379L1067

24.12.79 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 327/29

KOMMISSIONENS FÖRSTA DIREKTIV

av den 13 november 1979

om fastställande av gemenskapens analysmetoder för test av vissa former av konserverad, helt eller delvis dehydratiserad mjölk avsedd för konsumtion

(79/1067/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 76/118/EEG av den 18 december 1975 om tillnärmning av medlemsstaternas lagstiftning om vissa former av konserverad, helt eller delvis, dehydratiserad mjölk avsedd för konsumtion(1), särskilt artikel 11 i detta, och

med beaktande av följande:

Enligt artikel 11 i direktiv 76/118/EEG krävs det att sammansättningen av vissa former av konserverad, helt eller delvis dehydratiserad mjölk kontrolleras genom gemenskapens analysmetoder.

Det är önskvärt att redan nu godkänna en första omgång av metoder, för vilka undersökningar har avslutats.

De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv stämmer överens med Ständiga livsmedelskommitténs yttrande.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Medlemsstaterna skall vidta alla de åtgärder som är nödvändiga för att se till att de analyser som behövs för att kontrollera kriterierna enligt bilaga 1 utförs enligt metoderna i bilaga 2.

Artikel 2

Om alternativa metoder anges för en viss bestämning, får provet analyseras med endera metoden. Den testrapport som nämns i bilaga 2 måste visa vilken av metoderna som använts.

Artikel 3

Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv inom 18 månader efter dagen för anmälan. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

Artikel 4

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 13 november 1979.

På kommissionens vägnar
Étienne DAVIGNON
Ledamot av kommissionen

(1) EGT nr L 24, 30.1.1976, s. 49.

BILAGA 1

OMFATTNINGEN AV GEMENSKAPENS FÖRSTA ANALYSMETODER FÖR DIREKTIVET OM VISSA FORMER AV KONSERVERAD, HELT ELLER DELVIS DEHYDRATISERAD MJÖLK

I. **Allmänna bestämmelser**

II. **Bestämning av torrsubstanshalten i:**

— osötad kondenserad mjölk med hög fetthalt (med metod 1, bilaga 2)
— osötad kondenserad mjölk (med metod 1, bilaga 2)
— osötad kondenserad delvis skummad mjölk (med metod 1, bilaga 2)
— osötad kondenserad skummjölk (med metod 1, bilaga 2)
— sötad kondenserad mjölk (med metod 1, bilaga 2)
— sötad kondenserad delvis skummad mjölk (med metod 1, bilaga 2)
— sötad kondenserad skummjölk (med metod 1, bilaga 2).

III. **Bestämning av vattenhalten i:**

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt (med metod 2, bilaga 2)
— torkad helmjölk eller helmjölkspulver (med metod 2, bilaga 2)
— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk (med metod 2, bilaga 2)
— torkad skummjölk eller skummjölkspulver (med metod 2, bilaga 2).

IV. **Bestämning av fetthalten i:**

— osötad kondenserad mjölk med hög fetthalt (med metod 3, bilaga 2)
— osötad kondenserad mjölk (med metod 3, bilaga 2)
— osötad kondenserad delvis skummad mjölk (med metod 3, bilaga 2)
— osötad kondenserad skummjölk (med metod 3, bilaga 2)
— sötad kondenserad mjölk (med metod 3, bilaga 2)
— sötad kondenserad delvis skummad mjölk (med metod 3, bilaga 2)
— sötad kondenserad skummjölk (med metod 3, bilaga 2)
— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt (med metod 4, bilaga 2)
— torkad helmjölk eller helmjölkspulver (med metod 4, bilaga 2)
— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk (med metod 4, bilaga 2)
— torkad skummjölk eller skummjölkspulver (med metod 4, bilaga 2).

V. **Bestämning av sackaros i:**

— sötad kondenserad mjölk (med metod 5, bilaga 2)
— sötad kondenserad delvis skummad mjölk (med metod 5, bilaga 2)
— sötad kondenserad skummjölk (med metod 5, bilaga 2).

VI. **Bestämning av mjölksyra och laktat i:**

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt (med metod 6, bilaga 2)
— torkad helmjölk eller helmjölkspulver (med metod 6, bilaga 2)
— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk (med metod 6, bilaga 2)
— torkad skummjölk eller skummjölkspulver (med metod 6, bilaga 2).

VII. **Bestämning av fosfatasaktivitet i:**

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt (med metod 7 eller 8, bilaga 2)
— torkad helmjölk eller helmjölkspulver (med metod 7 eller 8, bilaga 2)
— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk (med metod 7 eller 8, bilaga 2)
— torkad skummjölk eller skummjölkspulver (med metod 7 eller 8, bilaga 2).

BILAGA 2

ANALYSMETODER FÖR SAMMANSÄTTNINGEN AV VISSA KONSERVERADE, HELT ELLER DELVIS DEHYDRATISERADE MJÖLKVAROR AVSEDDA FÖR KONSUMTION

ALLMÄNNA BESTÄMMELSER

1. BEREDNING AV PROVER FÖR KEMISK ANALYS

1.1 **Osötad kondenserad mjölk med hög fetthalt**
Osötad kondenserad mjölk
Osötad kondenserad delvis skummad mjölk
Osötad kondenserad skummjölk

Skaka om och vänd på den tillslutna burken. Öppna burken och häll långsamt över mjölken i en annan behållare som skall kunna förslutas hermetiskt, och blanda genom att hälla fram och tillbaka flera gånger. Se till att allt fett och mjölk som fastnat på burkens invändiga ytor blandas med provet. Förslut behållaren. Är innehållet inte homogent, värm behållaren i vattenbad vid 40 °C. Skaka om kraftigt var 15:e minut. Avlägsna behållaren från vattenbadet efter två timmar och låt den svalna till rumstemperatur. Ta av locket och blanda noggrant innehållet i behållaren med en sked eller spatel (om fettet har separerats kan provet inte analyseras). Förvara provet svalt.

1.2 **Sötad kondenserad mjölk**
Sötad kondenserad delvis skummad mjölk
Sötad kondenserad skummjölk

Burkar: Värm den förslutna burken i ett vattenbad vid 30–40 °C i ca 30 minuter. Öppna burken och blanda innehållet noggrant genom att röra upp och ned och runt med spatel eller sked så att det översta och understa skiktet blandas ordentligt med det övriga innehållet. Se till att den mjölk som har fastnat på burkens invändiga ytor kommer med i provet. Häll så mycket som möjligt av innehållet i en andra behållare med lufttätt lock. Förslut behållaren och förvara den svalt.

Tuber: Skär upp kortändan och häll innehållet i en behållare med lufttätt lock. Skär därefter upp tuben på längden. Skrapa ut allt material som fastnat på de invändiga ytorna och blanda det omsorgsfullt med resten av innehållet. Förvara behållaren svalt.

1.3 **Torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt**
Torkad helmjölk eller helmjölkspulver
Torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk
Torkad skummjölk eller skummjölkspulver

Häll över mjölkpulvret till en ren, torr behållare (med lufttätt lock) som rymmer dubbelt så mycket som pulvermängden. Förslut behållaren omedelbart och blanda mjölkpulvret noggrant genom att upprepade gånger skaka och vända på burken. Medan provet bereds bör kontakt mellan mjölkpulvret och atmosfären i möjligaste mån undvikas för att det ska absorbera så lite som möjligt av luftens fuktighet.

2. REAGENSMEDEL

2.1 **Vatten**

2.1.1 Överallt där vatten skall användas för upplösning, utspädning eller tvättning, avses destillerat vatten eller avmineraliserat vatten av minst samma renhet.

2.1.2 Överallt där "upplösning", "lösning", eller "spädning" nämns utan ytterligare uppgift, avses "upplösning i vatten", "lösning i vatten" och "spädning i vatten".

2.2 **Kemikalier**

Om inte annat anges, skall alla kemikalier som används vara av vedertagen analyskvalitet för reagensmedel.

3. UTRUSTNING

3.1 **Utrustningslistor**

Utrustningslistorna upptar endast artiklar för speciella ändamål och artiklar som skall vara av särskild kvalitet.

3.2 **Analysvåg**

Analysvåg avser en våg som kan väga med en noggrannhet av minst 0,1 mg.

4. FÖRKLARING AV RESULTATEN

4.1 **Beräkning av procentandel**

Om inte annat anges skall resultaten beräknas som procent av vikten på det prov som laboratoriet tagit emot.

4.2 **Antal signifikanta siffror**

Resultatet skall inte innehålla fler signifikanta siffror än som motiveras av noggrannheten hos den använda analysen.

5. TESTRAPPORT

Testrapporten skall redovisa den använda analysmetoden såväl som de uppnådda resultaten. Den skall dessutom innehålla alla uppgifter om förfarandet som inte anges i analysmetoden eller som är frivilliga, såväl som alla omständigheter som kan ha påverkat de erhållna resultaten.

