

### BESCHIKKING

van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie  
betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden van  
onderzoek inzake geëvaporeerde en gecondenseerde melk

M (73) 12

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 geëva-  
poreerde en gecondenseerde melk, M (65) 6,

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-referentie-  
methoden van onderzoek betreffende geëvaporeerde en geconden-  
seerde melk, M (68) 50, dient te worden vervangen door een Beschik-  
king 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 onder-  
zoek inzake geëvaporeerde en gecondenseerde melk 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) 6 inzake de harmo-  
nisatie der wetgevingen betreffende geëvaporeerde en geconden-  
seerde melk, M (68) 50, vervalt.

GEDAAN te Brussel, op 17 juli 1973.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

L.J. BRINKHORST

**ANALYSEMETHODEN**  
**van onderzoek inzake geëvaporeerde en gecondenseerde melk**

1. — Voorbehandeling van het monster

1.1. — Monster bestemd voor chemisch onderzoek

1.1.1. — Geëvaporeerde melk

Schud en kantel de verpakking (gekoeld bewaarde monsters dienen van te voren op ca. 20° C te worden gebracht). Open de verpakking. Giet de inhoud langzaam over in een monsterpot, voorzien van een goed passend deksel. Meng door herhaald overgieten, daarbij ervoor zorgend dat al het vet of andere bestanddelen die aan de wand of de bodem van de oorspronkelijke verpakking gehecht zijn, in het monster worden opgenomen. Breng tenslotte de geëvaporeerde melk zo volledig mogelijk over in de monsterpot en sluit deze.

Verwarm zonodig de gesloten verpakking in een waterbad van 40-60° C. Schud de verpakking om de 15 min. krachtig. Neem na 2 h de verpakking uit het waterbad en laat afkoelen tot kamertemperatuur. Verwijder het gehele deksel en meng de inhoud zorgvuldig door roeren met een lepel of spatel (onderzoek het monster niet als zich vet heeft afgescheiden).

1.1.2. — Gecondenseerde melk met suiker

Open de verpakking en meng de inhoud zorgvuldig met een lepel of spatel (gekoeld bewaarde monsters dienen van tevoren op ca. 20° C te worden gebracht). Roer met een op en neergaande beweging zodat de bovenste en onderste lagen goed met de overige inhoud worden gemengd. Zorg er voor dat alle bestanddelen die aan de wand, bodem en deksel gehecht zijn eveneens in het monster worden opgenomen. Breng de inhoud vervolgens zo volledig mogelijk over in een monsterpot, voorzien van een goed sluitend deksel, en sluit deze.

Verwarm zonodig de gesloten verpakking in een waterbad van 30-40° C. Open de verpakking, schraap alle bestanddelen die aan de binnenzijde van de verpakking gehecht zijn los en breng de inhoud over in een monsterpot van zodanige grootte dat grondig kan worden gemengd. Roer vervolgens tot de gehele massa homogeen is en sluit de monsterpot.

Breng, wanneer de verpakkingseenheid een tube is, de inhoud daarvan over in een monsterpot. Snijd de tube open, schraap alle aan de wand gehechte bestanddelen los, breng deze eveneens over in de monsterpot en meng zorgvuldig. Sluit de pot met een goed sluitend deksel.

1.2. — Monster bestemd voor microbiologisch onderzoek

1.2.1. — Geëvaporeerde melk (\*)

1.2.2. — Gecondenseerde melk met suiker (\*)

2. — Droge stofgehalte

Apparatuur en hulpstoffen

Analytische balans

Schaaltjes bij voorkeur van aluminium, nikkel of roestvrij staal. 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  $102 \pm 2^\circ$  C. In de gehele stoof dient een gelijke temperatuur te heersen.

Exsiccator, voorzien van silicagel met vochtigheidsindicator.

Kwartszand of zeezand, met zoutzuur behandeld, dat een zeef met 10 openingen per cm passeert maar door een zeef met 40 openingen per cm wordt tegengehouden en voldoet aan de volgende controlebepaling.

Verwarm ongeveer 25 g zand gedurende 2 h in de droogstoof en weeg, een en ander zoals aangegeven in 2.1.1. tot 2.1.3. Bevochtig met gedestilleerd water, verwarm in de droogstoof en weeg opnieuw. Het verschil tussen beide wegingen mag niet meer dan 2,0 mg bedragen.

