ERSTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 13. November 1979

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden zur Prüfung bestimmter Sorten eingedickter Milch und Trockenmilch für die menschliche Ernährung

(79/1067/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 76/118/EWG des Rates vom 18. Dezember 1975 zur Angleichung der Vorschriften der Mitgliedstaaten über bestimmte Sorten eingedickter Milch und Trockenmilch für die menschliche Ernährung (1), insbesondere auf Artikel 11,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gemäß Artikel 11 der Richtlinie 76/118/EWG sind die Zusammensetzung bestimmter Sorten eingedickter Milch und Trockenmilch nach gemeinschaftlichen Analysemethoden zu überprüfen.

Es empfiehlt sich, eine erste Reihe von Methoden zu beschließen, deren Erprobung abgeschlossen ist.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Lebensmittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die zur Überprüfung der in Anhang I aufgeführten Kriterien erforderlichen Analysen nach den in Anhang II beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

Artikel 2

Falls Alternativen zu den Methoden für eine einzelne Bestimmung angegeben werden, kann die Probe nach einer von diesen Methoden analysiert werden. Die angewandte Methode ist in dem in Anhang II genannten Prüfbericht anzugeben.

Artikel 3

Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie binnen 18 Monaten nach ihrer Bekanntgabe nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

Artikel 4

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 13. November 1979

Für die Kommission

Étienne DAVIGNON

Mitglied der Kommission

(1) ABl. Nr. L 24 vom 30. 1. 1976, S. 49.

ANHANG I

ANWENDUNGSBEREICH DER ERSTEN ANALYSENMETHODEN DER GEMEINSCHAFT FÜR DIE RICHTLINIE ÜBER BESTIMMTE GANZ ODER TEILWEISE GETROCKNETE, HALTBAR GEMACHTE MILCHSORTEN

I. **Einführung**

II. **Bestimmung der Trockenmasse von:**

— ungezuckerter Kondensmilch mit hohem Fettgehalt (Verwendung von Methode 1, Anhang II),
— ungezuckerter Kondensmilch (Verwendung von Methode 1, Anhang II),
— ungezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch (Verwendung von Methode 1, Anhang II),
— ungezuckerter Kondensmagermilch (Verwendung von Methode 1, Anhang II),
— gezuckerter Kondensmilch (Verwendung von Methode 1, Anhang II),
— gezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch (Verwendung von Methode 1, Anhang II),
— gezuckerter Kondensmagermilch (Verwendung von Methode 1, Anhang II).

III. **Bestimmung des Wassergehalts von:**

— Milchpulver mit hohem Fettgehalt (Verwendung von Methode 2, Anhang II),
— Milchpulver (Vollmilchpulver) (Verwendung von Methode 2, Anhang II),
— teilentrahmtem Milchpulver (Verwendung von Methode 2, Anhang II),
— Magermilchpulver (Verwendung von Methode 2, Anhang II).

IV. **Bestimmung von Fett in:**

— ungezuckerter Kondensmilch mit hohem Fettgehalt (Verwendung von Methode 3, Anhang II),
— ungezuckerter Kondensmilch (Verwendung von Methode 3, Anhang II),
— ungezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch (Verwendung von Methode 3, Anhang II),
— ungezuckerter Kondensmagermilch (Verwendung von Methode 3, Anhang II),
— gezuckerter Kondensmilch (Verwendung von Methode 3, Anhang II),
— gezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch (Verwendung von Methode 3, Anhang II),
— gezuckerter Kondensmagermilch (Verwendung von Methode 3, Anhang II),
— Milchpulver mit hohem Fettgehalt (Verwendung von Methode 4, Anhang II),
— Milchpulver (Vollmilchpulver) (Verwendung von Methode 4, Anhang II),
— teilentrahmtem Milchpulver (Verwendung von Methode 4, Anhang II),
— Magermilchpulver (Verwendung von Methode 4, Anhang II).

V. **Bestimmung von Saccharose in:**

— gezuckerter Kondensmilch (Verwendung von Methode 5, Anhang II),
— gezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch (Verwendung von Methode 5, Anhang II),
— gezuckerter Kondensmagermilch (Verwendung von Methode 5, Anhang II).

VI. **Bestimmung von Milchsäure und Lactaten in:**

— Milchpulver mit hohem Fettgehalt (Verwendung von Methode 6, Anhang II),
— Milchpulver (Vollmilchpulver) (Verwendung von Methode 6, Anhang II),
— teilentrahmtem Milchpulver (Verwendung von Methode 6, Anhang II),
— Magermilchpulver (Verwendung von Methode 6, Anhang II).

VII. **Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in:**

— Milchpulver mit hohem Fettgehalt (Verwendung von Methode 7 oder 8, Anhang II),
— Milchpulver (Vollmilchpulver) (Verwendung von Methode 7 oder 8, Anhang II),
— teilentrahmtem Milchpulver (Verwendung von Methode 7 oder 8, Anhang II),
— Magermilchpulver (Verwendung von Methode 7 oder 8, Anhang II).

ANHANG II

ANALYSENVERFAHREN BEZÜGLICH DER ZUSAMMENSETZUNG BESTIMMTER TEILWEISE ODER GANZ GETROCKNETER, HALTBAR GEMACHTER, FÜR DEN MENSCHLICHEN VERBRAUCH BESTIMMTER MILCHPRODUKTE

EINFÜHRUNG

1. VORBEREITUNG PER PROBE FÜR DIE CHEMISCHE ANALYSE

1.1. Ungezuckerte Kondensmilch mit hohem Fettgehalt
Ungezuckerte Kondensmilch
Ungezuckerte, teilentrahmte Kondensmilch
Ungezuckerte Kondensmagermilch

Die geschlossene Dose schütteln und stürzen. Die Dose öffnen und die Milch langsam in einen zweiten, hermetisch verschließbaren Behälter überführen, wobei durch wiederholtes Umgießen zu mischen ist. Sicherstellen, daß alle verbleibenden, an Wand und Boden haftenden Fett- und Milchreste mit der Probe vermischt werden. Den Behälter schließen. Wenn der Inhalt nicht homogen ist, den Behälter im Wasserbad auf 40 °C erhitzen. Alle 15 Minuten kräftig schütteln. Nach 2 Stunden den Behälter aus dem Wasserbad entnehmen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Den Deckel abnehmen und den Inhalt des Behälters mit einem Löffel oder Spatel gründlich mischen (falls sich das Fett abgeschieden hat, sollte die Probe nicht untersucht werden). Kühl lagern.

1.2. Gezuckerte Kondensmilch
Gezuckerte, teilentrahmte Kondensmilch
Gezuckerte Kondensmagermilch

Dosen: Die geschlossene Dose im Wasserbad bei 30 bis 40 °C ungefähr 30 Minuten anwärmen. Die Dose öffnen und den Inhalt mit einem Spatel oder einem Löffel durch Aufwärts-, Abwärts- und kreisförmige Bewegungen umrühren, um eine innige Vermischung der oberen und unteren Schichten mit dem Gesamtinhalt zu erreichen. Sicherstellen, daß die verbleibenden Milchreste am Rand und an der Wand sowie am Boden der Dose mit in die Probe eingehen. Den Inhalt soweit wie möglich in einen zweiten, mit einem luftdicht schließenden Deckel versehenen Behälter gießen. Den Behälter schließen und kühl lagern.

Tuben: Den Boden abschneiden und den Inhalt in einen mit einem luftdichten Deckel versehenen Behälter überführen. Dann die Tube der Länge nach aufschneiden. Alles Material aus dem Inneren herauskratzen und es sorgfältig mit dem Rest des Inhalts mischen. Den Behälter kühl lagern.

1.3. Milchpulver mit hohem Fettgehalt
Milchpulver (Vollmilchpulver)
Teilentrahmtes Milchpulver
Magermilchpulver

Das Milchpulver in einen sauberen, trockenen (mit luftdichtem Deckel versehenen) Behälter mit einem Fassungsvermögen vom doppelten Volumen des Pulvers überführen. Den Behälter sofort schließen und das Milchpulver durch wiederholtes Schütteln und Stürzen des Behälters gründlich mischen. Während der Vorbereitung der Probe sollte soweit wie möglich vermieden werden, daß das Milchpulver der Atmosphäre ausgesetzt wird, um die Feuchtigkeitsaufnahme auf ein Minimum zu reduzieren.

2. REAGENZIEN

2.1. Wasser

2.1.1. Wo immer Wasser für die Lösung, die Verdünnung oder das Waschen erwähnt wird, ist destilliertes oder entmineralisiertes Wasser von mindestens gleicher Reinheit zu verwenden.

2.1.2. Wo immer „Lösung" oder „Verdünnung" ohne weitere Angaben erwähnt wird, ist „Lösung in Wasser" oder „Verdünnung mit Wasser" gemeint.

2.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien müssen von anerkannter analytischer Reinheit sein, sofern nichts anderes angegeben wird.

3. GERÄTE UND HILFSMITTEL

3.1. **Listen für Geräte und Hilfsmittel**

Die Listen für Geräte und Hilfsmittel enthalten nur solche mit spezifischem Anwendungszweck und mit einer speziellen Spezifikation.

3.2. **Analysenwaage**

Analysenwaage bedeutet eine Waage mit einer Ablesegenauigkeit von mindestens 0,1 mg.

