

Indien het fenol niet kleurloos en kristallijn is, zuiver het dan door destillatie.

Apparatuur en hulpstoffen

Balans, waarop tot op 1 mg nauwkeurig kan worden gewogen.

Spectrofotometer, geschikt voor het meten bij een golflengte van 610 nm, met bijbehorende cuvetten.

Waterbad, thermostatisch geregeld op een temperatuur van $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

Reageerbuizen, met een inwendige diameter van 16 tot 18 mm.
Filtreerpapier voor kwalitatieve doeleinden, langzaam filtrerend voor fijne neerslagen.

Voorzorgsmaatregelen

Verricht de bepaling niet in direct zonlicht, doch bij diffuus daglicht of bij kunstlicht.

Reinig al het glaswerk zorgvuldig en spoel het daarna met uitgekookt gedestilleerd water of stoom het uit. Gebruik geen reinigingsmiddelen en desinfectiemiddelen die fenolen bevatten. Gebruik voor het afsluiten van het glaswerk geen stoppen van kunststof; deze kunnen fenolen bevatten.

Vermijd bij het pipetteren verontreiniging van de vloeistoffen met speeksel, dit bevat fosfatase.

5.2.1. — Werkwijze

870

5.2.1.1. — Weeg $\frac{870}{a}$ g van het monster af tot op 0,1 g
a — 8,7

(waarin a = het procentisch gehalte aan vetvrije droge melkbestanddelen van het monster).

Los deze hoeveelheid op in 100 ml water. De oplostemperatuur mag nooit hoger zijn dan 35°C .

5.2.1.2. — Pipetteer in 2 reageerbuizen elk 1 ml van de onder 5.2.1.1. bereide gereconstitueerde melk.

5.2.1.3. — Verwarm één der buizen in kokend water gedurende 2 min. en koel deze af tot kamertemperatuur. De inhoud dient voor de blancobepaling.

Behandel hierop beide buizen zoals hieronder aangegeven.

5.2.1.4. — Voeg 10 ml gebufferde-substraatoplossing toe, meng en plaats de buizen in het waterbad van $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

5.2.1.5. — Laat de buizen gedurende 60 min. in het waterbad staan, wervel gedurende deze tijd de vloeistof in de buizen af en toe rond.

5.2.1.6. — Verwarm direct daarop de buizen in kokend water gedurende 1 min. en koel snel af tot kamertemperatuur.

5.2.1.7. — Voeg 1 ml zink-kopersulfaat reagens toe, meng en filtreer door droog filtreerpapier. Werp de eerste druppels filtraat weg. Het filtraat moet volkomen helder zijn, filtreer zo nodig nogmaals over hetzelfde filter.

5.2.1.8. — Pipetteer van elk filtraat 5 ml in een reageerbuis, voeg 5 ml natriummetaboraatoplossing toe en 0,1 ml B.C.C.-reagens. Laat de buizen bij kamertemperatuur staan gedurende 30 min.

5.2.1.9. — Meet de extinctie van de monsteroplossing tegen de blanco bij een golflengte van 610 nm.

5.2.1.10. — Herhaal de bepaling indien blijkt dat de extinctie van de gereconstitueerde melk die van de ijkvloeistof met 20 μg fenol per ml overschrijdt. Bereid een passende verdunning van het monster door gereconstitueerde melk als verkregen onder 5.2.1.1. te verdunnen met een passende hoeveelheid gereconstitueerde melk waarin de fosfatase vernietigd is door verhitting op een wijze als beschreven onder 5.2.1.3.

5.2.2. — IJklijn.

5.2.2.1. — Pipetteer, elk in een maatkolf van 100 ml : 2,5 - 5 - 7,5 en 10 ml van de standaardoplossing en vul aan met water.

5.2.2.2. — Pipetteer in 5 reageerbuizen 1 ml water, resp. 1 ml van elke ijkvloeistof (5.2.2.1.) teneinde een vergelijkingsreeks te verkrijgen met resp. 0 - 5 - 10 - 15 en 20 μg fenol.