Zet voor de reiniging van nog niet met zoutzuur behandeld zand of van zand dat niet aan de controlebepaling voldoet, het zand gedurende 3 dagen, onder af en toe roeren, weg onder zoutzuur 25 %. Was vervolgens tot zuurvrij en droog tenslotte bij  $160^\circ$  C.

Korte glazen staafjes

Waterbad, flink kokend

2.1. — Werkwijze :

2.1.1. — Breng ca. 25 g zand en een kort glasstaafje in een schaalteje.

2.1.2. — Verwarm het schaalteje met de inhoud en het afgenomen deksel in de droogstoof gedurende 2 h.

2.1.3. — Plaats het gesloten schaalteje in een exsiccator, laat afkoelen tot kamertemperatuur en weeg tot op 0,1 mg.

---

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

- 2.1.4. — Schuif het zand naar één kant van het schaalteje. Breng in de vrijgekomen ruimte ongeveer 1,5 g van het goed gemengde monster, sluit het schaalteje en weeg tot op 0,1 mg.
- 2.1.5. — Neem het deksel af, voeg 5 ml gedestilleerd water toe en meng dit met het monster met behulp van het staafje. Verdeel vervolgens het mengsel over het zand. Laat het staafje in het mengsel staan.
- 2.1.6. — Verwarm het schaalteje op het flink kokend waterbad tot het vocht verdampt is ; dit is gewoonlijk in 20 min. het geval. Roer daarbij van tijd tot tijd voorzichtig dooreen.
- 2.1.7. — Verwarm het schaalteje en het afgenomen deksel in de droogstoof gedurende 1 1/2 h.
- 2.1.8. — Sluit het schaalteje, plaats het in de exsiccator, laat afkoelen tot kamertemperatuur en weeg tot op 0,1 mg.
- 2.1.9. — Neem het deksel van het schaalteje en verwarm schaalteje en deksel in de droogstoof gedurende 1 h.
- 2.1.10. — Handel zoals omschreven onder 2.1.8.
- 2.1.11. — Herhaal 2.1.9. en 2.1.10 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.
- 2.1.12. — Bereken het gehalte aan droge stof van het monster, in massaprocenten, met de formule :

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

waarin :

$M_1$  = massa, in grammen, van het schaalteje volgens 2.1.3.

$M_2$  = massa, in grammen, van het schaalteje volgens 2.1.8., 2.1.10 of 2.1.11.

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)  $\text{NH}_3$  (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 Mojonier (zie schets blz. 24) 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 ± 2° C) of vacuümstoof (temperatuur 70-75° C, druk lager dan 50 mm Hg).

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

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 droogstoomgedurende 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. — Roer het voorbehandelde monster en weeg direct daarop, hetzij rechtstreeks, hetzij door een verschilweging, 4 tot 5 g van het goed gemengde monster tot op 1 mg in de extractiebuis. Voeg ca. 7 ml water toe en zwenk onder zacht verwarmen (40 tot 50° C) tot het produkt volledig gedispergeerd is.

3.2.3. — Voeg 1,5 ml ammonia 25 % toe of een equivalente hoeveelheid van een meer geconcentreerde oplossing en meng.

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 zonedig 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 zorg-

vuldig 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 3.2.4 tot en met 3.2.9 te herhalen ; gebruik daarbij slechts 5 ml ethanol, 15 ml diethylether en 15 ml petroleumether.
- 3.2.11. — Verricht een derde extractie volgens 3.2.10 doch laat de toevoeging van ethanol en de laatste spoeling achterwege (3.2.9).

#### Opmerking

Bij geëvaporeerde afgeroomde melk en bij gecondenseerde afgeroomde melk met suiker 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 massa-procenten, 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

##### 4.1. — Geëvaporeerde melk

###### 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)  $\text{H}_2\text{SO}_4$

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



p-Hydroxidifenyl-reagens : los 1,5 g p-hydroxidifenyl ( $C_6H_5C_6H_4OH$ ) 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 ( $CH_3CHOHCOOLi$ ) 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  $30 \pm 2^\circ C$

Kokend waterbad

Reageerbuizen (afmetingen  $25 \times 160$  mm)

#### 4.1.1. — Werkwijze

87

4.1.1.1. — Weeg  $\frac{87}{a - 8,7}$  g van het monster af tot op 0,1 g

(waarin a = het procentisch gehalte aan vetvrije droge melkbestanddelen van het monster). Verdun deze hoeveelheid met 10 ml water.