4. ANGABE DER ERGEBNISSE

4.1. **Berechnung des Gehalts**

Wenn nicht anders angegeben, wird das Ergebnis als Massengehalt der Probe in %, wie sie vom Laboratorium erhalten wurde, berechnet.

4.2. **Anzahl der signifikanten Stellen**

Das Ergebnis soll nicht mehr signifikante Zahlenstellen enthalten als durch die Genauigkeit der verwendeten Analysenmethode zu rechtfertigen ist.

5. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht sind die Analysenmethoden und die erhaltenen Ergebnisse anzugeben. Zusätzlich sind alle Verfahrendetails anzugeben, die in der Analysenmethode nicht spezifiziert oder die wahlweise gestattet sind, sowie alle Umstände, die möglicherweise das erhaltene Ergebnis beeinflußt haben.

Der Prüfbericht muß alle für die vollständige Identifizierung der Probe erforderlichen Daten enthalten.

METHODE 1: BESTIMMUNG DER TROCKENMASSE
(Trockenschrank 99 °C)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Nach dieser Methode wird bestimmt der Trockenmassegehalt von

— ungezuckerter Kondensmilch mit hohem Fettgehalt,
— ungezuckerter Kondensmilch,
— ungezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch,
— ungezuckerter Kondensmagermilch,
— gezuckerter Kondensmilch,
— gezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch,
— gezuckerter Kondensmagermilch.

2. DEFINITION

Trockenmasse von Kondensmilch: die nach dieser Methode bestimmte Trockenmasse.

3. PRINZIP DER METHODE

Eine bekannte Menge der Probe wird mit Wasser verdünnt, mit Sand gemischt und bei einer Temperatur von 99 ± 1 °C getrocknet. Die Masse nach der Trocknung ist die Trockenmasse. Die Trockenmasse wird als Massenprozent der Probe berechnet.

4. REAGENZIEN

Quarzsand oder Seesand, mit Salzsäure behandelt (Korngröße: 0,18 bis 0,5 mm, d. h. er passiert ein 500-Mikronnetz und wird von einem 180-Mikronnetz zurückgehalten). Er sollte die folgende Prüfung bestehen:

Etwa 25 g Sand 2 Stunden in einem Trockenschrank (5.3), wie unter 6.1 bis 6.3 beschrieben, erhitzen. 5 ml Wasser hinzugeben, erneut im Trockenschrank 2 Stunden erhitzen, abkühlen und nochmals wiegen. Die Differenz zwischen den beiden Massen sollte 0,5 mg nicht überschreiten.

Wenn notwendig, den Sand mit Salzsäurelösung (25 %) 3 Tage behandeln; gelegentlich umrühren. Mit Wasser waschen, bis die Säurereaktion verschwindet oder das Waschwasser chloridfrei ist. Bei 160 °C trocknen und erneut wie oben prüfen.

5. GERÄTE

5.1. Analysenwaage

5.2. Metallschalen, vorzugsweise aus Nickel, Aluminium, oder rostfreiem Stahl. Die Schalen sollten Deckel haben, die sehr gut schließen, jedoch schnell abgenommen werden können. Geeignete Abmessungen sind: Durchmesser 60 bis 80 mm und Tiefe etwa 25 mm.

5.3. Trockenschrank mit atmosphärischem Druck, gut belüftet, thermostatisch geregelt, für eine Temperatur von 99 ± 1 °C. Die Temperatur soll im ganzen Schrank gleichmäßig sein.

5.4. Exsikkator mit frisch aktiviertem, einen Feuchtigkeitsindikator enthaltenden Silikagel oder mit einem gleichwertigen Trockenmittel.

5.5. Glasstäbe, an einem Ende abgeflacht und einer Länge, daß sie in die Metallschalen (5.2) überführt werden können.

5.6. Wasserbad, siedend

6. DURCHFÜHRUNG

6.1. Etwa 25 g Sand (4) und einem kurzen Glasstab (5.5) in die Schale (5.2) überführen.

6.2. Schale, Deckel und Inhalt bei abgenommenem Deckel 2 Stunden im Trockenschrank (5.3) erhitzen.

6.3. Deckel wieder aufsetzen und die Schale in den Exsikkator geben. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen und auf 0,1 mg genau abwiegen (M_0).

6.4. Den Sand auf eine Seite der Schale kippen. In den Freiraum etwa 1,5 g der Probe bei gezuckerter Kondensmilch und 3,0 g bei ungezuckerter Kondensmilch überführen. Den Deckel erneut aufsetzen und auf 0,1 mg genau wiegen (M_1).

6.5. Den Deckel abnehmen, 5 ml Wasser hinzugeben und mit Hilfe des Glasstabs (5.5) die Flüssigkeiten mischen, anschließend den Sand und den flüssigen Teil. Den Stab in der Mischung belassen.

6.6. Die Schale auf das siedende Wasserbad (5.6) stellen, bis das Wasser verdampft ist; das dauert normalerweise 20 Minuten. Die Mischung von Zeit zu Zeit mit dem Stab umrühren, um die Masse gut zu belüften, so daß die Masse beim Trocknen keinen Kuchen bildet. Den Stab in der Schale belassen.

6.7. Schale und Deckel für 1 Stunde und 30 Minuten in den Trockenschrank stellen.

6.8. Den Deckel erneut aufsetzen, die Schale in den Exsikkator (5.4) stellen, auf Raumtemperatur abkühlen und anschließend auf 0,1 mg genau abwiegen.

6.9. Die Schale öffnen und mit ihrem Deckel im Trockenschrank 1 Stunde erhitzen.

6.10. Arbeitsgänge nach 6.8 wiederholen.

6.11. Die beschriebenen Arbeitsgänge 6.9 und 6.10 wiederholen, bis die Massendifferenz zweier aufeinanderfolgender Wägungen weniger als 0,5 mg ausmacht oder bis die Masse zunimmt. Bei Auftreten einer Massezunahme wird bei der Berechnung (7.1) die geringste erhaltene Masse verwendet. Das endgültig erhaltene Gewicht wird als M_2g bezeichnet.

7. AUSWERTUNG

7.1. **Berechnung**

Der Trockenmassegehalt, der als % Masse der Probe angegeben wird, ergibt sich durch:

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

dabei ist:
- M_0 = Masse in g von Schale, Deckel und Sand nach Arbeitsgang 6.3;
- M_1 = Masse in g von Schale, Deckel, Sand und Probe nach Arbeitsgang 6.4;
- M_2 = Masse in g von Schale, Deckel, Sand und getrockneter Probe nach Arbeitsgang 6.11.

7.2. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander von demselben Untersucher mit der gleichen Probe und unter denselben Bedingungen durchgeführt worden sind, darf 0,2 g Trockenmasse je 100 g Erzeugnis nicht überschreiten.

8. BERECHNUNG DER MILCHTROCKENMASSE UND DER FETTFREIEN MILCHTROCKENMASSE

8.1. Die Milchtrockenmasse in gezuckerter Kondensmilch ergibt sich aus:

Gesamttrockenmasse (erhalten nach Methode 1, Anhang II) — Saccharose (erhalten nach Methode 5, Anhang II).

8.2. Die fettfreie Milchtrockenmasse in gezuckerter Kondensmilch ergibt sich aus:

Gesamttrockenmasse (erhalten nach Methode 1, Anhang II) — Saccharosegehalt (erhalten nach Methode 5, Anhang II) und Fettgehalt (erhalten nach Methode 3, Anhang II).

8.3. Die fettfreie Milchtrockenmasse in ungezuckerter Kondensmilch ergibt sich aus:

Gesamttrockenmasse (erhalten durch Methode 1, Anhang II) — Fettgehalt (erhalten durch Methode 3, Anhang II).

METHODE 2: BESTIMMUNG DES WASSERGEHALTS

(Trockenschrank 102 °C)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Nach dieser Methode wird bestimmt der Wassergehalt von:

- Milchpulver mit hohem Fettgehalt,
- Milchpulver (Vollmilchpulver),
- teilentrahmtem Milchpulver,
- Magermilchpulver.

2. DEFINITION

Wassergehalt: der nach dieser Methode bestimmte Massenverlust beim Trocknen.

3. PRINZIP

Die verbleibende Masse der Probe wird durch Trocknung bei atmosphärischem Druck im Trokkenschrank bei 102 ± 1 °C bis zur Massenkonstanz bestimmt. Der Massenverlust wird als Massenprozent der Probe berechnet.

4. GERÄTE

4.1. Analysenwaage

4.2. Schalen, vorzugsweise aus Nickel, Aluminium, rostfreiem Stahl oder Glas. Die Schalen müssen Deckel haben, die sehr gut schließen, jedoch schnell abgenommen werden können. Geeignete Abmessungen sind: Durchmesser 60 bis 80 mm und Tiefe etwa 25 mm.

4.3. Trockenschrank mit atmosphärischem Druck, gut belüftet, thermostatisch geregelt, für eine Temperatur von 102 ± 1 °C. Die Temperatur soll im ganzen Trockenschrank gleichmäßig sein.

4.4. Exsikkator, mit frisch aktiviertem, einen Feuchtigkeitsindikator enthaltenden Silikagel oder mit einem gleichwertigen Trockenmittel.