Testrapporten skall innehålla all den information som behövs för en fullständig identifiering av provet.

METOD 1: BESTÄMNING AV TORRSUBSTANSHALTEN
(ugn 99 °C)

1. OMFATTNING OCH ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna metod bestämmer torrsubstanshalten i:

— osötad kondenserad mjölk med hög fetthalt
— osötad kondenserad mjölk
— osötad kondenserad delvis skummad mjölk
— osötad kondenserad skummjölk
— sötad kondenserad mjölk
— sötad kondenserad delvis skummad mjölk
— sötad kondenserad skummjölk.

2. DEFINITION

Torrsubstanshalten i kondenserad mjölk: torrsubstanshalten enligt bestämning med den angivna metoden.

3. PRINCIP

En känd mängd av provet löses i vatten, blandas med sand och torkas vid en temperatur av 99 °C ± 1 °C. Vikten efter torkning är torrsubstansens vikt och beräknas i procent av provets vikt.

4. REAGENSMEDEL

Kvartssand eller havssand som har behandlats med saltsyra (kornstorlek: 0,18–0,5 mm som passerar genom en 500 mikronsil men stoppas av en 180 mikronsil). Den bör klara följande kontrolltest:

Värm upp ca 25 g sand i två timmar i torkugn (5.3) enligt 6.1–6.3. Tillsätt 5 ml vatten, värm upp igen i ugnen i två timmar, låt svalna och väg på nytt. Skillnaden mellan de två vägningarna får inte överskrida 0,5 mg.

Om så är nödvändigt, behandla sanden med 25 % saltsyralösning i tre dagar och rör om emellanåt. Tvätta sanden med vatten tills syrareaktionen försvinner eller tvättvattnet är fritt från klorid. Torka vid 160 °C och testa på nytt enligt ovan.

5. APPARATUR

5.1 Analysvåg.

5.2 Plåtskålar, helst av nickel, aluminium eller rostfritt stål. Skålarna måste ha tätslutande lock som likväl är lätta att avlägsna. Lämpliga dimensioner: 60–80 mm diameter och ca 25 mm djup.

5.3 Torkugn med atmosfäriskt tryck, välventilerad och termostatreglerad, inställd för drift vid 99 °C ± 1 °C. Temperaturen bör vara jämnt fördelad i hela ugnen.

5.4 Desickator med nyaktiverad kiselgel med indikator för vattenhalt eller motsvarande desickant.

5.5 Glasstavar som är platta i ena änden och av sådan längd att de får plats inuti plåtskålarna (5.2).

5.6 Kokande vattenbad.

6. FÖRFARANDE

6.1 Placera ca 25 g sand (4) och en kort glasstav (5.5) i skålen (5.2).

6.2 Placera skålen med innehåll och avtaget lock i ugnen (5.3) och värm i två timmar.

6.3 Sätt på locket igen och flytta över skålen till desickatorn (5.4). Låt kallna till rumstemperatur och väg med 0,1 mg noggrannhet (M_0).

6.4 Tippa över sanden till skålens ena sida. Häll i det lediga utrymmet ca 1,5 g av provet av sötad kondenserad mjölk och 3,0 g osötad kondenserad mjölk. Sätt på locket igen och väg med 0,1 mg noggrannhet (M_1).

6.5 Ta bort locket, tillsätt 5 ml vatten och blanda med hjälp av glasstaven först vätskorna och sedan sanden och den flytande satsen. Låt glasstaven vara kvar i blandningen.

6.6 Låt skålen stå i ett kokande vattenbad (5.6) tills vattnet har indunstat, vilket i regel tar 20 minuter. Rör om i blandningen då och då med staven så att luften kan komma in och hindra att provet stelnar till en kaka. Lägg staven i skålen.

6.7 Låt skålen och locket stå i ugnen i ca 90 minuter.

6.8 Sätt på locket igen, flytta över skålen till desickatorn (5.4) och låt svalna till rumstemperatur och väg med 0,1 mg noggrannhet.

6.9 Sätt tillbaka skålen och locket i ugnen, ta av locket och värm upp både skålen och locket ytterligare en timme.

6.10 Upprepa förloppet 6.8.

6.11 Upprepa 6.9 och 6.10 tills skillnaden i vikt mellan två vägningar i följd är högst 0,5 mg eller tills vikten ökar. Om vikten ökar skall den lägsta noterade vikten användas vid beräkningen (7.1). Den sist antecknade vikten skall vara M_2 g.

7. FÖRKLARING AV RESULTATEN

7.1 **Beräkningsmetod**

Beräkna torrsubstanshalten i procent av provets vikt med formeln

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

där

M_0 = skålens, lockets och sandens vikt i g efter förlopp 6.3,

M_1 = skålens, lockets, sandens och provets vikt i g efter förlopp 6.4,

M_2 = skålens, lockets, sandens och det torkade provets vikt i g efter förlopp 6.11.

7.2 **Repeterbarhet**

Skillnaden i resultat mellan två bestämningar som utförs samtidigt eller i snabb följd med samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 0,2 g torrsubstans per 100 g av varan.

8. BERÄKNING AV DEN TOTALA MÄNGDEN MJÖLKTORRSUBSTANS OCH MÄNGDEN FETTFRI MJÖLKTORRSUBSTANS

8.1 Den totala mängden mjölktorrsubstans i sötad kondenserad mjölk ges av följande:

Den totala mjölktorrsubstanshalten (erhållen med metod 1, bilaga 2) minus sackarosmängden (erhållen med metod 5, bilaga 2).

8.2 Mängden fettfri mjölktorrsubstans i sötad kondenserad mjölk ges av följande:

Totala mängden mjölktorrsubstans (erhållen med metod 1, bilaga 2) minus sackaroshalten (erhållen med metod 5, bilaga 2) och fetthalten (erhållen med metod 3, bilaga 2).

8.3 Mängden fettfri mjölktorrsubstans i osötad kondenserad mjölk ges av följande:

Den totala mängden torrsubstans (erhållen med metod 1, bilaga 2) minus fetthalten (erhållen med metod 3, bilaga 2).

METOD 2: BESTÄMNING AV VATTENHALTEN
(ugn 102 °C)

1. OMFATTNING OCH ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna metod bestämmer viktförlusten vid torkning av:

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt

— torkad helmjölk eller helmjölkspulver

— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk

— torkad skummjölk eller skummjölkspulver.

2. DEFINITION

Vattenhalt: viktförlusten vid torkning enligt bestämning med den angivna metoden.

3. PRINCIP

Testsatsens återstående vikt bestäms efter torkning vid atmosfärtryck i ugn vid 102 °C ± 1 °C till konstant vikt. Viktförlusten beräknas i procent av provets vikt.

4. APPARATUR

4.1 Analysvåg.

4.2 Skålar, helst av nickel, aluminium, rostfritt stål eller glas. Skålarna måste ha tätslutande lock som likväl är lätta att avlägsna. Lämpliga dimensioner: 60–80 mm diameter och ca 25 mm djup.

4.3 Torkugn med atmosfäriskt tryck, välventilerad och termostatreglerad, inställd för drift vid 102 °C ± 1 °C. Temperaturen bör vara jämnt fördelad i hela ugnen.

4.4 Desickator med nyaktiverad kiselgel med indikator för vattenhalt eller motsvarande desickant.

5. FÖRFARANDE

5.1 Ta av locket från skålen (4.2) och placera den i ugnen (4.3) tillsammans med locket och värm i omkring en timme.

5.2 Sätt lock på skålen och flytta den täckta skålen till desickatorn (4.4). Låt skålen kallna till rumstemperatur och väg den med 0,1 mg noggrannhet (M_0).

5.3 Placera ett prov på ca 2 g torrmjölk i skålen, sätt på locket och väg den täckta skålen (M_1) så snabbt som möjligt med 0,1 mg noggrannhet.

5.4 Ta av locket och ställ skålen tillsammans med locket i ugnen i två timmar.

5.5 Sätt på locket igen, flytta den täckta skålen till desickatorn, låt den svalna till rumstemperatur och väg den därefter så snabbt som möjligt med 0,1 mg noggrannhet.

5.6 Ta av locket och värm skålen med lock en timme i ugnen.

5.7 Upprepa punkt 5.5.

5.8 Upprepa 5.6 och 5.5 tills skillnaden i vikt mellan de på varandra följande vägningarna är högst 0,5 mg eller tills vikten ökar. Om vikten ökar skall den lägsta noterade vikten användas vid beräkningen (6.1). Den sist noterade vikten skall vara M_2 g.

6. FÖRKLARING AV RESULTATEN

6.1 **Beräkningsmetod**

Beräkna viktförlusten vid torkningen av provet uttryckt i procent av provets vikt enligt formeln:

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

där

M_0 = skålens och lockets vikt i g efter förlopp 5.2,

M_1 = skålens, lockets och provets vikt i g efter förlopp 5.3,

M_2 = skålens, lockets och det slutliga provets vikt i g efter förlopp 5.5.