4.1.1.2. — 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 4.1.1.3.

4.1.1.3. — 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 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.

4.1.1.4. — Pipetteer in een reageerbuis 1 ml van het onder 4.1.1.3 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-hydroxidifenyl-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 15 min. in staan en schud van tijd tot tijd. Verhit de inhoud van de buizen, waarbij deze wederom los worden afgedekt, gedurende 90 sec. in een kokend waterbad en koel vervolgens snel af tot kamertemperatuur.

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

Zet het verschil in extinctie met behulp van de ijklijn (4.1.2) om in het percentage melkzuur in de gereconstitueerde melk bereid op de onder 4.1.1.1 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 4.1.1.3.

4.1.2. — IJklijn

Pipetteer in een vijftal maatkolven van 50 ml telkens 5 ml gereconstitueerde melk bereid uit geëvaporeerde melk op de wijze aangegeven onder 4.1.1.1. Deze geëvaporeerde melk dient deugdelijk te zijn en bereid uit melk die geen of nagenoeg geen verzuringsmelkzuur bevat.

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

Handel verder als beschreven onder 4.1.1.3 en 4.1.1.4 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.

4.1.3. — Beoordeling van het resultaat

Melkzuur wordt geacht slechts in sporen aanwezig te zijn indien het gehalte verkregen volgens 4.1.1.5 niet meer dan 0,020 % bedraagt.

4.2. — Gecondenseerde melk met suiker

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.

Verdund zwavelzuur : ca. 1 n  $H_2SO_4$ .

Zwavelzuur 1 : 1 ; meng 1 volume sterk zwavelzuur (ca. 96 % m/m  $H_2SO_4$ ) met 1 volume water.

Fosfowolframzuuroplossing : los 20 g fosfowolframzuur ( $12WO_3 \cdot H_3PO_4 \cdot xH_2O$ ) op in water en verdun tot 100 ml.

Natriumsulfaat watervrij ( $Na_2SO_4$ ).

Diethylether, (peroxidevrij) : schud ca. 1 l diethylether kort voor gebruik met 90 ml water en 10 ml van een ijzer (II) sulfaat-oplossing (bereid door 60 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  op te lossen in 110 ml water waaraan 6 ml geconcentreerd zwavelzuur is toegevoegd). Was vervolgens tweemaal met 100 ml water. Gebruik deze diethylether slechts op de dag van reiniging.

Zwavelzuur : 95,5-97 % (m/m)  $H_2SO_4$

Kopersulfaatoplossing : los 25 g kopersulfaat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) op in water en verdun tot 100 ml.

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

p-Hydroxidifenyl-reagens : los 1,5 g p-hydroxidifenyl ( $C_6H_5C_6H_4OH$ ) 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 ( $CH_3CHOHCOOLi$ ) op in water en verdun tot 1.000 ml. Deze oplossing komt overeen met 0,1 mg melkzuur per ml.

Apparatuur en hulpstoffen

Perforator voor 50-75 ml vloeistof

Balans waarop tot op 1 mg nauwkeurig kan gewogen worden.

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

Waterbad van  $30 \pm 2^\circ C$

Waterbad elektrisch verwarmd

Reageerbuizen (afmetingen  $25 \times 160$  mm)

#### 4.2.1. — Werkwijze

4.2.1.1. — Weeg  $15,0 \pm 0,1$  g van het monster af in een beerglaasje van 100 ml. Breng deze hoeveelheid monster met warm water kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml tot een totaal volume van 75 à 80 ml is verkregen en koel af tot kamer-

temperatuur. Voeg 4 ml  $H_2SO_4$  1 n toe en zwenk voorzichtig. Voeg vervolgens 3 ml fosfowolframzuuroplossing toe en vul aan met water tot de merkstreep. Schud de kolfinhoud krachtig tot dat deze homogeen is een filtreer door een vouwfilter.