5. DURCHFÜHRUNG

5.1. Die Schale (4.2) abdecken und mit dem Deckel in den Trockenschrank (4.3) für etwa eine Stunde stellen.

5.2. Den Deckel auf die Schale setzen und die Schale in den Exsikkator (4.4) stellen. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen und auf 0,1 mg genau abwiegen (M_0).

5.3. Etwa 2 g der Trockenmilchprobe in die Schale überführen, die Schale mit dem Deckel zudecken und die zugedeckte Schale schnell auf 0,1 mg genau abwiegen (M_1).

5.4. Die Schale abdecken und sie mit dem Deckel für 2 Stunden in den Trockenschrank stellen.

5.5. Den Deckel aufsetzen, die zugedeckte Schale in den Exsikkator überführen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen und schnell auf 0,1 mg genau wiegen.

5.6. Die Schale abdecken und mit dem Deckel 1 Stunde im Trockenschrank erhitzen.

5.7. Arbeitsgang 5.5 wiederholen.

5.8. Arbeitsgänge 5.6 und 5.7 wiederholen, bis die Massenabnahme zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wiegevorgängen 0,5 mg nicht überschreitet oder bis die Masse zunimmt. Wenn eine Massenzunahme eintritt, wird die geringste erhaltene Masse für die Berechnung (6.1) verwendet. Das endgültige Gewicht wird als M_2 bezeichnet.

6. AUSWERTUNG

6.1. **Berechnung**

Der Massenverlust beim Trocknen der Probe, ausgedrückt als Masse in %, wird nach folgender Formel berechnet:

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

dabei ist:
M_0 = die Masse in g der Schale und ihres Deckels nach Arbeitsgang 5.2;
M_1 = die Masse in g der Schale, ihres Deckels und der Probe nach Arbeitsgang 5.3;
M_2 = die Masse in g der Schale, ihres Deckels und der getrockneten Probe nach Arbeitsgang 5.5.

6.2. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander von demselben Untersucher mit der gleichen Probe und unter denselben Bedingungen durchgeführt worden sind, darf 0,1 g Wasser je 100 g Erzeugnis nicht überschreiten.

METHODE 3: BESTIMMUNG DES FETTGEHALTS (RÖSE-GOTTLIEB-METHODE)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Nach dieser Methode wird bestimmt der Fettgehalt von:

— ungezuckerter Kondensmilch mit hohem Fettgehalt,
— ungezuckerter Kondensmilch,
— ungezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch,
— ungezuckerter Kondensmagermilch,
— gezuckerter Kondensmilch,
— gezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch,
— gezuckerter Kondensmagermilch.

2. DEFINITION

Der Fettgehalt von Kondensmilch: der nach der angegebenen Methode bestimmte Fettgehalt.

3. PRINZIP DER METHODE

Der Fettgehalt wird durch Extraktion des Fettes aus einer Ammoniak-Alkohollösung der Probe mit Diäthyläther und Petroläther und anschließender Verdampfung der Lösungsmittel und Wiegen des Rückstands und Berechnung als Massenprozent der Probe entsprechend dem Röse-Gottlieb-Prinzip bestimmt.

4. REAGENZIEN

Alle Reagenzien sollen den im Blindversuch (6.1) angegebenen Anforderungen entsprechen. Wenn nötig, können die Reagenzien in Gegenwart von etwa 1 g Butterfett pro 100 ml Lösungsmittel erneut destilliert werden.

4.1 Ammoniaklösung, etwa 25 % (m/m) NH_3 (Dichte bei 20°C etwa 0,91 g/ml) oder eine stärkere Lösung bekannter Konzentration.

4.2. Äthanol, 96 ± 2 % (v/v) oder, wenn nicht vorhanden, mit Methanol, Methyl-Äthyl-Keton oder Petroläther denaturiertes Äthanol.

4.3. Diäthyläther, peroxidfrei.

Anmerkung 1:

Zur Prüfung auf Peroxide wird zu 10 ml Äther in einen kleinen, mit Glasstopfen verschließbaren Meßzylinder, der vorher mit etwas Äther ausgespült wurde, 1 ml einer frisch zubereiteten 10%igen Kaliumjodidlösung gegeben, schütteln und während 1 Minute stehen lassen. In keiner der beiden Schichten darf eine gelbe Verfärbung entstehen.

Anmerkung 2:

Der Diäthyläther kann frei von Peroxiden aufbewahrt werden, indem eine feuchte Zinkfolie zugegeben wird, die vorher für 1 Minute in eine verdünnte, angesäuerte Kupfersulfatlösung getaucht, dann mit Wasser abgewaschen wurde. Für 1 l Diäthyläther eine Zinkfolie von ca. 8 000 mm^2, die in genügend lange Streifen geschnitten ist, verwenden, die mindestens bis zur Hälfte des Behälters reichen.

4.4. Petroläther mit einem Siedebereich zwischen 30 und 60 °C.

4.5. Lösungsmittelmischung, kurz vor Verwendung durch Mischen gleicher Volumina von Diäthyläther (4.3) und Petroläther (4.4) hergestellt. (Man kann die Lösungsmittelmischung, dort wo ihre Verwendung vorgeschrieben ist, durch Diäthyläther oder Petroläther ersetzen.)

5. GERÄTE

5.1. Analysenwaage

5.2. Geeignete Extraktionsrohre oder Kolben, mit eingeschliffenen Glasstopfen oder anderen Verschlüssen, die gegen die verwendeten Lösungsmittel unempfindlich sind.

5.3. Dünnwandige Stehkolben, Nennvolumen 150 bis 250 ml.

5.4. Trockenschrank mit atmosphärischem Druck, gut belüftet und thermostatisch reguliert (für einen Betrieb bei 102 ± 1 °C eingestellt).

5.5. Siedesteinchen, fettfrei, nicht porös, bei Verwendung nicht brüchig, z. B. Glasperlen oder Stückchen von Siliciumcarbid (die Verwendung dieses Materials ist wahlfrei; siehe 6.2.1).

5.6. Heber, passend zu den Extraktionsrohren.

5.7. Zentrifuge (wahlweise).

6. DURCHFÜHRUNG

6.1. Blindversuch

Gleichzeitig mit der Bestimmung des Fettgehalts der Probe einen Blindversuch durchführen mit 10 ml destilliertem Wasser unter Verwendung des gleichen Extraktionsgerätetyps, der gleichen Reagenzien in den gleichen Verhältnissen und unter Anwendung der gleichen Arbeitsgänge wie nachstehend beschrieben, mit Ausnahme von 6.2.2. Wenn der Blindwert mehr als 0,5 mg beträgt, so sollten die Reagenzien überprüft und das oder die unreinen Reagenzien ersetzt oder gereinigt werden.

6.2. Durchführung der Untersuchung

6.2.1. Den Kolben (5.3) (gegebenenfalls mit den Siedesteinchen) (5.5), die ein gemäßigtes Sieden während des Verdampfens der Lösungsmittel erleichtern) im Trockenschrank (5.4) während 1/2 bis 1 Stunde trocknen. Den Kolben auf die Temperatur des Wägeraums abkühlen lassen und den abgekühlten Kolben auf 0,1 mg genau wiegen.

6.2.2. Die vorbereitete Probe durchrühren und sofort, bei gezuckerten Proben 2 bis 2,5 g, bei ungezuckerten Proben 4 bis 5 g direkt oder durch Differenzwägung auf 0,1 mg genau in das Extraktionsgefäß (5.2) einwiegen. Wasser bis zu einem Volumen von 10,5 ml hinzufügen, unter leichtem Erwärmen (40 bis 50 °C) vorsichtig bis zur vollständigen Verteilung des Erzeugnisses schütteln. Die Probe muß vollständig dispergiert werden, anderenfalls ist die Bestimmung zu wiederholen.

6.2.3. 1,5 ml Ammoniaklösung (25 %) (4.1) oder ein äquivalentes Volumen einer stärkeren Lösung hinzufügen und gut mischen.

6.2.4. 10 ml Äthanol (4.2) hinzufügen und die Flüssigkeiten langsam aber vollständig im unverschlossenen Gerät mischen.

6.2.5. 25 ml Diäthyläther (4.3) hinzufügen. Unter fließendem Wasser abkühlen. Das Gerät schließen und während einer Minute kräftig schütteln und dabei wiederholt stürzen.

6.2.6. Den Stopfen vorsichtig abnehmen und 25 ml Petroläther hinzufügen (4.4), wobei die ersten wenigen Milliliter zum Abspülen des Stopfens und der Innenseite des Gerätehalses zu verwenden sind; die Spülflüssigkeit läßt man in das Gerät fließen. Das Gerät wieder mit dem Stopfen schließen, mehrmals während 30 Sekunden schütteln und wiederholt stürzen. Wenn man bei dem unter 6.2.7 beschriebenen Arbeitsgang kein Zentrifugieren vorsieht, so darf nicht zu kräftig geschüttelt werden.

6.2.7. Das Gerät stehen lassen, bis die obere Flüssigkeitsschicht klar geworden ist und sich eindeutig von der wäßrigen Schicht getrennt hat. Man kann die Trennung auch mittels einer geeigneten Zentrifuge (5.7) durchführen.

Anmerkung:

Bei Verwendung einer Zentrifuge, die nicht mit einem dreiphasigen Motor ausgestattet ist, können Funken entstehen, und es muß daher besonders darauf geachtet werden, daß eine Explosion oder ein Brand verhindert werden, welche durch die Anwesenheit von Ätherdämpfen entstehen können (z. B. im Falle eines Rohrbruchs).