6.2 **Repeterbarhet**

Skillnaden i resultat mellan två bestämningar som utförts samtidigt eller i snabb följd på samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 0,1 g vatten per 100 g vara.

METOD 3: BESTÄMNING AV FETTHALTEN I KONDENSERAD MJÖLK
(RÖSE-GOTTLIEBMETODEN)

1. OMFATTNING OCH ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna metod används för att bestämma fettinnehållet i:

— osötad kondenserad mjölk med hög fetthalt

— osötad kondenserad mjölk

— osötad kondenserad delvis skummad mjölk

— osötad kondenserad skummjölk

— sötad kondenserad mjölk

— sötad kondenserad delvis skummad mjölk

— sötad kondenserad skummjölk.

2. DEFINITION

Fetthalten i kondenserad mjölk: fetthalten enligt bestämning med den angivna metoden.

3. PRINCIP

Fetthalten bestäms genom att fettet extraheras med dietyleter och lättbensin från en ammoniakalkohollösning av provet, varefter lösningsmedlen indunstas, restprodukterna vägs och provets viktprocent beräknas enligt Röse-Gottliebprincipen.

4. REAGENSMEDEL

Alla reagensmedel bör uppfylla de krav som anges i nollprovet (6.1). Om så behövs får reagensmedlen destilleras på nytt tillsammans med ca 1 g smörfett till 100 ml lösningsmedel.

4.1 Ammoniaklösning, ca 25 % (m/m)NH_4 (densitet vid 20 °C ca 0,91 g/ml), eller en starkare lösning med känd koncentration.

4.2 Etanol, 96 % ± 2 % (v/v) eller, om sådan inte är tillgänglig, etanol som denaturerats med metanol, etylmetylketon eller lättbensin.

4.3 Dietyleter, peroxidfri.

Anmärkning 1:
För att testa om det finns peroxider tillsätter man 1 ml nyblandad 10 % kaliumjodidlösning till 10 ml av etern i en liten cylinder med glaspropp, som dessförinnan sköljts med eter. Skaka om och låt stå i en minut. Inget av skikten bör visa gul färg.

Anmärkning 2:
Dietyleter får hållas fri från peroxider genom en tillsats av våt zinkfolie som i en minut har varit helt nerdoppad i en utspädd syrad kopparsulfatlösning och därefter tvättats i vatten. Använd ca 8 000 mm^2 zinkfolie skuren i strimlor som är långa nog att nå halvvägs upp i behållaren.

4.4 Lättbensin (petroleumeter) med kokpunkt var som helst mellan 30 och 60 °C.

4.5 En blandad lösning som gjorts i ordning omedelbart före användningen och består av lika delar dietyleter (4.3) och lättbensin (4.4), (när en blandad lösning anges får den ersättas med enbart dietyleter eller enbart lättbensin).

5. APPARATUR

5.1 Analysvåg.

5.2 Lämpliga extraktionsrör eller -kolvar med slipade glasproppar eller andra förslutningar som inte påverkas av de använda lösningsmedlen.

5.3 Kolvar, tunnväggiga och med plan botten, som rymmer 150 till 250 ml.

5.4 Torkugn med atmosfäriskt tryck, välventilerad och termostatreglerad, inställd för drift vid 102 °C ± 1 °C.

5.5 Kokstenar, fettfria, oporösa och som inte smulas sönder vid användningen, t.ex. glaspärlor eller kiselkarbidstycken (användningen av detta material är valfritt, se 6.2.1).

5.6 Sifon som passar till extraktionsrören.

5.7 Centrifug (valfri).

6. FÖRFARANDE

6.1 **Nollprov**

Gör samtidigt med bestämningen av provets fetthalt en nollbestämning på 10 ml vatten med samma slags extraktionsutrustning, samma reagensmedel i samma mängder och med samma förfarande som beskrivs nedan med undantag av punkt 6.2.2. Om resultatet från nollbestämningen överskrider 0,5 mg bör reagensmedlen kontrolleras och, om de innehåller föroreningar, rengöras eller ersättas.

6.2 **Bestämning**

6.2.1 Torka en kolv (5.3) i ugnen (5.4) i en halv till en timme, om så behövs tillsammans med några kokstenar (5.5) för att underlätta jämn kokning när lösningsmedlen senare skall avlägsnas. Låt kolven kallna till temperaturen i vågrummet och väg den kalla kolven med 0,1 mg noggrannhet.

6.2.2 Rör om det beredda provet och väg omedelbart med 1 mg noggrannhet upp 2 till 2,5 mg sötat eller 4 till 5 g osötat prov, eventuellt direkt i extraktionsapparaten (5.2). Tillsätt vatten upp till 10,5 ml och skaka om försiktigt under lätt uppvärmning (40 till 50 °C) tills provet är helt dispergerat. Provet måste vara fullständigt dispergerat, i annat fall bör bestämningen upprepas.

6.2.3 Tillsätt 1,5 ml ammoniak (25 %) (4.1) eller en motsvarande mängd starkare lösning och blanda väl.

6.2.4 Tillsätt 10 ml etanol (4.2) och blanda vätskorna försiktigt men grundligt i den öppna apparaten.

6.2.5 Tillsätt 25 ml dietyleter (4.3). Kyl under rinnande vatten. Förslut apparaten, skaka om kraftigt och vänd på den flera gånger under en minut.

6.2.6 Ta av proppen försiktigt, tillsätt 25 ml lättbensin (4.4) och skölj proppen och apparatens hals invändigt med de första få millilitrarna och låt avsköljet rinna ner i apparaten. Sätt proppen på plats igen och skaka om och vänd upprepade gånger i 30 sekunder. Skaka måttligt, om provet inte skall centrifugeras enligt 6.2.7.

6.2.7 Låt apparaten stå tills det översta vätskeskiktet har klarnat och är tydligt avskilt från det underliggande vattenskiktet. Separationen kan alternativt utföras med hjälp av en lämplig centrifug (5.7).

Anmärkning:
Om centrifugen inte drivs med trefasmotor kan gnistor bildas och man bör därför vara försiktig så att eterångor från exempelvis ett sprucket rör inte exploderar eller börjar brinna.

6.2.8 Ta av proppen, skölj den och apparatens hals invändigt med några milliliter av de blandade lösningsmedlen (4.5) och låt avsköljet rinna ner i apparaten. För försiktigt över så mycket som möjligt av det översta skiktet genom att dekantera eller med hjälp av en sifon (5.6) till den iordningsställda kolven (6.2.1).

Anmärkning:
Om skiktet överförs utan sifon kan det bli nödvändigt att tillsätta lite vatten för att öka avgränsningen mellan de två skikten och på så sätt underlätta dekanteringen.

6.2.9 Skölj apparatens hals ut- och invändigt eller spetsen och den undre delen av sifonen med några milliliter av de blandade lösningsmedlen (4.5). Låt avsköljet från apparatens utsida rinna in i kolven och avsköljet från halsens insida och sifonen att rinna in i extraktionsapparaten.

6.2.10 Gör en andra extraktion genom att upprepa punkt 6.2.5–6.2.9 men använd bara 15 ml dietyleter och 15 ml lättbensin.

6.2.11 Gör en tredje extraktion genom att upprepa 6.2.10 men utan den avslutande sköljningen (6.2.9).

Anmärkning:
Denna tredje extraktion är inte nödvändig vid analysering av prover på osötad kondenserad skummjölk och sötad kondenserad skummjölk.

6.2.12 Indunsta eller destillera omsorgsfullt så mycket lösningsmedel (inklusive etanolen) som möjligt. Om kolven är liten kan det bli nödvändigt att avlägsna en del av lösningsmedlet enligt ovan efter varje extraktion.

6.2.13 Finns det ingen märkbar lukt av lösningsmedel, läggs kolven på sidan i ugnen och värms i en timme.

6.2.14 Ta ut kolven ur ugnen och låt den kallna till samma temperatur som i vågrummet och väg med 0,1 mg noggrannhet.

6.2.15 Upprepa 6.2.13 och 6.2.14 under uppvärmningsperioder på 30–60 minuter tills skillnaden i vikt mellan två vägningar i följd är mindre än 0,5 mg eller tills vikten ökar. Om vikten ökar skall den lägsta noterade vikten användas vid beräkningen (7.1). Den sist noterade vikten skall vara M_2 g.

6.2.16 Tillsätt 15–25 ml lättbensin för att bekräfta att det extraherade ämnet är fullständigt lösligt. Värm försiktigt och snurra på lösningsmedlet tills allt fettet är upplöst.

6.2.16.1 Om det extraherade ämnet löses helt i lättbensin, utgörs fettets vikt av skillnaden mellan de vikter som har bestämts enligt 6.2.1 och 6.2.15.