4.2.1.2. — Meet met een maatcilinder 50 ml van het verkregen filtraat af en breng dit over in een bekersglasje van 100 ml, waarin zich ca. 10 g watervrij natriumsulfaat bevindt. Breng het natriumsulfaat in oplossing door verwarming op een kokend waterbad terwijl af en toe wordt geroerd. Koel af tot ca. 30° C en breng de inhoud van het bekersglasje over in een perforator, waarin zich 0,5 ml zwavelzuur 1 : 1 bevindt. Spoel het bekersglasje na met een weinig water.

4.2.1.3. — Breng ca. 100 ml peroxidevrije diethylether in een vetkolfje van 250 ml, waarin tevoren wat fijn puimsteen is gebracht en plaats de perforator op het kolfje. Perforeer gedurende 5 h op een elektrisch verwarmd waterbad zodanig dat de extractie reproduceerbaar verloopt.

4.2.1.4. — Voeg na het perforeren aan de inhoud van het kolfje 20 ml water toe en destilleer de diethylether zeer zorgvuldig af. Neem het kolfje direct na het afdestilleren van de diethylether van het waterbad, laat afkoelen en spoel de inhoud van het kolfje met water kwantitatief over in een maatkolf van 200 ml, vul aan met water en meng.

4.2.1.5. — Pipetteer in een reageerbuis 1 ml van de verkregen oplossing en in een andere gelijke buis 1 ml water. Behandel beide buizen als volgt : voeg 6,0 ml zwavelzuur-kopersulfaatoplossing 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-hydroxidifenyyl-reagens toe en schud krachtig teneinde het reagens zeer fijn in de vloeistof te verdelen.

Plaats de buizen in een waterbad van  $30 \pm 2^\circ$  C, laat ze er gedurende 15 min. in staan en schud van tijd tot tijd. Verhit de inhoud van de buizen, waarbij deze wederom los worden afgedekt, gedurende 90 sec. in een kokend waterbad en koel vervolgens snel af tot kamertemperatuur.

4.2.1.6. — Meet het verschil in extinctie tussen beide vloeistoffen bij een golfengte van 570 nm.

Zet het verschil in extinctie met behulp van de ijklijn (4.2.2.) om in mg melkzuur. Bereken het percentage melkzuur (M) in de gereconstitueerde melk met de formule :

$$M = \frac{8,7 \times 0,001 \times Z}{0,15 \times a}$$

waarin :

Z = het aantal mg melkzuur

a = het gehalte vetvrije droge melkbestanddelen van het monster.

Herhaal het onderzoek, indien het percentage melkzuur in de gereconstitueerde melk groter dan 0,010 % blijkt te zijn, met een passende verdunning van de oplossing verkregen onder 4.2.1.4.

#### Opmerking

Controleer, indien verhoogde melkzuurgehalten worden gevonden, of de bewerkingen onder 4.2.1.1 t/m 4.2.1.4 eventueel aanleiding geven tot verhoogde extincties door een blancobepaling te verrichten met 15 ml water naast de bepalingen op de monsters.

#### 4.2.2. — IJklijn

Weeg van een monster verse gesuikerde gecondenseerde melk 4 hoeveelheden elk van  $15,0 \pm 0,1$  g af in bekersglasjes van 100 ml.

Voeg van de standaard-melkzuuroplossing aan de afgewogen hoeveelheden gecondenseerde melk respectievelijk 0 - 10 - 20 en 30 ml toe, zodat een reeks ontstaat met resp. 0 - 1 - 2 en 3 mg toegevoegd melkzuur.

Handel verder als beschreven onder 4.2.1.1. tot en met 4.2.1.5. en meet de extinctie tegen water. Zet deze extincties af als functie van het aantal mg toegevoegd melkzuur. Trek door de punten de best passende rechte en verplaats deze evenwijdig aan zichzelf naar de oorsprong. De ijklijn dient een rechte te zijn.

#### 4.2.3. — Beoordeling van het resultaat

Melkzuur wordt geacht slechts in sporen aanwezig te zijn indien het gehalte verkregen volgens 4.2.1.6. 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 M 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 ( $O=C_6H_2Br_2=NCl$ ) 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 zonodig met 0,1 n natriumhydroxide-oplossing.

### 5.1.1. — Werkwijze

5.1.1.1. — Maak van het monster met water, zonder verwarming een zodanige verdunning 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 substraatoplossing toe en bewaar deze afgedekt bij een temperatuur tussen 30 en 35° C gedurende 1 h.