6.2.8. Den Stopfen abnehmen, ihn und die Innenseite des Gerätehalses mit einigen Millilitern der Lösungsmittelmischung (4.5) abspülen und die Spülflüssigkeit in das Gerät fließen lassen. Durch Dekantieren oder mit einem Heber sorgfältig und so vollständig wie möglich die überstehende Schicht in den Kolben (6.2.1) überführen.

Anmerkung:

Wenn die Überführung nicht mittels eines Hebers durchgeführt wird, kann es notwendig sein, etwas Wasser hinzuzufügen, um die Phasengrenze zwischen den beiden Flüssigkeiten zur Erleichterung des Dekantierens zu erhöhen.

6.2.9. Die Außen- und Innenseite des Gerätehalses oder die Spitze und den unteren Teil des Hebers mit einigen Millilitern der Lösungsmittelmischung abspülen. Die Spülflüssigkeit der Geräte-

außenseite in den Kolben fließen lassen und diejenige der Innenseite und des Hebers in das Extraktionsgerät.

6.2.10. Eine zweite Extraktion unter Wiederholung der unter 6.2.5 bis einschließlich 6.2.9 beschriebenen Arbeitsgänge, jedoch unter Anwendung von nur 15 ml Diäthyläther und 15 ml Petroläther durchführen.

6.2.11. Eine dritte Extraktion gemäß 6.2.10, jedoch ohne die letzte Spülung (6.2.9) durchführen.

Anmerkung:

Bei ungezuckerter und gezuckerter Kondensmagermilch ist die dritte Extraktion nicht notwendig.

6.2.12. Durch sorgfältiges Verdampfen oder Destillieren so viel wie möglich an Lösungsmittel (einschließlich des Äthanols) entfernen. Wenn das Fassungsvermögen des Kolbens klein ist, so muß nach jeder Extraktion auf die oben beschriebene Weise etwas Lösungsmittel entfernt werden.

6.2.13. Wenn kein Lösungsmittelgeruch mehr vorhanden ist, den Kolben liegend während 1 Stunde im Trockenschrank erhitzen.

6.2.14. Den Kolben auf die Temperatur des Wägeraums abkühlen lassen und auf 0,1 mg genau wiegen.

6.2.15. Die beschriebenen Arbeitsgänge 6.2.13 und 6.2.14 wiederholen, bis die Massendifferenz zweier aufeinanderfolgender Wägungen weniger als 0,5 mg ausmacht oder bis die Masse zunimmt. Bei Auftreten einer Massenzunahme wird bei der Berechnung (7.1) die geringste erhaltene Masse verwendet. Das endgültig erhaltene Gewicht wird als M_1 g bezeichnet.

6.2.16. 15 bis 25 ml Petroläther hinzufügen, um zu prüfen, ob die extrahierte Substanz vollständig löslich ist. Das Lösungsmittel leicht erwärmen und schütteln, bis das ganze Fett gelöst ist.

6.2.16.1. Wenn die extrahierte Substanz im Petroläther vollständig löslich ist, so ist der Unterschied zwischen den Wägungen unter 6.2.1 und 6.2.15 die Masse des Fettes.

6.2.16.2. Wenn unlösliche Substanzen vorhanden sind oder im Falle von Zweifel das im Kolben enthaltene Fett vollständig durch wiederholtes Waschen mit warmem Petroläther extrahieren, wobei das Unlösliche sich vor jedem Dekantieren absetzen soll. Dreimal die Außenseite des Kolbenhalses spülen. Den Kolben liegend 1 Stunde im Trockenschrank erhitzen, wie oben angegeben (6.2.1), auf die Temperatur des Wägeraumes abkühlen lassen und auf 0,1 mg genau wiegen. Die Fettmenge ist die Differenz zwischen der Masse nach 6.2.15 und dieser endgültigen Masse.

7. AUSWERTUNG

7.1. Berechnung

Die in Gramm ausgedrückte Masse des extrahierten Fettes ist:

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

und der Fettgehalt der Probe in % ist:

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

Dabei bedeutet:

M_1 = Masse des Kolbens M mit dem Fett nach Arbeitsgang 6.2.15 in g;

M_2 = Masse des Kolbens M in g nach dem Arbeitsgang 6.2.1 oder im Fall von Ungelöstem oder Zweifel nach Arbeitsgang 6.2.16.2;

B_1 = Masse des Kolbens B in g vom Blindversuch nach Arbeitsgang 6.2.15;

B_2 = Masse des Kolbens B in g nach Arbeitsgang 6.2.1 oder im Falle von Ungelöstem oder Zweifel nach Arbeitsgang 6.2.16.2.;

S = Masse der verwendeten Probe in g.

7.2. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander von demselben Untersucher und unter denselben Bedingungen mit der gleichen Probe durchgeführt worden sind, darf 0,05 g Fett pro 100 g des Erzeugnisses nicht überschreiten.

METHODE 4: BESTIMMUNG DES FETTGEHALTS (RÖSE-GOTTLIEB-METHODE)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Nach dieser Methode wird bestimmt der Fettgehalt von:

— Milchpulver mit hohem Fettgehalt,
— Milchpulver (Vollmilchpulver),
— teilentrahmtem Milchpulver,
— Magermilchpulver.

2. DEFINITION

Der Fettgehalt von getrockneter Milch: der nach der angegebenen Methode bestimmte Fettgehalt.

3. PRINZIP DER METHODE

Der Fettgehalt wird durch Extraktion des Fettes aus einer Ammoniak-Alkohollösung des Milchpulvers mit Diäthyläther und Petroläther und anschließender Verdampfung der Lösungsmittel und Wiegen des Rückstands und Berechnung als Massenprozent der Probe entsprechend dem Röse-Gottlieb-Prinzip bestimmt.

4. REAGENZIEN

Alle Reagenzien sollen den im Blindversuch (6.1) angegebenen Anforderungen entsprechen. Wenn nötig, können die Lösungsmittel in Gegenwart von etwa 1 g Butterfett pro 100 ml Lösungsmittel erneut destilliert werden.

4.1. Ammoniaklösung, etwa 25 % (m/m) NH_3 (Dichte bei 20 °C etwa 0,91 g/ml) oder eine stärkere Lösung bekannter Konzentration.

4.2. Äthanol, 96 ± 2 % (v/v) oder, wenn nicht vorhanden, mit Methanol, Äthyl-Keton oder Petroläther denaturiertes Äthanol.

4.3. Diäthyläther, peroxidfrei

Anmerkung 1:

Zur Prüfung auf Peroxide wird zu 10 ml Äther in einen kleinen, mit Glasstopfen verschließbaren Meßzylinder, der vorher mit etwas Äther ausgespült wurde, 1 ml einer frisch zubereiteten 10%igen Kaliumjodidlösung gegeben, schütteln und während 1 Minute stehen lassen. In keiner der beiden Schichten darf eine gelbe Verfärbung entstehen.

Anmerkung 2:

Der Diäthyläther kann frei von Peroxiden aufbewahrt werden, indem eine feuchte Zinkfolie zugegeben wird, die vorher während 1 Minute in eine verdünnte, angesäuerte Kupfersulfatlösung getaucht, dann mit Wasser abgewaschen wurde. Für 1 l Diäthyläther eine Zinkfolie von ca. 8 000 mm^2, die in genügend lange Streifen geschnitten ist, verwenden, so daß diese mindestens bis zur Hälfte des Behälters reichen.

4.4. Petroläther mit einem Siedebereich zwischen 30 und 60 °C.

4.5. Lösungsmittelmischung, kurz vor Verwendung durch Mischen gleicher Volumina von Diäthyläther (4.3) und Petroläther (4.4) hergestellt. (Man kann die Lösungsmittelmischung dort, wo ihre Verwendung vorgeschrieben ist, durch Diäthyläther oder Petroläther ersetzen.)

5. GERÄTE

5.1. Analysenwaage

5.2. Geeignete Extraktionsrohre oder Kolben mit eingeschliffenem Glasstopfen oder anderen Verschlüssen, die gegen die verwendeten Lösungsmittel unempfindlich sind

5.3. Dünnwandige Stehkolben, Nennvolumen 150 bis 250 ml

5.4. Trockenschrank mit atmosphärischem Druck, gut belüftet und thermostatisch reguliert (für einen Betrieb bei 102 ± 1 °C eingestellt)

5.5. Siedesteinchen, fettfrei, nicht porös, bei Verwendung nicht brüchig, z. B. Glasperlen oder Stückchen von Siliciumcarbid (die Verwendung dieses Materials ist wahlfrei; siehe 6.2.1)

5.6. Wasserbad, bei 60 bis 70 °C

5.7. Heber, passend zu den Extraktionsrohren

5.8. Zentrifuge (wahlweise)

6. DURCHFÜHRUNG

6.1. Blindversuch

Gleichzeitig mit der Bestimmung des Fettgehalts der Probe einen Blindversuch durchführen mit 10 ml destilliertem Wasser unter Verwendung des gleichen Extraktionsgerätetyps, der gleichen Reagenzien in den gleichen Verhältnissen und unter Anwendung der gleichen Arbeitsgänge wie nachstehend beschrieben, mit Ausnahme von 6.2.2. Wenn der Blindwert mehr als 0,5 mg beträgt, so sollten die Reagenzien überprüft und das oder die unreinen Reagenzien ersetzt oder gereinigt werden.