6.2.16.2 Om något olösligt ämne finns kvar, eller om tvivel uppstår, extrahera fettet från kolven genom att tvätta den flera gånger med varm lättbensin och låt det oupplösta materialet sjunka före varje dekantering. Skölj kolvhalsens utsida tre gånger. Lägg kolven på sidan i ugnen och värm den en timme. Låt den kallna till vågrummets temperatur som tidigare (6.2.1) och väg med 0,1 mg noggrannhet. Fettets vikt utgörs av skillnaden mellan vikten enligt 6.2.15 och den slutliga vikten.

7. FÖRKLARING AV RESULTATEN

7.1 **Beräkning**

Det extraherade fettets vikt i g är

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

och fetthalten i provet uttryckt i procent är

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

där

M_1 = vikten i g på kolv M med fett efter 6.2.15,

M_2 = vikten i g på kolv M efter 6.2.1 eller vid inte upplöst material eller vid tvivel, efter 6.2.16.2,

B_1 = vikten i g på kolv B med nollprovet efter 6.2.15,

B_2 = vikten i g på kolv B efter 6.2.1 eller vid inte upplöst material eller tvivel, efter 6.2.16.2,

S = det använda provets vikt i g.

7.2 **Repeterbarhet**

Skillnaden i resultat mellan två bestämningar som har utförts samtidigt eller i snabb följd på samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 0,05 g fett per 100 g vara.

METOD 4: BESTÄMNING AV FETTHALTEN I TORRMJÖLK (RÖSE-GOTTLIEBMETODEN)

1. OMFATTNING OCH ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna metod bestämmer fetthalten hos:

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt

— torkad helmjölk eller helmjölkspulver

— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk

— torkad skummjölk eller skummjölkspulver.

2. DEFINITION

Fetthalten i torrmjölk: fetthalten enligt bestämning med den angivna metoden.

3. PRINCIP

Fetthalten bestäms genom att fettet extraheras med dietyleter och lättbensin från en ammoniakalkoholhaltig lösning av provet, varefter lösningsmedlen indunstas, restprodukterna vägs och provets viktprocent beräknas enligt Röse-Gottliebprincipen.

4. REAGENSMEDEL

Alla reagensmedel bör uppfylla de krav som anges i nollprovet (6.1). Om så behövs får reagensmedlen destilleras på nytt tillsammans med ca 1 g smörfett till 100 ml lösningsmedel.

4.1 Ammoniaklösning, ca 25 % (m/m)NH_4 (densitet vid 20 °C ca 0,91 g/ml), eller en starkare lösning med känd koncentration.

4.2 Etanol, 96 % ± 2 % (v/v) eller, om sådant inte är tillgängligt, etanol som denaturerats med metanol, etylmetylketon eller lättbensin.

4.3 Dietyleter, peroxidfri.

Anmärkning 1:
För att testa om det finns peroxider tillsätter man 1 ml nyblandad 10 % kaliumjodidlösning till 10 ml av etern i en liten cylinder med glaspropp, som dessförinnan sköljts med eter. Skaka om och låt stå i en minut. Inget av skikten bör visa gul färg.

Anmärkning 2:
Dietyleter får hållas fri från peroxider genom en tillsats av våt zinkfolie som i en minut har varit helt nerdoppad i en utspädd syrad kopparsulfatlösning och därefter tvättats i vatten. Använd ca 8 000 mm^2 zinkfolie skuren i strimlor som är långa nog att nå halvvägs upp i behållaren.

4.4 Lättbensin (petroleumeter) med kokpunkt var som helst mellan 30 och 60 °C.

4.5 En blandad lösning som gjorts i ordning omedelbart före användningen och består av lika delar dietyleter (4.3) och lättbensin (4.4), (när användning av en blandad lösning anges får denna ersättas med enbart dietyleter eller enbart lättbensin).

5. APPARATUR

5.1 Analysvåg.

5.2 Lämpliga extraktionsrör eller -kolvar med slipade glasproppar eller andra förslutningar som inte påverkas av de använda lösningsmedlen.

5.3 Kolvar, tunnväggiga och med plan botten, som rymmer 150 till 250 ml.

5.4 Torkugn med atmosfäriskt tryck, välventilerad och termostatreglerad, inställd för drift vid 102 °C ± 1 °C.

5.5 Kokstenar, fettfria, oporösa och som inte smulas sönder vid användningen, t.ex. glaspärlor eller kiselkarbidstycken (användningen av detta material är valfritt, se 6.2.1).

5.6 Vattenbad, 60–70 °C.

5.7 Sifon som passar till extraktionsrören.

5.8 Centrifug (valfri).

6 FÖRFARANDE

6.1 **Nollprov**

Gör samtidigt med bestämningen av provets fetthalt en nollbestämning på 10 ml vatten med samma slags extraktionsutrustning, samma reagensmedel i samma mängder och med samma förfarande som beskrivs nedan med undantag av punkt 6.2.2. Om resultatet överskrider 0,5 mg bör reagensmedlen kontrolleras och rengöras eller ersättas om de innehåller föroreningar.

6.2 **Bestämning**

6.2.1 Torka en kolv (5.3) i ugnen (5.4) i en halv till en timme, om så behövs tillsammans med några kokstenar (5.5) för att underlätta jämn kokning när lösningsmedlen senare skall avlägsnas. Låt kolven kallna till temperaturen i vågrummet och väg den kalla kolven med 0,1 mg noggrannhet.

6.2.2 Väg direkt eller genom skillnad med 1 mg noggrannhet upp ca 1 g pulver av oskummad mjölk eller ca 1,5 g pulver av helt eller delvis skummad mjölk i extraktionsapparaten (5.2). Tillsätt 10 ml vatten och skaka om försiktigt tills provet är helt dispergerat (uppvärmning kan behövas för vissa prover).

6.2.3 Tillsätt 1,5 ml ammoniak (25 %) (4.1) eller en motsvarande mängd starkare lösning och värm i vattenbad (5.6) i 15 minuter vid 60–70 °C under omskakning då och då. Kyl ner provet i exempelvis rinnande vatten.

6.2.4 Tillsätt 10 ml etanol (4.2) och blanda vätskorna försiktigt men grundligt i den öppna apparaten.

6.2.5 Tillsätt 25 ml dietyleter (4.3). Kyl under rinnande vatten. Förslut apparaten, skaka om kraftigt och vänd på den flera gångar under en minut.

6.2.6 Ta av proppen försiktigt, tillsätt 25 ml lättbensin (4.4) och skölj proppen och apparatens hals invändigt med de första få millilitrarna och låt avsköljet rinna ner i apparaten. Sätt proppen på plats igen och skaka om och vänd upprepade gånger i 30 sekunder. Skaka måttligt, om provet inte skall centrifugeras enligt 6.2.7.

6.2.7 Låt apparaten stå tills det översta vätskeskiktet har klarnat och är tydligt avskilt från det underliggande vattenskiktet. Separationen kan alternativt utföras med hjälp av en lämplig centrifug (5.8).

Anmärkning:
Om centrifugen inte drivs med trefasmotor kan gnistor bildas och man bör därför vara försiktig så att eterångor från exempelvis ett sprucket rör inte exploderar eller börjar brinna.

6.2.8 Ta av proppen, skölj den och apparatens hals invändigt med några milliliter av de blandade lösningsmedlen (4.5) och låt avsköljet rinna ner i apparaten. För försiktigt över så mycket som möjligt av det översta skiktet genom att dekantera eller med hjälp av en sifon (5.7) till den iordningsställda kolven (6.2.1).

Anmärkning:
Om skiktet överförs utan sifon kan det bli nödvändigt att tillsätta lite vatten för att öka avgränsningen mellan de två skikten och på så sätt underlätta dekanteringen.

6.2.9 Skölj apparatens hals ut- och invändigt eller spetsen och den undre delen av sifonen med några milliliter av de blandade lösningsmedlen. Låt avsköljet från apparatens utsida rinna in i kolven och låt avsköljet från halsens insida och sifonen rinna in i extraktionsapparaten.

6.2.10 Gör en andra extraktion genom att upprepa punkt 6.2.5–6.2.9 men använd bara 15 ml dietyleter och 15 ml lättbensin.

6.2.11 Gör en tredje extraktion genom att upprepa 6.2.10 men utan den avslutande sköljningen (6.2.9).

Anmärkning:
Denna tredje extraktion är inte nödvändig vid analysering av prover på torkad skummjölk.

6.2.12 Indunsta eller destillera omsorgsfullt så mycket lösningsmedel (inklusive etanolen) som möjligt. Om kolven är liten kan det bli nödvändigt att avlägsna en del av lösningsmedlet enligt ovan efter varje extraktion.

6.2.13 Finns det ingen märkbar lukt av lösningsmedel, lägg kolven på sidan i ugnen och värm i en timme.

6.2.14 Ta ut kolven ur ugnen och låt den som tidigare (6.2.1) kallna till samma temperatur som i vågrummet och väg med 0,1 mg noggrannhet.