5.1.1.4. — Voeg 6 druppels van 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 achttmaal 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 b.v. met fenolen en daarmee verwante stoffen een positieve reactie kunnen veroorzaken. Voorts bedenke 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 ± 0,1

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

Los 25,0 g carbonaatvrij 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 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 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 ± 0,1 en filtreer snel. Bewaar de oplossing in een goed gesloten fles.

Verdun de oplossing vóór gebruik met een gelijk volume water.

Natriummetaboraatoplossing : los 6,0 g watervrij natriummetaboraat ( $\text{NaBO}_2$ ) of 12,6 natriummetaboraat ( $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en 20,0 g natriumchloride ( $\text{NaCl}$ ) 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 natriummetaboraatoplossing.

Verwijder uit deze oplossing eventueel het 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 zodanig totdat de butanollaag 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 natriummetaboraatoplossing tot 100 ml met water.

Kopersulfaatoplossing : 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  $\mu\text{g}$  fenol per ml : los 0,200 + 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 1 mg nauwkeurig kan worden gewogen.

Spectrofotometer, geschikt voor het meten bij een golflengte van 610 nm, met bijhorende 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 uit 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

87

5.2.1.1. — 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).

Verdun deze hoeveelheid met 10 ml water.

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 zonodig 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  $20 \mu\text{g}$  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 standaardfenoloplossing 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  $20 \mu\text{g}$  fenol.
- 5.2.2.3. — Voeg achtereenvolgens aan elke buis toe 1 ml koper-sulfaatoplossing, 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  $\mu\text{g}$ , 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  $\mu\text{g}$  fenol.

5.2.3.2. — De fosfatase-activiteit, uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  fenol per ml gereconstitueerde melk, is  
 $2,4 \times P$   
waarin  $P =$  het aantal  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  fenol of minder per ml gereconstitueerde melk bedraagt.

6. — Stabilisatoren (\*)

7. — Saccharosegehalte

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.

Zinkacetaatoplossing : los 21,9 g gekristalliseerd zinkacetaat ( $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 3 ml ijsazijn op in water en vul aan tot 100 ml.

Kaliumhexacyanoferraat (II)-oplossing : los 10,6 g gekristalliseerd kaliumhexacyanoferraat (II) ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) op in water en vul aan tot 100 ml.

Zoutzuur  $6,35 \pm 0,2$  n (20-22 % m/m)

Ammonia  $2,0 \pm 0,2$  n (3,5 % m/m)

Azijnsuur  $2,0 \pm 0,2$  n (12 % m/m)

Apparatuur

---

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

Balans waarop tot 10 mg nauwkeurig kan worden gewogen

Waterbad van  $60 \pm 1^\circ \text{C}$

Polarimeterbuis van  $200 \pm 0,1$  mm lengte

Polarimeter of saccharimeter

- a. Polarimeter met natriumdamlamp of kwikdamlamp met prisma of Wrattenfilter nr. 77A voor groen kwiklicht waarmee tenminste tot op 0.05 booggraden nauwkeurig kan worden afgelezen.
- b. Saccharimeter met internationale suikerschaal met wit licht, dat een filter gevuld met een 6 % kaliumbichromaatoplossing met een weglengte van 15 mm passeert, of met natriumlicht, die tot op  $0,1^\circ$  van de internationale suikerschaal kan worden afgelezen.

#### 7.1. — Controlebepaling

Verricht ter controle van de werkwijze, de reagentia en de apparatuur een duplobepaling zoals onder 7.2. beschreven is op een mengsel van 100 g melk of 110 g afgeroomde melk en 18,00 g saccharose pro analyse, overeenkomend met 40,00 g gecondenseerde melk met 45,0 % suiker.

Bereken het saccharosegehalte met behulp van de formule in paragraaf 7.2.13., waarbij in formule I voor W, F en P resp. de hoeveelheid afgewogen melk, het vetgehalte en het eiwitgehalte van deze melk en in formule II voor W het getal 40,00 ingevuld moet worden.

Het gemiddelde van de gevonden waarden mag niet meer dan 0,1 % van 45,0 % afwijken.