6.2. Durchführung der Untersuchung

6.2.1. Den Kolben (5.3) (gegebenenfalls mit den Siedesteinchen (5.5), die ein gemäßigtes Sieden während des Verdampfens der Lösungsmittel erleichtern) im Trockenschrank (5.4) während $^1/_2$ bis 1 Stunde trocknen. Den Kolben auf die Temperatur des Wägeraums abkühlen lassen und den abgekühlten Kolben auf 0,1 mg genau wiegen.

6.2.2. Entweder direkt oder durch Differenzwägung ca. 1 g Vollmilchpulver oder ca. 1,5 g teilentrahmtes Milchpulver oder Magermilchpulver auf 0,1 mg genau in das Extraktionsgerät (5.2) einwiegen. 10 ml Wasser hinzufügen und bis zur vollständigen Lösung des Milchpulvers leicht schütteln (bei einigen Proben kann Erwärmung notwendig sein).

6.2.3. 1,5 ml Ammoniaklösung (25 %) (4.1) hinzufügen oder ein äquivalentes Volumen einer stärkeren Lösung und im Wasserbad (5.6) unter gelegentlichem Umschwenken 15 Minuten auf 60 bis 70 °C erwärmen, danach kühlen, z. B. unter fließendem Wasser.

6.2.4. 10 ml Äthanol (4.2) hinzufügen und die Flüssigkeiten vorsichtig aber vollständig im unverschlossenen Extraktionsgerät mischen.

6.2.5. 25 ml Diäthyläther (4.3) hinzufügen, unter fließendem Wasser kühlen. Das Gerät schließen und 1 Minute lang kräftig schütteln und dabei mehrmals stürzen.

6.2.6. Den Stopfen vorsichtig abnehmen und 25 ml Petroläther hinzufügen (4.4), wobei die ersten wenigen Milliliter zum Abspülen des Stopfens und der Innenseite des Gerätehalses zu verwenden sind; die Spülflüssigkeit läßt man in das Gerät fließen. Das Gerät wieder mit dem Stopfen schließen, mehrmals während 30 Sekunden schütteln und wiederholt stürzen. Wenn man bei dem unter 6.2.7 beschriebenen Arbeitsgang kein Zentrifugieren vorsieht, so darf nicht zu kräftig geschüttelt werden.

6.2.7. Das Gerät stehen lassen, bis die obere Flüssigkeitsschicht klar geworden ist und sich deutlich von der wäßrigen Schicht getrennt hat. Man kann die Trennung auch mittels einer geeigneten Zentrifuge (5.8) durchführen.

Anmerkung:

Bei Verwendung einer Zentrifuge, die nicht mit einem dreiphasigen Motor ausgestattet ist, können Funken entstehen, und es muß daher besonders darauf geachtet werden, daß eine Explosion oder ein Brand verhindert werden, welche durch die Anwesenheit von Ätherdämpfen entstehen können (z. B. im Falle eines Rohrbruchs).

6.2.8. Den Stopfen abnehmen, ihn und die Innenseite des Gerätehalses mit einigen Millilitern der Lösungsmittelmischung (4.5) abspülen und die Spülflüssigkeit in das Gerät fließen lassen. Durch Dekantieren oder mit einem Heber (5.7) sorgfältig und so vollständig wie möglich die überstehende Schicht in den Kolben (6.2.1) überführen.

Anmerkung:

Wenn die Überführung nicht mittels eines Hebers durchgeführt wird, kann es notwendig sein, etwas Wasser hinzuzufügen, um die Phasengrenze zwischen den beiden Flüssigkeiten zur Erleichterung des Dekantierens zu erhöhen.

6.2.9. Die Außen- und Innenseite des Gerätehalses oder die Spitze und den unteren Teil des Hebers mit einigen Millilitern der Lösungsmittelmischung abspülen. Die Spülflüssigkeit der Geräte-

außenseite in den Kolben fließen lassen und diejenige der Innenseite und des Hebers in das Extraktionsgerät.

6.2.10. Eine zweite Extraktion unter Wiederholung der unter 6.2.5 bis einschließlich 6.2.9 beschriebenen Arbeitsgänge, jedoch unter Anwendung von nur 15 ml Diäthyläther und 15 ml Petroläther durchführen.

6.2.11. Eine dritte Extraktion gemäß 6.2.10, jedoch ohne die letzte Spülung (6.2.9) durchführen.

Anmerkung:

Bei Magermilchpulver ist die dritte Extraktion nicht notwendig.

6.2.12. Durch sorgfältiges Verdampfen oder Destillieren so viel wie möglich an Lösungsmittel (einschließlich des Äthanols) entfernen. Wenn das Fassungsvermögen des Kolbens klein ist, so muß nach jeder Extraktion auf die oben beschriebene Weise etwas Lösungsmittel entfernt werden.

6.2.13. Wenn kein Lösungsmittelgeruch mehr vorhanden ist, den Kolben liegend während 1 Stunde im Trockenschrank erhitzen.

6.2.14. Den Kolben auf die Temperatur des Wägeraums abkühlen lassen, wie weiter oben angeführt (6.2.1), und auf 0,1 mg genau wiegen.

6.2.15. Durch sorgfältiges Verdampfen oder Destillieren so viel wie möglich an Lösungsmittel (ein- aufeinanderfolgender Wägungen weniger als 0,5 mg ausmacht oder bis die Masse zunimmt.

Bei Auftreten einer Massenzunahme wird bei der Berechnung (7.1) die geringste erhaltene Masse verwendet. Das endgültig erhaltene Gewicht wird als M_1 g bezeichnet.

6.2.16. 15 bis 25 ml Petroläther hinzufügen, um zu prüfen, ob die extrahierte Substanz vollständig löslich ist. Das Lösungsmittel leicht erwärmen und schütteln, bis das ganze Fett gelöst ist.

6.2.16.1. Wenn die extrahierte Substanz im Petroläther vollständig löslich ist, so ist der Unterschied zwischen den Wägungen unter 6.2.1 und 6.2.15 die Masse des Fettes.

6.2.16.2. Wenn unlösliche Substanzen vorhanden sind, oder im Falle von Zweifel das im Kolben enthaltene Fett vollständig durch wiederholtes Waschen mit warmem Petroläther extrahieren, wobei das Unlösliche sich vor jedem Dekantieren absetzen soll. Dreimal die Außenseite des Kolbenhalses spülen.

Den Kolben liegend 1 Stunde im Trockenschrank erhitzen, wie oben angegeben (6.2.1), auf die Temperatur des Wägeraums abkühlen lassen und auf 0,1 mg genau wiegen. Die Fettmenge ist die Differenz zwischen der Masse nach 6.2.15 und dieser endgültigen Masse.

7. AUSWERTUNG

7.1. Berechnung

Die in Gramm ausgedrückte Masse des extrahierten Fettes ist:

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

und der Fettgehalt der Probe in % ist:

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

dabei bedeutet:

M_1 = Masse des Kolbens M mit dem Fett nach Arbeitsgang 6.2.15 in g;

M_2 = Masse des Kolbens M in g nach dem Arbeitsgang 6.2.1 oder im Fall von Ungelöstem oder Zweifel nach Arbeitsgang 6.2.16.2;

B_1 = Masse des Kolbens B in g vom Blindversuch nach Arbeitsgang 6.2.15;

B_2 = Masse des Kolbens B in g nach Arbeitsgang 6.2.1 oder im Fall von Ungelöstem oder Zweifel nach Arbeitsgang 6.2.16.2;

S = Masse der verwendeten Probe in g.

7.2. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander von demselben Untersucher mit der gleichen Probe und unter denselben Bedingungen durchgeführt worden sind, darf 0,2 g Fett pro 100 g des Erzeugnisses nicht überschreiten mit Ausnahme von Magermilchpulver, bei dem die Differenz 0,1 g Fett pro 100 g des Erzeugnisses nicht überschreiten darf.

METHODE 5: BESTIMMUNG DES SACCHAROSEGEHALTS (POLARIMETRISCHE METHODE)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Nach dieser Methode wird bestimmt der Saccharosegehalt von:

— gezuckerter Kondensmilch,
— gezuckerter, teilentrahmter Kondensmilch,
— gezuckerter Kondensmagermilch.

Die Proben dürfen keinen Invertzucker enthalten.

2. DEFINITION

Der Saccharosegehalt von gezuckerter Kondensmilch: der nach dieser Methode bestimmte Saccharosegehalt.

3. PRINZIP DER METHODE

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Inversion nach Clerget: eine milde Säurebehandlung, die eine vollständige Hydrolyse bei Saccharose, jedoch fast keine bei Lactose oder anderen Zukkerarten hervorruft. Der Saccharosegehalt ergibt sich aus der Änderung des Drehungsvermögens der Lösung.

Ein klares Filtrat der Probe ohne Mutarotation durch Lactose wird durch Behandlung der Lösung mit Ammoniak, nachfolgender Neutralisation und Fällung mit nacheinander zugesetzter Zinkacetat- und Kaliumhexacyanoferrat(II)lösung hergestellt.

In einem Teil des Filtrats wird die Saccharose unter besonderen, diesem Milchfiltrat entsprechenden Bedingungen hydrolysiert.