6.2.15 Upprepa 6.2.13 och 6.2.14 under uppvärmningsperioder på 30–60 minuter tills skillnaden i vikt mellan två vägningar i följd är mindre än 0,5 mg eller tills vikten ökar. Om vikten ökar skall den lägsta noterade vikten användas vid beräkningen (7.1). Den sist noterade vikten skall vara M_1 g.

6.2.16 Tillsätt 15–25 ml lättbensin för att bekräfta att det extraherade ämnet är fullständigt lösligt. Värm försiktigt och snurra på lösningsmedlet tills allt fettet är upplöst.

6.2.16.1 Om det extraherade ämnet löses helt i lättbensin, utgörs fettets vikt av skillnaden mellan de vikter som har bestämts enligt 6.2.1 och 6.2.15.

6.2.16.2 Om något olösligt ämne finns kvar, eller om tvivel uppstår, extrahera fettet från kolven genom att tvätta den flera gånger med varm lättbensin och låt det oupplösta materialet sjunka före varje dekantering. Skölj kolvhalsens utsida tre gånger. Lägg kolven på sidan i ugnen och värm den en timme. Låt den svalna till vågrummets temperatur som tidigare (6.2.1) och väg med 0,1 mg noggrannhet. Fettets vikt utgörs av skillnaden mellan vikten enligt 6.2.15 och den slutliga vikten.

7. FÖRKLARING AV RESULTATEN

7.1 **Beräkning**

Det extraherade fettets vikt i g är

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

och fetthalten i provet uttryckt i procent är

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

där

M_1 = vikten i g på kolv M med fett efter 6.2.15,

M_2 = vikten i g på kolv M efter 6.2.1 eller vid inte upplöst material eller vid tvivel, efter 6.2.16.2,

B_1 = vikten i g på kolv B med nollprovet efter 6.2.15,

B_2 = vikten i g på kolv B efter 6.2.1 eller vid inte upplöst material eller tvivel, efter 6.2.16.2,

S = det använda provets vikt i g.

7.2 **Repeterbarhet**

Skillnaden i resultat mellan två bestämningar som har utförts samtidigt eller i snabb följd på samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 0,2 g fett per 100 g vara med undantag för skummjölkspulver där skillnaden inte får överskrida 0,1 g fett per 100 g vara.

METOD 5: BESTÄMNING AV SACKAROSHALTEN (POLARIMETRISK METOD)

1. OMFATTNING OCH ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna metod bestämmer sackaroshalten i

— sötad kondenserad mjölk

— sötad kondenserad delvis skummad mjölk

— sötad kondenserad skummjölk.

Proverna får inte innehålla invertsocker.

2. DEFINITION

Sackaroshalten i sötad kondenserad mjölk: sackaroshalten enligt bestämning med den angivna metoden.

3. PRINCIP

Metoden är baserad på Clergets inversionsprincip, en mild behandling av provet med syra som ger en fullständig hydrolys av sackaros men nästan ingen av laktos eller andra sockerarter. Sackaroshalten får man fram genom att ändra rotationskraften i lösningen.

Ett klart filtrat av provet utan mutarotation genom laktos bereds genom att man behandlar lösningen med ammoniak och därefter neutraliserar och klarar genom att efter hand tillsätta zinkacetat- och kaliumhexacyanoferrat(II)-lösningar.

I en del av filtratet hydrolyseras sackarosen på angivet sätt.

Genom rotationen av filtratet både före och efter inversionen kan sackaroshalten beräknas med hjälp av formeln.

4. REAGENSMEDEL

4.1 Zinkacetatlösning, 1 M: lös 21,9 g kristalliserat zinkacetatdihydrat $Zn(C_2HH_2O_2)_22H_2O$ och 3 ml isättika i vatten och fyll på vatten till 100 ml.

4.2 Kaliumhexacyanoferrat(II)lösning, 0,25 M: lös 10,6 g kristalliserat kaliumhexacyanoferrat(II)trihydrat $K_4[Fe(CN)_6],3H_2O$ i vatten och fyll på vatten till 100 ml.

4.3 Saltsyralösning, 6,35 ± 0,20 M (20 till 22 %) eller 5,0 ± 0,2 M (16 till 18 %).

4.4 Ammoniaklösning, 2,0 ± 0,2 M (3,5 %).

4.5 Isättikalösning, 2,0 ± 0,2 M (12 %).

4.6 Bromtymolblåttindikator, 1 % (m/v) lösning i etanol.

5. APPARATUR

5.1 Våg med noggrannhet till 10 mg.

5.2 Polarimeterrör, 2 dm, av exakt kalibrerad längd.

5.3 Polarimeter eller sackarimeter:

a) Polarimeter med natriumljus eller kvicksilvergrönt ljus (kvicksilvergaslampa med prisma eller specialfiltret Wratten 77 A) som ger utslag med en noggrannhet av minst 0,05 cirkelgrad,

b) Sackarimeter med internationell sockerskala för vitt ljus genom ett 15 mm filter av 6 % lösning av kaliumbikromat, eller natriumljus, och som ger utslag med en noggrannhet av minst 0,1° på internationella sockerskalan.

5.4 Vattenbad som håller 60 °C ± 1 °C.

6. FÖRFARANDE

6.1 **Kontrollbestämning**

För att standardisera förfarande, reagensmedel och apparatur skall en dubbel kontrollbestämning utföras enligt beskrivningen nedan med en blandning av 100 g mjölk och 18 g ren sackaros eller en blandning av 110 g skummjölk och 18 g ren sackaros, vardera motsvarande 40 g kondenserad mjölk som innehåller 45 % sackaros. Beräkna sockerhalten med hjälp av formlerna i punkt 7 och sätt för respektive M, F och P i formel 1 in den tagna mängden mjölk samt fett- och proteinhalten i denna mjölk, och för M i formel 2 värdet 40,00. De erhållna medelvärdena får avvika högst 0,2 % från 45,0 %.

6.2 **Bestämning**

6.2.1 Väg med en noggrannhet av 10 mg upp ca 40 g av det välblandade provet i en 100 ml glasbägare. Tillsätt 50 ml hett vatten (80 till 90 °C) och blanda väl.

6.2.2 Överför hela blandningen till en 200 ml mätkolv, skölj bägaren flera gånger med 60-gradigt vatten tills mängden uppgår till mellan 120 och 150 ml. Blanda och kyl till rumstemperatur.

6.2.3 Tillsätt 5 ml av den utspädda ammoniaklösningen (4.4). Blanda igen och låt provet stå i 15 minuter.

6.2.4 Neutralisera ammoniaken genom att tillsätta en motsvarande kvantitet av den utspädda isättiksyran (4.5). Bestäm det exakta antalet ml i förväg genom titrering av ammoniaklösningen och använd bromtymolblått som indikator (4.6). Blanda.

6.2.5 Tillsätt 12,5 ml zinkacetatlösning (4.1) och blanda försiktigt genom att snurra på den snedställda kolven.

6.2.6 Tillsätt 12,5 ml kaliumhexacyanoferrat(II)-lösning (4.2) på samma sätt som acetatlösningen.

6.2.7 Justera temperaturen på innehållet i kolven till 20 °C och häll i 20-gradigt vatten upp till 200 ml-märket.

Anmärkning:
Under samtliga steg som hittills beskrivits bör allt vatten tillsättas på sådant sätt att det inte bildas luftbubblor, och av samma anledning bör kolven hellre snurras än skakas vid blandningen. Om luftbubblor bildas innan volymen nått 200 ml, kan dessa avlägsnas om man tillfälligt ansluter kolven till en vakuumpump och snurrar på kolven.

6.2.8 Förslut kolven med en torr propp och blanda grundligt genom att skaka om kolven kraftigt.

6.2.9 Låt kolven står i några minuter och filtrera därefter med ett torrt filterpapper, varvid de första 25 ml av filtratet skall kasseras.

6.2.10 Direkt polarisering: bestäm filtratets optiska rotation vid 20 °C ± 1 °C.

6.2.11 Inversion: överför med pipett 40 ml av det ovan erhållna filtratet till en 50 ml mätkolv. Tillsätt 6,0 ml 6,35 M eller 7,5 ml 5,0 M saltsyra (4.3).

Placera kolven i ett 60-gradigt vattenbad i 15 minuter och se till att hela kolvens innehåll är nerdoppat. Blanda genom att snurra på kolven under de första fem minuterna, och under denna tid bör innehållet i kolven nått samma temperatur som vattenbadet. Kyl till 20 °C och fyll på till full volym med 20-gradigt vatten. Blanda och låt kolven med innehåll stå i en timme vid denna temperatur.

6.2.12 *Invertpolarisation*

Bestäm rotationen på den inverterade lösningen vid 20 °C ± 0,2 °C. (Om temperatur T i polariseringsrörets vätska avviker med mer än 0,2 °C under mätningen, måste temperaturen korrigeras enligt 7.2.)