5.2.2.3. — Voeg achtereenvolgens aan elke buis toe 1 ml koper-sulfaat-oplossing, 5 ml verdunningsvloeistof, 3 ml water en 0,1 ml B.C.C.-reagens; meng. Laat de buizen bij kamertemperatuur staan gedurende 30 min.

5.2.2.4. — Meet de extinctie van de reeksleden tegen water bij een golflengte van 610 nm.

5.2.2.5. — Zet in een grafiek de gemeten extincties uit tegen de hoeveelheden fenol in μg , als vermeld onder 5.2.2.2. en trek door de punten de beste passende rechte. Construeer de ijklijn evenwijdig aan deze rechte door de oorsprong.

5.2.3. — Berekening.

5.2.3.1. — Zet de extinctie, vastgesteld onder 5.2.1.9. met behulp van de ijklijn of met behulp van een uit deze ijklijn berekende factor, om in μg fenol.

5.2.3.2. — De fosfatase-activiteit, uitgedrukt in μg fenol per ml gereconstitueerde melk, is :

$$2,4 \times P$$

waarin P = het aantal μg fenol volgens 5.2.3.1.

5.2.3.3. — Indien verdund is op de onder 5.2.1.10. beschreven wijze, vermenigvuldig dan het onder 5.2.3.2. verkregen resultaat met verdunningsfactor.

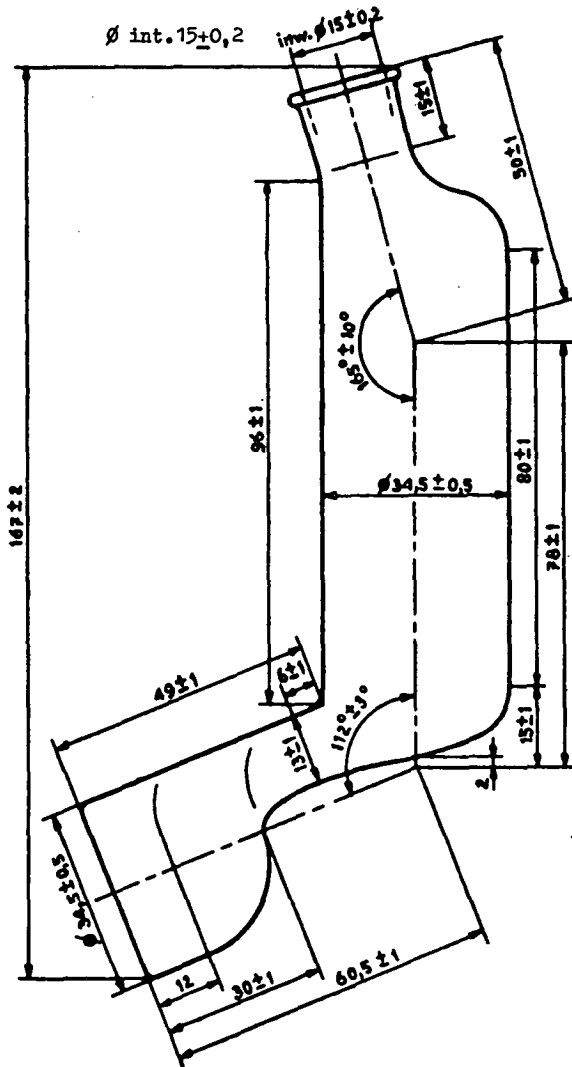
5.2.4. — Beoordeling van het resultaat.

Fosfatase wordt afwezig geacht indien de fosfatase-activiteit 4 μg fenol of minder per ml gereconstitueerde melk bedraagt.

Mesures en mm
Maten in mm

1624

Tube à extraction suivant Mojonnier
conicité intérieure du col 1:10
Extractiebuis volgens Mojonnier
hals inw. conisch 1:10



inhoud van het voetje $21,5 \pm 0,5$ ml
glasdikte $1,25 \pm 0,25$ mm
contenu du pied $21,5 \pm 0,5$ ml
épaisseur du verre $1,25 \pm 0,25$ mm