Aus dem Drehungsvermögen des Filtrats vor und nach der Inversion wird der Saccharosegehalt mit Hilfe von entsprechenden Formeln berechnet.

4. REAGENZIEN

4.1. Zinkacetatlösung, 1 M: 21,9 g kristallisiertes Zinkacetat ($Zn(C_2H_3O_2)_2.2\,H_2O$ und 3 ml Eisessig auf 100 ml mit Wasser auffüllen.

4.2. Kaliumhexacyanoferrat(II)lösung, 0,25 M: 10,6 g kristallisiertes Kaliumhexacyanoferrat(II) $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3\,H_2O$ auf 100 ml mit Wasser auffüllen.

4.3. Salzsäurelösung, 6,35 ± 0,20 M (20 bis 22 %) oder 5,0 ± 0,2 M (16 bis 18 %)

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

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

4.6. Bromothymolblau-Indikator, 1%ige Lösung (m/v) in Äthanol

5. GERÄTE

5.1. Waage, Empfindlichkeit 10 mg

5.2. Polarimeter-Rohr, 2 dm, mit genau kalibrierter Länge

5.3. Polarimeter oder Saccharimeter:

a) Polarimeter mit Natriumlicht oder grünem Quecksilberlicht (Quecksilberdampflampe mit Prisma oder dem speziellen Wratten-Filter Nr. 77A), das mit einer Genauigkeit von mindestens 0,05 Winkelgraden abgelesen werden kann;

b) Saccharimeter mit internationaler Zuckerskala, unter Verwendung von weißem, durch ein 15 mm dickes Filter einer 6%igen Kaliumdichromatlösung geleiteten Licht oder Natriumlicht mit einer Ablesegenauigkeit von mindestens 0,1 Grad auf der internationalen Zuckerskala.

5.4. Wasserbad, eingestellt auf 60 ± 1 °C

6. DURCHFÜHRUNG

6.1. **Kontrollbestimmung**

Zur Überprüfung der Methode, der Reagenzien und der Geräte nach der nachstehenden Methode eine Doppelkontrollbestimmung durchführen, unter Verwendung eines Gemisches von 100 g Milch oder 110 g Magermilch und 18,00 g reiner Saccharose; diese Mischung entspricht 40,00 g kondensierter Milch mit einem Saccharosehalt von 45 %. Den Zuckergehalt anhand der Formel unter 7 berechnen, wobei in der Formel 1 für M, F und P die gewogene Milchmenge, der Fettgehalt und der Eiweißgehalt dieser Milch, und in der Formel 2 für M die Zahl 40,00 eingesetzt werden. Der Mittelwert der festgestellten Werte sollte nicht um mehr als 0,2 % von den tatsächlichen 45,0 % abweichen.

6.2. **Bestimmung**

6.2.1. Etwa 40 g der gut durchgemischten Probe mit einer Genauigkeit von 10 mg in ein 100 ml fassendes Becherglas einwiegen. 50 ml heißes Wasser (80 bis 90 °C) hinzufügen und gut mischen.

6.2.2. Die Mischung quantitativ in einen 200-ml-Meßkolben überführen und das Becherglas mehrmals mit kleinen Mengen destillierten Wassers von 60 °C bis zu einem Gesamtvolumen von 120 bis 150 ml nachspülen. Mischen und auf Zimmertemperatur abkühlen.

6.2.3. 5 ml der verdünnten Ammoniaklösung (4.4) hinzufügen. Erneut mischen und dann 15 Minuten stehen lassen.

6.2.4. Den Ammoniak durch Zugabe einer äquivalenten Menge verdünnter Essigsäurelösung (4.5) neutralisieren. Vorher die genaue Zahl von Milliliter durch Titration der Ammoniaklösung mit Bromthymolblau als Indikator (4.6) bestimmen. Mischen.

6.2.5. 12,5 ml Zinkacetatlösung (4.1) unter vorsichtigem Vermischen durch kreisende Bewegung des geneigten Kolbens hinzufügen.

6.2.6. In gleicher Weise wie bei der Acetatlösung 12,5 ml Kaliumhexacyanoferratlösung(II) (4.2) hinzufügen.

6.2.7. Den Inhalt des Kolbens auf 20 °C bringen und Wasser (von 20 °C) bis zur 200-ml-Marke hinzufügen.

Anmerkung:

Bis zu diesem Stadium sollten alle Zusätze von Wasser oder Reagenzien in einer solchen Weise erfolgen, daß die Bildung von Luftblasen vermieden wird, und mit dem gleichen Ziel sollte jedes Mischen durch kreisende Bewegung des Kolbens und nicht durch Schütteln erfolgen. Luftblasen, die vor der vollständigen Verdünnung auf 200 ml festgestellt werden, können durch vorübergehenden Anschluß des Kolbens an eine Vakuumpumpe und kreisende Bewegung des Kolbens beseitigt werden.

6.2.8. Den Kolben mit einem trockenen Stopfen verschließen und durch kräftiges Schütteln gründlich mischen.

6.2.9. Einige Minuten stehen lassen und dann durch ein trockenes Filterpapier filtrieren und die ersten 25 ml Filtrat verwerfen.

6.2.10. Direkte Polarisation: die optische Drehung des Filtrats bei ± 1 °C bestimmen.

6.2.11. Inversion: 40 ml des wie oben erhaltenen Filtrats in einen 50-ml-Meßkolben pipettieren. 6,0 ml 6,35 M oder 7,5 ml 5,0 M Salzsäure (4.3) hinzugeben.

Den Kolben für 15 Minuten in ein Wasserbad von 60 °C stellen, wobei der Kolben bis zum Hals eingetaucht wird. Durch kreisende Bewegung während der ersten 5 Minuten mischen; in

dieser Zeit sollte der Inhalt des Kolbens die Temperatur des Bades erreicht haben. Auf 20 °C abkühlen und bis zur 50-ml-Marke mit Wasser von 20 °C auffüllen. Mischen und bei dieser Temperatur 1 Stunde stehen lassen.

6.2.12. *Polarisation nach Inversion*

Die Drehung der invertierten Lösung bei 20 ± 0,2 °C bestimmen. (Wenn die Temperatur T der Flüssigkeit im Polarisationsrohr jedoch während der Messung um mehr als 0,2 ° von 20 °C abweicht, muß die unter Ziffer 7.2 angegebene Temperaturkorrektur angewandt werden.)

7. AUSWERTUNG

7.1. Berechnung

Berechnen des Saccharosegehalts mit folgenden Formeln:

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

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

S = Saccharosegehalt,

M = Masse der eingewogenen Probe in Gramm,

F = Fettgehalt in der Probe in %,

P = Eiweißgehalt (N × 6,38) in der Probe in %,

V = Volumen in ml, auf das die Probe vor dem Filtrieren verdünnt wurde,

v = Korrektur in ml für das Volumen des durch die Fällung gebildeten Niederschlags,

D = direkte Polarimeter-Ablesung (Polarisation vor der Inversion),

I = Polarimeter-Ablesung nach der Inversion,

L = Länge in dm des Polarimeterrohrs,

Q = Inversionsfaktor, dessen Werte unten angegeben werden.

Anmerkungen:

a) Wenn genau 40,00 g Kondensmilch eingewogen und ein Polarimeter mit Natriumlicht, Winkelgraden und einem Polarimeterrohr von 2 dm Länge bei 20 ± 0,1 °C verwendet werden, kann der Saccharosegehalt normaler Kondensmilch (C = 9) mit der folgenden Formel berechnet werden:

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

b) Wenn die Polarisation nach der Inversion bei einer von 20 °C abweichenden Temperatur (T) gemessen wird, müssen die Werte multipliziert werden mit:

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

7.2. Werte für den Inversionsfaktor Q

Die folgenden Formeln ergeben genaue Werte für Q bei verschiedenen Lichtquellen, mit Korrekturen für Konzentration und Temperatur:

Natriumlicht und Polarimeter mit Winkelgraden:
$Q = 0{,}8825 + 0{,}0006\,(C - 9) - 0{,}0033\,(T - 20)$;

grünes Quecksilberlicht und Polarimeter mit Winkelgraden:
$Q = 1{,}0392 + 0{,}0007\,(C - 9) - 0{,}0039\,(T - 20)$;

weißes Licht mit Dichromatfilter und Saccharimeter mit internationalen Zuckerskalagraden:
$Q = 2{,}549 + 0{,}0017\,(C - 9) - 0{,}0095\,(T - 20)$.

In den obigen Formeln sind:

C = Gesamtgehalt an Zucker in der invertierten Lösung entsprechend der polarimetrischen Messung in Prozent,

T = Temperatur der invertierten Lösung bei der polarimetrischen Messung.

Anmerkung 1:

Der Gehalt an Gesamtzucker in % (C) in der invertierten Lösung kann aus der direkten Ablesung und der Änderung nach der Inversion in der üblichen Weise unter Verwendung der normalen Werte für das spezifische Drehungsvermögen von Saccharose, Lactose und Invertzucker berechnet werden.

Die Korrektur 0,0006 (C – 9) usw. ist nur dann genau, wenn C etwa = 9 ist; bei normaler Kondensmilch kann auf diese Korrektur verzichtet werden, da C nahe bei 9 liegt.