7. FÖRKLARING AV RESULTATEN

7.1 **Beräkningsmetod**

Beräkna sackaroshalten med hjälp av följande formler:

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

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

där

S = sackaroshalten,

M = det vägda provets vikt i gram,

F = provets fetthalt i procent,

P = provets proteinhalt (N x 6,38) i provet,

V = den volym i ml som provet har spätts till före filtreringen,

v = korrigering i ml av den volym av precipitatet som bildats under klarningen,

D = direkt polarimeteravläsning (polarisation före inversion),

I = polarimeteravläsning efter inversion,

L = polarimeterrörets längd i dm,

Q = inversionsfaktorn, vars värden lämnas nedan.

Kommentarer:

a) När exakt 40,00 g kondenserad mjölk har vägts upp och en polarimeter med natriumljus, cirkelgrader och ett 2 dm polarimeterrör används vid 20,0 °C ± 0,1 °C, kan sackaroshalten för normal kondenserad mjölk (C = 9) beräknas med hjälp av följande formel:

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

b) Om den inverterade polarisationen mäts upp vid någon annan temperatur än 20 °C, bör siffrorna multipliceras med

$$(1 + 0{,}0037\ (T - 20))$$

7.2 **Värden för inversionsfaktorn Q**

Följande formler ger precisa värden för Q vid olika ljuskällor med korrigeringar för koncentration och temperatur:

Natriumljus och polarimeter med cirkelgrader:
$Q = 0{,}8825 + 0{,}0006\ (C - 9) - 0{,}0033\ (T - 20)$.

Kvicksilvergrönt ljus och polarimeter med cirkelgrader:
$Q = 1{,}0392 + 0{,}0007\ (C - 9) - 0{,}0039\ (T - 20)$.

Vitt ljus med dikromatiskt filter och sackarimeter graderad efter internationella sockerskalan:
$Q = 2{,}549 + 0{,}0017\ (C - 9) - 0{,}0095\ (T - 20)$.

I ovanstående formler är
C = Hela antalet polariserade sockerarter i procent av den inverterade lösningen.
T = Den inverterade lösningens temperatur vid den polarimetriska avläsningen.

Anmärkning 1:
Hela antalet sockerarter C i procent av den inverterade lösningen får beräknas på den direkta avläsningen, medan förändringen vid inversion beräknas på vanligt sätt med de vanliga värdena för specifika rotationen hos sackaros, laktos och invertsocker.

Korrigeringen 0,0006 (C – 9) etc. är endast riktig när C är ungefär 9. För normal kondenserad mjölk kan man bortse från denna korrigering, eftersom C är nära 9.

Anmärkning 2:
Variation i temperaturen från 20 °C på 1 °C medför inte någon större skillnad vid direkt avläsning, men en variation på över 0,2 °C vid invert avläsning nödvändiggör en korrektion. Korrektionen – 0,0033 (T– 20) etc. är endast lämplig mellan 18 °C och 22 °C.

7.3 **Repeterbarhet**

Skillnaden i resultat mellan två bestämningar som har utförts samtidigt eller i snabb följd på samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 0,3 g sackaros per 100 g kondenserad mjölk.

METOD 6: BESTÄMNING AV MÄNGDEN MJÖLKSYRA OCH LAKTAT

1. OMFATTNING OCH ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna metod bestämmer mängden mjölksyra och laktat uttryckt som mjölksyra hos:

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt

— torkad helmjölk eller helmjölkspulver

— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk

— torkad skummjölk eller skummjölkspulver.

2. DEFINITION

Mängden mjölksyra och laktat i torkad mjölk: innehållet av mjölksyra och laktat uttryckt som mjölksyra enligt bestämning med angiven metod.

3. PRINCIP

Fett, protein och laktos avlägsnas samtidigt från en lösning av provet genom tillsats av kopparsulfat och kalciumhydroxid och filtreras därefter.

Mjölksyran och laktaten i filtratet omvandlas till acetaldehyd genom koncentrerad svavelsyra tillsammans med koppar(II)sulfat.

Mjölksyrahalten bestäms kolorimetriskt med p-hydroxidefenyl.

Mängden mjölksyra och laktat uttrycks som mg mjölksyra per 100 g fettfri torrsubstans.

4. REAGENSMEDEL

4.1 Koppar(II)sulfatlösning: lös upp 250 g koppar(II)sulfat ($CuSO_4,5H_2O$) i vatten och späd till 1 000 ml med vatten.

4.2 Kalciumhydroxidsuspension.

4.2.1 Mal 300 g kalciumhydroxid ($Ca(OH)_2$) i mortel med vatten och använd sammanlagt 900 ml. Suspensionen bör beredas omedelbart innan den skall användas.

4.2.2 Kalciumhydroxidsuspension: mal 300 g kalciumhydroxid ($Ca(OH)_2$) i mortel med vatten och använd sammanlagt 1 400 ml. Suspensionen bör beredas omedelbart innan den skall användas.

4.3 Svavelsyra — koppar(II)sulfatlösning: tillsätt 0,5 ml koppar(II)svavellösning (4.1) till 300 ml svavelsyra, 95,9 - 97,0 % (m/m) H_2SO_4.

4.4 p-hydroxidifenyllösning ($C_6H_3C_6H_4OH$): Lös 0,75 g p-hydroxidifenyl i 5 ml vattenlösning av natriumhydroxid som innehåller 5 g natriumhydroxid (NaOH) per 100 ml genom lätt omskakning och uppvärmning. Späd med vatten till 50 ml i mätkolv. Förvara lösningen mörkt och svalt i brun glasflaska. Använd den inte om vätskan ändrar färg eller blir grumlig. Längsta förvaringstid är 72 timmar.

4.5 Mjölksyra, standardlösning: lös strax före användningen upp 0,1067 g litiumlaktat ($CH_3CHOHCOOLi$) i vatten och späd till 1 000 ml i mätkolv. 1 ml av lösningen motsvarar 0,1 mg mjölksyra.

4.6 Mjölk, standardrekonstituerad: analysera i förväg flera prov av högklassig torkad mjölk. För beredning av kalibreringskurva skall det prov väljas som har lägst mjölksyrahalt och som innehåller högst 30 mg mjölksyra per 100 g fettfri torrsubstans. Följ anvisningarna under 6.2.1 och 6.2.2 nedan.

5. APPARATUR

5.1 Analysvåg.

5.2 Spektrofotometer lämplig för avläsningar vid en våglängd av 570 nm.

5.3 Vattenbad, 30 °C ± 2 °C.

5.4 Mortel med stöt.

5.5 Filterpapper (Schleicher och Schull 595, Whatman 1 eller motsvarande).

5.6 Teströr, pyrex eller motsvarande (dimensioner 25 x 150 mm).

Anmärkning:
All utrustning av glas måste vara fullständigt ren och avsedd att användas enbart för denna bestämning. Glasdetaljer som innehåller rester skall sköljas med koncentrerad saltsyra innan de diskas.

6. FÖRFARANDE

6.1 **Nollprov**

Gör ett nollprov genom att placera 30 ml vatten i ett 50 ml graderat rör och följ beskrivningen i punkt 6.2.4–6.2.11. Om nollprovet mätt gentemot vatten överskrider ett värde motsvarande 20 mg mjölksyra per 100 g fettfri torrsubstans bör reagensmedlen kontrolleras och ersättas om de innehåller föroreningar. Gör nollprovet på samma gång som provet analyseras.

6.2 **Bestämning**

Anmärkning: Undvik att förorena och var särskilt försiktig med saliv och svett.

6.2.1 Bestäm provets fettfria torrsubstans (a) g genom att subtrahera fetthalten (erhållen genom metod 4) och vatteninnehållet (erhållet genom metod 2) från 100.

6.2.2 Väg $\frac{1\,000}{(a)-10}$ g av provet med 0,1 g noggrannhet.

Tillsätt denna mängd av provet till 100 ml vatten och blanda noggrant.

6.2.3 Överför 5 ml av den erhållna lösningen med pipett till ett 50 ml graderat rör och späd med vatten till ca 30 ml.

6.2.4 Tillsätt sakta under omskakning 5 ml koppar(II)sulfatlösning (4.1) och låt blandningen vila i 10 minuter.

6.2.5 Tillsätt sakta under omskakning 5 ml kalciumhydroxidsuspension (4.2.1) eller 10 ml kalciumhydroxidsuspension (4.2.2).

6.2.6 Späd med vatten till 50 ml, skaka om kraftigt, vänta 10 minuter och filtrera därefter. Kasta bort den första mängden som rinner igenom.

6.2.7 Överför 1 ml av filtratet med pipett till ett provrör (5.6).

6.2.8 Överför med byrett eller graderad pipett 6,0 ml av svavelsyrakoppar(II)sulfatlösningen (4.3) till provröret. Blanda.