#### 7.2. — Werkwijze

- 7.2.1. — Weeg ongeveer 40 g tot op 0,01 g nauwkeurig van het volgens 1.1.2. voorbereide monster in een bekeerglas van 100 ml. Voeg 50 ml warm water ( $80-90^\circ \text{C}$ ) toe en meng goed.
- 7.2.2. — Breng het mengsel kwantitatief over in een maatkolf van 200 ml. Spoel daarbij enige malen met water van ongeveer  $60^\circ \text{C}$  na, totdat het volume 120-150 ml bedraagt.  
Meng en koel af tot kamertemperatuur.
- 7.2.3. — Voeg 5 ml ammonia 2 n toe. Meng weer en laat gedurende 15 min. staan.
- 7.2.4. — Neutraliseer de ammonia door een equivalente hoeveelheid van de verdunde azijnzuuroplossing toe te voegen. Bepaal van tevoren het juiste aantal milliliters door titratie van de ammonia onder gebruikmaking van broomthymolblauw als indicator. Meng.

7.2.5. — Voeg 12,5 ml zinkacetaatoplossing toe en meng voorzichtig door de kolf in schuine stand om zijn as te draaien.

7.2.6. — Voeg op dezelfde wijze als bij de zinkacetaatoplossing 12,5 ml kaliumhexacyanoferraat-II-oplossing toe.

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

#### 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 geschieden door draaien van de kolf in plaats van door schudden. Indien luchtbellen worden opgemerkt vóór het bijvullen tot 200 ml, kan het verwijderen ervan bevorderd worden door de kolf met een vacuümpomp te verbinden, waarbij de kolf omgezwent wordt.

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

7.2.9. — Laat enige minuten staan en filtreer dan door een droog filter. Werp de eerste 25 ml filtraat weg.

7.2.10. — Draaiing vóór inversie

Bepaal de draaiing van het polarisatievlak van het filtraat bij  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ .

7.2.11. — Inversie

Pipetteer 40 ml van het op bovenvermelde wijze verkregen filtraat in een maatkolf van 50 ml. Voeg 6,0 ml zoutzuur 6,35 n toe. Laat de kolf gedurende 15 min in een waterbad van 60° C staan, zodanig dat de kolf tot aan de hals ondergedompeld is. Meng door een draaiende beweging gedurende de eerste 5 min, in welke tijd de inhoud van de kolf de temperatuur van het waterbad moet hebben bereikt. Koel af tot 20° C, vul aan tot 50 ml met water van 20° C, meng en laat gedurende 1 h staan bij deze temperatuur.

7.2.12. — Draaiing na inversie

Bepaal de draaiing van het polarisatievlak door de geïnverteerde oplossing bij  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ . (Wanneer de temperatuur van de vloeistof in de polarimeterbuis tijdens de meting meer dan 0,2° C van 20° C afwijkt, moet de in paragraaf 7.2.14. genoemde temperatuurscorrectie worden toegepast.)

7.2.13. — Bereken het saccharosegehalte met behulp van de volgende formules :

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

$$II. S = \frac{D - 5/4 I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times W} \%$$

Waarbij:

- S = Saccharosegehalte  
 W = Gewicht van het afgewogen monster in g  
 F = Percentage vet van het monster  
 P = Percentage eiwit ( $N \times 6,38$ ) van het monster  
 V = Volume in ml waartoe het monster is verdund vóór filtratie  
 v = Correctie in ml voor het volume van het neerslag gevormd bij de klaring  
 D = Directe polarimeteraflezing (draaiing vóór inversie)  
 I = Polarimeteraflezing na inversie (draaiing na inversie)  
 L = Lengte in dm van de polarimeterbuis  
 Q = Inversie-deelfactor, waarvan de waarden hieronder zijn aangegeven in paragraaf 7.2.14.