Anmerkung 2:

Eine Temperaturabweichung von 1 °C gegenüber der Meßtemperatur von 20 °C macht bei der direkten Ablesung wenig aus, jedoch Abweichungen von mehr als 0,2 °C bei der Ablesung nach der Inversion erfordern eine Korrektur. Die Korrektur –0,0033 (T – 20) usw. ist nur zwischen 18 °C und 22 °C genau.

7.3. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander von demselben Untersucher mit der gleichen Probe und unter denselben Bedingungen durchgeführt worden sind, darf 0,3 g Saccharose/100 g Kondensmilch nicht überschreiten.

METHODE 6: BESTIMMUNG DES MILCHSÄURE- UND LACTATGEHALTS

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Nach dieser Methode wird bestimmt der Milchsäure- und Lactatgehalt von:

— Milchpulver mit hohem Fettgehalt,
— Milchpulver (Vollmilchpulver),
— teilentrahmtem Milchpulver,
— Magermilchpulver.

2. DEFINITION

Milchsäure- und Lactatgehalt von getrockneter Milch: der nach dieser Methode bestimmte Milchsäure- und Lactatgehalt, berechnet als Milchsäure.

3. PRINZIP DER METHODE

Fett, Protein und Lactose werden gleichzeitig durch Zusatz von Kupfersulfat und Calciumhydroxid und anschließende Filtration entfernt.

Die Milchsäure im Filtrat wird durch konzentrierte Schwefelsäure in Gegenwart von Kupfersulfat in Acetaldehyd umgewandelt.

Der entstandene Acetaldehyd wird kolorimetrisch unter Verwendung von 4-Hydroxydiphenyl bestimmt.

Der Milchsäure- und Lactatgehalt wird in mg Milchsäure pro 100 g fettfreier Trockenmasse ausgedrückt.

4. REAGENZIEN

4.1. Kupfer(II)sulfatlösung: 250 g Kupfer(II)sulfat ($CuSo_4.5\ H_2O$) in Wasser auflösen und auf 1 000 ml verdünnen.

4.2. Calciumhydroxid-Suspension:

4.2.1. 300 g Calciumhydroxid ($Ca(OH)_2$) in einem Mörser mit Wasser unter Verwendung von insgesamt 900 ml mahlen. Die Suspension ist vor Gebrauch frisch herzustellen.

4.2.2. Alternativ: 300 g Calciumhydroxid ($Ca(OH)_2$) in einem Mörser mit Wasser unter Verwendung von insgesamt 1 400 ml mahlen. Die Suspension ist vor Gebrauch frisch herzustellen.

4.3. Schwefelsäure-Kupfer(II)sulfatlösung: Zu 300 ml Schwefelsäure (95,5 bis 97,0 % (m/m) H_2SO_4) 0,5 ml der Kupfer(II)sulfatlösung (4.1) hinzufügen.

4.4. Lösung von 4-Hydroxydiphenyl ($C_6H_5C_6H_4OH$): Durch Schütteln und leichtes Erhitzen 0,75 g 4-Hydroxydiphenyl in 5 ml einer wäßrigen Lösung von Natriumhydroxid auflösen, die 5 g NaOH pro 100 ml enthält. Mit Wasser auf 50 ml in einem Meßkolben verdünnen. Die Lösung an einem dunklen und kühlen Ort in einer braunen Glasflasche aufbewahren. Nicht verwenden, falls Farbänderungen oder Trübungen auftreten. Die maximale Lagerfähigkeit beträgt 72 Stunden.

4.5. Milchsäure-Standardlösung: Kurz vor der Verwendung 0,1067 g Lithiumlactat ($CH_3CHOH-COOLi$) in Wasser auflösen und in einem Meßkolben auf 1 000 ml verdünnen. 1 ml dieser Lösung entspricht 0,1 mg Milchsäure.

4.6. Rekonstituierte Standardmilch: Mehrere Proben Trockenmilch von hoher Qualität werden im Vorwege analysiert. Zur Aufstellung der Eichkurve die Probe auswählen, die den geringsten Milchsäuregehalt hat und die nicht mehr als 30 mg Milchsäure pro 100 g fettfreier Trockenmasse enthält. Die Arbeitsschritte gemäß 6.2.1 und 6.2.2 einhalten.

5. GERÄTE

5.1. Analysenwaage

5.2. Spektralphotometer, geeignet für Ablesungen bei einer Wellenlänge von 570 nm.

5.3. Wasserbad bei 30 ± 2 °C

5.4. Mörser und Pistill

5.5. Filterpapier (Schleicher und Schüll 595, Whatman 1 oder äquivalent)

5.6. Reagenzgläser aus Pyrex oder äquivalent (Abmessungen 25 × 150 mm)

Anmerkung:

Alle Glasgefäße müssen vollkommen rein und nur für die Verwendung zu dieser Bestimmung vorgesehen sein. Glasgefäße, die Niederschläge enthalten, mit konzentrierter Salzsäure spülen und dann auswaschen.

6. DURCHFÜHRUNG

6.1. Blindversuch

Eine Blindprobe durchführen, indem 30 ml Wasser in einen 50-ml-Meßkolben gegeben werden und wie unter 6.2.4 bis einschließlich 6.2.11 beschrieben weiter verfahren wird. Wenn die Ergebnisse des Blindversuchs, gegen Wasser gemessen, das Äquivalent von 20 mg Milchsäure pro 100 g fettfreier Trockenmasse überschreiten, sollten die Reagenzien geprüft werden und die unreinen Reagenzien bzw. das unreine Reagenz ersetzt werden. Den Blindversuch gleichzeitig mit der Untersuchung der Probe durchführen.

6.2. Bestimmung

Anmerkung: Verunreinigungen insbesondere mit Speichel und Schweiß vermeiden.

6.2.1. Der Gehalt an fettfreier Trockenmasse (a) der Probe wird durch Abzug des Fettgehalts (erhalten nach Methode 4) und des Wassergehalts (erhalten nach Methode 2) von 100 errechnet.

6.2.2. $\frac{1\,000}{a - 10}$ g der Probe auf 0,1 g genau abwiegen. Zu dieser Probemenge 100 ml Wasser geben, gründlich mischen.

6.2.3. 5 ml der erhaltenen Lösung in einen 50-ml-Meßkolben pipettieren und mit Wasser auf etwa 30 ml verdünnen.

6.2.4. Unter Umschwenken langsam 5 ml der Kupfersulfatlösung (4.1) hinzufügen und 10 Minuten stehen lassen.

6.2.5. Unter Umschwenken langsam 5 ml der Calciumhydroxidsuspension 4.2.1 oder 10 ml der Calciumhydroxidsuspension 4.2.2 hinzufügen.

6.2.6. Auf 50 ml mit Wasser verdünnen, kräftig schütteln, 10 Minuten stehen lassen, dann filtrieren. Die ersten Filtratanteile verwerfen.

6.2.7. 1 ml des Filtrats in ein Reagenzglas (5.6) pipettieren.

6.2.8. Mit einer Bürette oder einer graduierten Pipette 6,0 ml der Schwefelsäure-Kupfersulfatlösung (4.3) in das Reagenzglas geben. Mischen.

6.2.9. Das Reagenzglas 5 Minuten lang in kochendem Wasserbad erhitzen. Unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur abkühlen.

6.2.10. 2 Tropfen 4-Hydroxydiphenyl-Reagenz (4.4) hinzufügen und kräftig schütteln, um das Reagenz gleichmäßig in der ganzen Flüssigkeit zu verteilen. Das Reagenzglas in das Wasserbad von 30 ± 2 °C bringen; es dort 15 Minuten belassen, von Zeit zu Zeit schütteln.

6.2.11. Das Reagenzglas 90 Sekunden in das kochende Wasserbad einsetzen. Unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur abkühlen.

6.2.12. Die optische Dichte gegen den Blindversuch (6.1) innerhalb von 3 Stunden bei der unter 5.2 angegebenen Wellenlänge messen.

6.2.13. Falls die optische Dichte diejenige des höchsten Punktes der Eichkurve überschreitet, die Untersuchung unter Verwendung einer geeigneten Verdünnung des unter 6.2.6 erhaltenen Filtrats wiederholen.

6.3. **Erstellung der Eichkurve**

6.3.1. 5 ml der rekonstituierten Milch (4.6) in fünf 50-ml-Meßkolben pipettieren. In diese Kolben 0, 1, 2, 3 bzw. 4 ml der Eichlösung (4.5) pipettieren, um so Eichlösungen zu erhalten, die 0, 20, 40, 60 und 80 mg zugesetzter Milchsäure pro 100 g fettfreier Trockenmasse des Milchpulvers entsprechen.

6.3.2. Mit Wasser auf etwa 30 ml verdünnen und wie unter 6.2.4 bis einschließlich 6.2.11 beschrieben behandeln.

6.3.3. Die optischen Dichten der Standards (6.3.1) gegen den Blindversuch (6.1) bei der unter 5.2 angegebenen Wellenlänge messen. In ein Diagramm die optischen Dichten gegen die Mengen an Milchsäure eintragen, die in 6.3.1 angegeben sind, also 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg und 80 mg pro 100 g fettfreier Trockenmasse. Eine diesen Punkten am besten entsprechende Gerade zeichnen und die Eichkurve anfertigen, indem diese Gerade parallel zu sich selbst verschoben wird, so daß sie durch den Nullpunkt der Koordinaten geht.