6.2.9 Värm provröret i det kokande vattenbadet i fem minuter. Kyl till omgivningstemperatur under rinnande vatten.

6.2.10 Tillsätt två droppar p-hydroxidifenylreagens (4.4) och skaka om kraftigt så att reagensmedlet fördelas jämnt i vätskan. Placera röret i vattenbadet vid 30 °C ± 2 °C. Låt röret stå i 15 minuter och skaka om innehållet då och då.

6.2.11 Placera röret i det kokande vattenbadet i 90 sekunder. Kyl till omgivningstemperatur under rinnande vatten.

6.2.12 Mät den optiska densiteten och jämför med nollprovet (6.1) inom tre timmar vid den våglängd som anges under 5.2.

6.2.13 Om den optiska densiteten överskrider den optiska densiteten på standardkurvans högsta punkt, skall testet upprepas med tillräcklig utspädning av filtratet som erhållits i 6.2.6.

6.3 **Beredning av standard**

6.3.1 Överför med pipett 5 ml av den rekonstituerade mjölken (4.6) till fem graderade 50 ml provrör. Överför med pipett till dessa rör respektive 0, 1, 2, 3 och 4 ml standardlösning (4.5) så att det bildas en rad standarder som motsvarar 0, 20, 40, 60 och 80 mg tillsatt mjölksyra per 100 g fettfri mjölktorrsubstans.

6.3.2 Späd med vatten till ca 30 ml och följ beskrivningen i 6.2.4–6.2.11.

6.3.3 Mät de optiska densiteterna hos standarderna (6.3.1) och jämför med nollprovet (6.1) vid den våglängd som anges i 5.2. Plotta i ett diagram de optiska densiteterna mot de mängder mjölksyra som anges i 6.3.1, dvs. 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg och 80 mg per 100 g fettfri torrsubstans. Dra en rak linje genom punkterna och framställ standardkurvan genom att parallellförflytta linjen på sådant sätt att den går igenom origo.

7. FÖRKLARING AV RESULTATEN

7.1 **Beräkningsmetod**

Räkna om den optiska densiteten som uppmätts i 6.2.12– 6.2.13 i mg mjölksyra per 100 g fettfri torrsubstans i provet med hänvisning till standardkurvan. Om filtratet har spätts ut enligt 6.2.13 skall resultatet multipliceras med spädningsfaktorn.

7.2 **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av de båda bestämningarna som utförs samtidigt eller i snabb följd på samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 8 mg mjölksyra per 100 g fettfri torrsubstans för mängder upp till 80 mg. För högre värden får den skillnaden inte överskrida 10 % av det lägsta värdet.

METOD 7: BESTÄMNING AV FOSFATASAKTIVITETEN (MODIFIERAT SANDERS OCH SAGER-FÖRFARANDE)

1. OMFATTNING OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Denna metod beskriver bestämningen av fosfatasaktiviteten i:

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt

— torkad helmjölk eller helmjölkspulver

— torkad, delvis skummad torrmjölk eller pulver av delvis skummad mjölk

— torkad skummjölk eller skummjölkspulver.

2. DEFINITION

Fosfatasaktiviteten i torkad mjölk är ett mått på den mängd aktiva alkaliska fosfataser som finns i varan. Den uttrycks som den mängd fenol i µg som frigörs med 1 ml rekonstituerad mjölk enligt det förfarande som anges nedan.

3. PRINCIP

Fosfatasaktiviteten hos torkad mjölk bestäms genom fosfatasens förmåga att frigöra fenol från dinatrium-fenylfosfat. Mängden fenol som frigörs under föreskrivna betingelser bestäms genom spektrofotometrisk mätning av den färg som har framkallats med Gibbs reagensmedel.

4. REAGENSMEDEL

4.1 **Lösning A**

Bariumborathydroxidbuffert: pH 10,6 ± 0,1 vid 20 °C.

Lös upp 25,0 g bariumhydroxid ($Ba(OH)_2,8H_2O$) i vatten och späd till 500 ml.

Lös upp 11,0 g borsyra (H_3BO_3) i vatten och späd till 500 ml.

Värm de båda lösningarna till 50 °C och blanda.

Skaka om och kyl blandningen till rumstemperatur.

Justera pH-värdet till 10,6 ± 0,1 med bariumhydroxidlösning och filter.

Förvara lösningen i en väl försluten behållare.

Späd bufferten med lika mycket vatten innan den skall användas.

4.2 **Lösning B:**

Färgframkallningsbuffert.
Lös upp 6,0 g natriummetaborat ($NaBO_2$) (eller 12,6 g $NaBO_2,4H_2O$) och 20,0 g natriumklorid (NaCl) i vatten och späd till 1 000 ml med vatten.

4.3 **Lösning C:**

Substratbuffertlösning.

4.3.1 Lös upp 0,5 g dinatriumfenylfosfat ($Na_2C_6H_3PO_42H_2O$) i 4,5 ml av lösning B (4.2). Tillsätt 2 droppar av lösning E (4.5) och vänta 30 minuter. Extrahera färgen med 2,5 ml butanol (4.10). Upprepa färgextraktionen om så är nödvändigt. Kasta bort butanolen efter seperationen. Denna lösning håller sig flera dagar i kylskåp. Framkalla och extrahera färgen en gång till före användningen.

4.3.2 För över 1 ml av lösningen med pipett till en 100 ml mätkolv och späd till full volym med lösning A. Gör i ordning buffertlösningen just innan den skall användas.

4.4 **Lösning D**

Utfällningsmedel.
Lös 3,0 mg zinksulfat ($ZnSO_47H_2O$) och 0,6 g koppar(II)sulfat ($CuSO_45H_2O$) i vatten och späd till 100 ml med vatten.

4.5 **Lösning E**

Gibbs reagensmedel.
Lös 0,040 g 2,6-dibromkinon 1,4 – kloroimid ($OC_6H_2Br_2,NCl$) i 10 ml 96 % etanol. Förvara lösningen i mörk glasflaska i kylskåp. Kasta bort detta reagensmedel när det har blivit missfärgat.

4.6 **Buffertlösning för färgspädning**

Späd 10 ml färgframkallningsbuffert, lösning B (4.2), till 100 ml med vatten.

4.7 **Kopparsulfatlösning**

Lös 0,05 g koppar(II)sulfat ($CuSO_45H_2O$) i vatten och späd till 100 ml med vatten.

4.8 **Fenolstandardlösning**

Lös 0,200 ± 0,001 g ren fenol i vatten och späd med vatten till 100 ml i mätkolv. I kylskåp håller denna lösning sig i flera månader. Späd 10 ml av lösning i vatten till 100 ml. Den utspädda lösningen innehåller 200 µg fenol per ml och kan användas för beredning av fler utspädda lösningar.

4.9 **Kokt destillerat vatten.**

4.10 **n-butanol.**

5. APPARATUR

5.1 Analysvåg.

5.2 Vattenbad, termostatreglerat och inställt på 37 °C ± 1 °C.

5.3 Spektrofotometer som tillåter avläsningar vid våglängden 610 nm.

5.4 Filtrerpapper (Schleicher och Schull 597, Whatman 42 eller likvärdigt filtrerpapper).

5.5 Vattenbad, kokande.

5.6 Aluminiumfolie.

6. FÖRFARANDE

Försiktighetsåtgärder:

1. Undvik direkt solljus.
2. Alla glasdetaljer, proppar och liknande material skall vara fullständigt rena. De bör sköljas och kokas i vatten eller behandlas med ånga.
3. Undvik plastmaterial (t.ex. i proppar) eftersom det kan innehålla fenoler.
4. Saliv innehåller fosfataser; föroreningar genom salivpartiklar måste därför omsorgsfullt undvikas.

6.1 **Beredning av provet**

6.1.1 Väg upp 10 g av provet med en noggrannhet av 0,1 g och lös det i 90 ml vatten. När pulvret löses får temperaturen under inga omständigheter överskrida 35 °C.

6.2 **Bestämning**

6.2.1 Häll i var och en av de båda provrören 1 ml rekonstituerad mjölk som ställts i ordning enligt 6.1.1.

6.2.2 Värm upp ett av rören i kokande vatten i två minuter. Täck röret och vattenbadet (5.5) eller, exempelvis, en bägare med aluminiumfolie (5.6) för att säkerställa att hela röret värms upp. Kyl till rumstemperatur i kallt vatten. Använd detta rör för nollprovet. För alla följande förlopp behandlas rören identiskt.

6.2.3 Lägg till 10 ml av lösning C (4.3.2). Blanda och placera röret i vattenbad vid 37 °C (5.2).

6.2.4 Inkubera under 60 minuter i vattenbadet och skaka om emellanåt.

6.2.5 Överför rören omedelbart till ett kokande vattenbad (5.5) och värm upp i två minuter. Kyl till rumstemperatur i kallt vatten.