#### Opmerkingen

- a. Wanneer nauwkeurig 40,00 g gecondenseerde melk afgewogen wordt en gebruik gemaakt wordt van een polarimeter met natriumlicht, met een schaal in booggraden en een polarimeterbuis van 2 dm lengte bij  $20 \pm 0,1^\circ \text{ C}$  kan het saccharosegehalte van normale gesuikerde gecondenseerde melk ( $C = 9$ ; zie 7.2.14) met behulp van de volgende formule berekend worden:

$$S = (D - 5/4 I) (2,833 - 0,00612 F - 0,00878 P)$$

Wanneer de meting van de draaiing na inversie bij een andere temperatuur dan  $20^\circ \text{ C}$  heeft plaatsgevonden moeten de verkregen waarden vermenigvuldigd worden met:

$$1 + 0,0037 (T - 20)$$

- b. Wanneer het vetgehalte (F) en het droge stofgehalte (G) van het monster bekend zijn kan het saccharosegehalte zonder het eiwitgehalte berekend worden. Bij een inweging van 40,00 g en bij een polarimeterbuis van 2 dm lengte is de formule:

$$S = \frac{D - 5/4 I}{Q} (2,776 - 0,0025 F - 0,003 G) - 2,60$$

#### 7.2.14. — Waarden van de inversie-deelfactor Q

De volgende formules geven nauwkeurige waarden voor Q bij gebruik van verschillende lichtbronnen met waar nodig correcties vanwege concentratie en temperatuur.

Voor natriumlicht en een polarimeter met aflezing in booggraden :

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

Voor groen kwiklicht en een polarimeter met aflezing in booggraden :

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

Voor wit licht met bichroomaafilter en een saccharimeter met internationale suikerschaal :

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

In de voorgaande formules :

C = Totale gehalte aan suikers in de geïnverteerde oplossing na de polarimeteraflezingen

T = Temperatuur van de geïnverteerde oplossing tijdens de polarimeteraflezing.

### Opmerking 1

Het totale gehalte aan suikers (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

Temperatuursafwijkingen 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.

8. — Microbiologisch onderzoek (\*)

9. — Eiwitgehalte

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.

Kaliumsulfaat ( $K_2SO_4$ )

Kopersulfaat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )

Sterk zwavelzuur : ca. 96 % (m/m)  $H_2SO_4$

Natriumhydroxide oplossing : los 500 g natriumhydroxide (NaOH) op in 1.000 ml water.

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

Boorzuoroplossing : los 40 g boorzuur ( $H_3BO_3$ ) op in 1.000 ml water.

Indicator : los 2 g methylrood en 1 g methyleenblauw op in 1.000 ml ethanol 96 % (v/v).

Zoutzuuroplossing (HCl) 0,1 n.

Apparatuur en hulpstoffen

Analytische balans.

Kjeldahlkolf van 500 ml inhoud.

Apparatuur voor Kjeldahldestructie en voor distillatie.

Glasparels.

9.1. — Blancobepaling : Verricht een blancoproef volgens de werkwijze onder 9.2. aangegeven met uitsluiting van de alinea 9.2.2.

9.2. — Werkwijze

9.2.1. — Breng achtereenvolgens in de Kjeldahlkolf enkele glasparels, 5 g kaliumsulfaat en 1 g kopersulfaat.

9.2.2. — Weeg, hetzij rechtstreeks in de Kjeldahlkolf hetzij bij verschilweging, ca. 2 g van het monster tot op 1 mg.

9.2.3. — Voeg 20 ml zwavelzuur 98,3 % toe en meng.

9.2.4. — Verwarm voorzichtig tot het schuimen ophoudt.

9.2.5. — Verwarm krachtiger tot de vloeistof volkomen helder geworden is.

9.2.6. — Verwarm dan nog gedurende 90 min.

9.2.7. — Laat afkoelen tot kamertemperatuur en voeg 150 ml water toe. Koel opnieuw tot kamertemperatuur.

9.2.8. — Voer de distillatie uit met het gebruikelijke apparaat. Gebruik daarbij 80 ml van de natriumhydroxide-oplossing en vang het distillaat op in 50 ml boorzuoroplossing waaraan 4 druppels van de indicator toegevoegd werden.

9.2.9. — Titreer het distillaat met zoutzuur 0,1 n.

9.2.10. — Bereken het eiwitgehalte van het monster met de formule :

$$\frac{1,40 \times 6,38 \times (V_1 - V_0) t}{S}$$

waarbij :

t = normaliteit van de zoutzuuroplossing

$V_1$  = volume, in ml, van de zoutzuuroplossing gebruikt bij de  
bepaling (9.2.9)

$V_0$  = volume, in ml, van de zoutzuuroplossing gebruikt bij de  
blancoproef (9.1)

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