6.2.6 Tillsätt 1 ml av lösning D (4.4), blanda och filtrera genom ett torrt filtrerpapper. Kassera de första filtraten tills den erhållna vätskan är klar.

6.2.7 Häll 5 ml av varje filtrat i provrören, tillsätt 5 ml av lösning B (4.2) och 0,1 ml av lösning E (4.5). Blanda.

6.2.8 Skärma av direkt solljus och låt färgen utvecklas vid rumstemperatur i 30 minuter.

6.2.9 Mät och jämför den optiska densiteten i provlösningen med nollprovet vid den våglängd som anges i 5.3.

6.2.10 Upprepa bestämningen, om den optiska densiteten i lösningen är högre än hos ett standardprov med 20 µg fenol, framställt enligt 7.

Om denna gräns överskrids, späd en lämplig mängd rekonstituerad mjölk enligt 6.1.1 med en lämplig mängd av denna mjölk, omsorgsfullt kokt enligt 6.2.2 för att inaktivera eventuell fosfatas.

7. FRAMSTÄLLNING AV STANDARDKURVAN

7.1 För med pipett över till fyra 100 ml mätkolvar 1, 3, 5 respektive 10 ml standardlösning utspädd enligt 4.8 och späd med vatten till full volym. Dessa utspädda lösningar innehåller respektive 2, 6, 10 och 20 µg fenol per ml.

7.2 För med pipett över 1 ml vatten eller 1 ml av varje standardlösning (7.1) till provrören för att få fram en serie prover som innehåller 0 (nollvärdet som erhålls med 1 ml vatten) – 2 – 6 – 10 och 20 µg fenol.

7.3 För med pipett successivt över till varje provrör 1 ml av koppar(II)sulfatlösningen (4.7), 5 ml buffertlösning för färgspädning (4.6), 3 ml vatten och 0,1 ml av lösning E (4.5). Blanda.

7.4 Låt provrören stå i rumstemperatur i 30 minuter, skyddade för direkt solljus.

7.5 Mät lösningarnas absorbans i vart och ett av rören och jämför med nollvärdet vid den våglängd som anges i 5.3.

7.6 Gör i ordning standardkurvan genom att plotta absorbansvärdena mot fenolmängderna i µg enligt 7.2.

8. FÖRKLARING AV RESULTATEN

8.1 **Beräkning**

8.1.1 Räkna om siffervärdena enligt bestämningen i 6.2.9 till µg fenol med hjälp av standardkurvan.

8.1.2 Beräkna fosfatasaktiviteten uttryckt i µg fenol per ml rekonstituerad mjölk enligt följande formel:

$$\text{Fosfatasaktiviteten} = 2{,}4 \times P$$

där P = fenolmängden i µg enligt 8.1.1.

8.1.3 Om det var nödvändigt att späda ut enligt 6.2.10 skall resultatet i 8.1.2 multipliceras med spädningsfaktorn.

8.2 **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två bestämningar som utförs samtidigt eller i snabb följd på samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 2 µg frigjord fenol på 1 ml rekonstituerad mjölk.

METOD 8: BESTÄMNING AV FOSFATASAKTIVITETEN (ASCHAFFENBURG OCH MÜLLEN-METODEN)

1. OMFATTNING OCH ANVÄNDNINGSOMRÅDE

Denna metod beskriver bestämningen av fosfatasaktiviteten i:

— torkad mjölk med hög fetthalt eller mjölkpulver med hög fetthalt

— torkad helmjölk eller helmjölkspulver

— torkad, delvis skummad mjölk eller pulver av delvis skummad mjölk

— torkad skummjölk eller skummjölkspulver.

2. DEFINITION

Fosfatasaktiviteten i torkad mjölk är ett mått på den mängd aktiva alkaliska fosfataser som finns i varan. Den uttrycks som den mängd p-nitrofenol i mikrogram som frigörs av 1 ml av det rekonstituerade provet enligt de angivna förhållandena.

3. PRINCIP

Det rekonstituerade provet späds ut med buffertsubstrat vid pH 10,2 och inkuberas vid en temperatur av 37 °C i två timmar. Den alkaliska fosfatas som finns i provet kommer under dessa omständigheter att frigöra p-nitrofenol från tillsatt dinatrium-p-nitrofenylfosfat. Den frigjorda p-nitrofenolen bestäms genom direkt jämförelse med glas i standardfärg i en enkel komparator med reflekterat ljus.

4. REAGENSMEDEL

4.1 **Buffertlösning av natriumkarbonatbikarbonat**

Lös upp 3,5 g vattenfritt natriumkarbonat och 1,5 g natriumbikarbonat i vatten och späd med vatten i en mätkolv till 1 000 ml.

4.2 **Buffertsubstrat**

Lös upp 1,5 g dinatrium-p-nitrofenylfosfat i buffert av natriumkarbonatbikarbonat (4.1) och späd med bufferten (4.1) i en mätkolv till 1 000 ml

Om lösningen förvaras i kylskåp (≤ 4 °C) är den stabil i en månad, men färgen bör kontrolltestas på lösningar som förvaras på det här sättet — se 6, försiktighetsåtgärd 3.

4.3 **Klarningslösningar**

4.3.1 Zinksulfatlösning.
Lös upp 30,0 g zinksulfat ($ZnSO_4$) i vatten och späd med vatten i en mätkolv till 100 ml.

4.3.2 Kaliumhexacyanoferrat(II)lösning.
Lös upp 17,2 g kaliumhexacyanoferrat(II)trihydrat ($K_4Fe(CN)_6,3H_2O$) och späd med vatten i en mätkolv till 100 ml.

5. APPARATUR

5.1 Analysvåg.

5.2 Vattenbad, termostatreglerat till 37 °C ± 1 °C.

5.3 Komparator med specialskiva med glas i standardfärger kalibrerade i µg p-nitrofenol per ml mjölk och 2 x 25 mm celler.

6. FÖRFARANDE

Försiktighetsåtgärder:

1. Efter användningen måste provrören tömmas, sköljas i vatten, diskas i hett vatten med alkaliskt rengöringsmedel och därefter sköljas noggrant i rent, varmt ledningsvatten. Slutligen måste de sköljas i vatten och torkas innan de används på nytt.

   Pipetter måste genast efter användningen sköljas noggrant i rent, kallt ledningsvatten och därefter sköljas i vatten och torkas innan de används på nytt.

2. Proppar till provrör måste genast efter användningen sköljas noggrant i varmt ledningsvatten och därefter kokas två minuter i vatten.

3. Buffertsubstratlösningen (4.2) bör hålla sig stabil i minst en månad om den förvaras i kylskåp vid 4 °C eller svalare. Blir lösningen instabil, får den en gulaktig färg. Även om testet alltid jämförs med en kokt vara som innehåller samma buffertsubstratlösning, är det rekommendabelt att undvika att använda en lösning som ger ett färgutslag på mer än 10 µg vid avläsning i en 25 mm cell i komparatorn och med destillerat vatten i den andra 25 mm-cellen.

4. Använd en separat pipett för varje prov och undvik att förorena pipetten med saliv.

5. Testet får inte någon gång utsättas för direkt solljus.

6.1 **Beredning av provet**

Lös upp 10 g av pulvret i 90 ml vatten. Temperaturen vid upplösningen får inte överskrida 35 °C.

6.2 **Bestämning**

6.2.1 För med pipett över 15 ml buffertsubstrat (4.2) till ett rent, torrt provrör och därefter 2 ml av det rekonstituerade prov (6.1) som skall testas. Förslut röret, blanda genom inversion och placera det i ett vattenbad (5.2) som håller 37 °C.

6.2.2 Placera samtidigt i vattenbadet ett kontrollrör som innehåller 15 ml buffertsubstrat och 2 ml kokt, rekonstituerat prov av samma slag som det som testas.

6.2.3 Avlägsna båda rören från vattenbadet efter två timmar, tillsätt 0,5 ml zinksulfatlösning (4.3.1), sätt fast proppen igen, skaka kraftigt och låt rören stå i tre minuter. Tillsätt 0,5 ml kaliumhexacyanoferrat(II)lösning (4.3.2), blanda omsorgsfullt och filtrera genom det räfflade pappersfiltret (5.4) och samla upp det klara filtratet i det rena provröret.

6.2.4 För över filtratet till en 25 mm cell och jämför med filtratet från det kokta kontrollprovet i komparatorn med hjälp av specialskivan (5.3).

7. FÖRKLARING AV RESULTATEN

7.1 **Beräkning**

Den direkta avläsningen som erhålls enligt 6.2.4 noteras som µg p-nitrofenol per ml prov eller per ml rekonstituerat prov.

7.2 **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två bestämningar som utförts samtidigt eller i snabb följd på samma prov, av samma person och under samma betingelser får inte överskrida 2 µg frigjord p-nitrofenol på 1 ml rekonstituerad mjölk.