7. AUSWERTUNG

7.1. **Berechnung**

Die optische Dichte, die unter 6.2.12 oder 6.2.13 gemessen wurde, in mg Milchsäure pro 100 g fettfreie Trockenmasse in der Probe entsprechend der Eichkurve verwandeln. Dieses Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren, falls das Filtrat gemäß 6.2.13 verdünnt worden ist.

7.2. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander von demselben Untersucher mit der gleichen Probe und unter denselben Bedingungen durchgeführt worden sind, darf 8 mg Milchsäure pro 100 g fettfreie Trockenmasse für Gehalte bis 80 mg nicht überschreiten. Bei höheren Werten darf diese Differenz 10 %, bezogen auf den niedrigsten Wert, nicht überschreiten.

METHODE 7: BESTIMMUNG DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT (MODIFIZIERTES SANDERS- UND SAGAR-VERFAHREN)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode beschreibt die Bestimmung der Phosphataseaktivität in

— Milchpulver mit hohem Fettgehalt,
— Milchpulver (Vollmilchpulver),
— teilentrahmtem Milchpulver,
— Magermilchpulver.

2. DEFINITION

Die Phosphataseaktivität ist ein Maß für die vorhandene Menge an aktiver alkalischer Phosphatase. Sie wird in µg Phenol, die nach der hier beschriebenen Methode von 1 ml der rekonstituierten Milch freigesetzt werden, bestimmt.

3. PRINZIP

Die Phosphataseaktivität von Trockenmilch wird durch die Fähigkeit der Phosphatase, Phenol aus Dinatriumphenylphosphat freizusetzen, bestimmt. Die Menge an Phenol, die unter den beschriebenen Bedingungen freigesetzt wird, wird durch spektrophotometrische Messung der mit dem Gibb'schen Reagenz entwickelten Farbe bestimmt.

4. REAGENZIEN

4.1. **Lösung A**

Bariumborat-hydroxid-Puffer: pH 10,6 ± 0,1 bei 20 °C.

25,0 g Bariumhydroxid ($Ba(OH)_2.8\,H_2O$) werden in Wasser gelöst und auf 500 ml verdünnt.

11,0 g Borsäure (H_3BO_3) werden in Wasser gelöst und auf 500 ml verdünnt.

Beide Lösungen auf 50 °C erwärmen und mischen.

Die Mischung schütteln und auf Raumtemperatur abkühlen.

Den pH-Wert mit Bariumhydroxidlösung auf 10,6 ± 0,1 einstellen und filtrieren.

Die Lösung in einem dicht verschlossenen Behälter aufbewahren.

Den Puffer vor der Verwendung mit der gleichen Menge Wasser verdünnen.

4.2. **Lösung B**

Farbentwicklungspuffer

6,0 g Natriummetaborat ($NaBO_2$) (oder 12,5 g $NaBO_2.4\,H_2O$) und 20,0 g Natriumchlorid (NaCl) in Wasser auflösen und auf 1 000 ml verdünnen.

4.3. **Lösung C**

Substrat-Puffer-Lösung

4.3.1. 0,5 g Dinatriumphenylphosphat ($Na_2C_6H_5PO_4.2\,H_2O$) in 4,5 ml der Lösung B (4.2) auflösen. 2 Tropfen von Lösung E (4.5) hinzufügen und 30 Minuten stehen lassen. Farbstoff mit 2,5 ml Butanol (4.10) extrahieren. Falls notwendig, Farbstoffextraktion wiederholen. Nach der Abscheidung Butanol verwerfen. Die Lösung kann in einem Kühlschrank mehrere Tage aufbewahrt werden. Vor der Verwendung die Farbe nochmals entwickeln und extrahieren.

4.3.2. 1 ml dieser Lösung in einen 100-ml-Meßkolben überführen und mit der Lösung A bis zur Marke auffüllen. Die Pufferlösung unmittelbar vor der Verwendung vorbereiten.

4.4. **Lösung D**

Fällungsreagenz

3,0 g Zinksulfat ($ZnSO_4.7\,H_2O$) und 0,6 g Kupfersulfat ($CuSO_4.5\,H_2O$) in Wasser auflösen und auf 100 ml auffüllen.

4.5. **Lösung E**

Gibb's-Reagenz

0,040 g 2,6-Dibromchinon-1,4-Chlorimid ($O.C_6H_2Br_2.NCl$) in 10 ml 96 %igem Äthylalkohol auflösen. Die Lösung in einer Flasche aus dunklem Glas im Kühlschrank aufbewahren. Bei Entfärbung das Reagenz verwerfen.

4.6. Farbverdünnungspuffer

10 ml der Lösung B (4.2) des Farbentwicklungspuffers mit Wasser auf 100 ml verdünnen.

4.7. Kupfersulfatlösung

0,05 g Kupfersulfat (II) ($CuSO_4.5\,H_2O$) in Wasser lösen und auf 100 ml mit Wasser auffüllen.

4.8. Phenol-Standardlösung

0,200 ± 0,001 g reines Phenol in Wasser auflösen und auf 100 ml in einem Meßkolben auffüllen. Diese Lösung kann einige Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden. 10 ml dieser Lösung mit Wasser auf 100 ml verdünnen. Diese verdünnte Lösung enthält 200 µg Phenol in 1 ml und kann zur Herstellung weiterer Verdünnungen verwendet werden.

4.9. Abgekochtes, destilliertes Wasser

4.10. n-Butanol

5. GERÄTE

5.1. Analysenwaage

5.2. Wasserbad, thermostatisch eingestellt auf 37 °C ± 1 °C

5.3. Spekralphotometer, geeignet für Ablesungen bei einer Wellenlänge von 610 nm

5.4. Filterpapier (Schleicher und Schüll 597, Whatman 42 oder gleichwertiges Filterpapier)

5.5. Wasserbad, siedend

5.6. Aluminiumfolie

6. DURCHFÜHRUNG

Vorsichtsmaßregeln:

1. Direkte Einwirkung von Sonnenlicht vermeiden.
2. Alle Glasgeräte, Stopfen und Entnahmegeräte sollten vollständig sauber sein. Es wird empfohlen, diese Gegenstände mit Wasser zu spülen und zu kochen oder sie mit Dampf zu behandeln.
3. Die Verwendung von Kunststoffmaterial (z. B. Stopfen) vermeiden, sie können Phenol enthalten.
4. Speichel enthält Phosphatase; Kontamination durch Speichelspuren muß sorgfältig vermieden werden.

6.1. **Vorbereitung der Probe**

6.1.1. 10 g der Probe (auf 0,1 g genau gewogen) in 90 ml Wasser auflösen. Die Temperatur bei der Auflösung des Pulvers darf unter keinen Umständen 35 °C überschreiten.

6.2. **Bestimmung**

6.2.1. In 2 Reagenzgläser je 1 ml der rekonstituierten Milch eingeben, die entsprechend 6.1.1 vorbereitet wurde.

6.2.2. Eines der Reagenzgläser 2 Minuten in kochendem Wasser erhitzen. Das Reagenzglas und das Wasserbad (5.5) (z. B. ein Becherglas) mit Aluminiumfolie (5.6) abdecken, um sicherzustellen, daß das gesamte Reagenzglas erhitzt wird. In kaltem Wasser auf Raumtemperatur abkühlen. Dieses Reagenzglas wird für den Blindversuch verwendet. Von diesem Punkt an die beiden Reagenzgläser in gleicher Weise behandeln.

6.2.3. 10 ml Lösung C (4.3.2) hinzufügen. Mischen und das Reagenzglas in das Wasserbad von 37 °C (5.2) stellen.

6.2.4. 60 Minuten im Wasserbad inkubieren und von Zeit zu Zeit schütteln.

6.2.5. Die Reagenzgläser sofort in ein kochendes Wasserbad (5.5) stellen und 2 Minuten erhitzen; in kaltem Wasser auf Zimmertemperatur abkühlen.

6.2.6. 1 ml der Lösung D (4.4) hinzufügen, mischen und durch ein trockenes Filterpapier filtrieren; die ersten Filtrate verwerfen, bis eine klare Flüssigkeit erhalten wird.

6.2.7. 5 ml jedes der beiden Filtrate in Reagenzgläser eingeben, 5 ml Lösung B (4.2) und 0,1 ml Lösung E (4.5) hinzugeben. Mischen.

6.2.8. Zur Farbentwicklung 30 Minuten bei Zimmertemperatur geschützt vor Sonnenlicht stehen lassen.

6.2.9. Die optische Dichte der Probelösung gegen den Blindversuch bei der unter 5.3 angegebenen Wellenlänge messen.

6.2.10. Die Bestimmung wiederholen, falls die optische Dichte der Lösung über der der Standardprobe mit 20 µg Phenol liegt, die gemäß 7 erhalten wurde.

Wenn dieser Wert überschritten wird, ein entsprechendes Volumen rekonstituierter Milch (6.1.1) mit einem entsprechenden Volumen dieser Milch, die gemäß 6.2.2 sorgfältig abgekocht wurde, um die vorhandene Phosphatase zu inaktivieren, verdünnen.

7. ERSTELLUNG DER EICHKURVE

7.1. In vier 100-ml-Meßkolben je 1, 3, 5 und 10 ml der nach 4.8 verdünnten Standardlösung eingeben und bis zur Marke mit Wasser auffüllen; diese Verdünnungen enthalten 2, 6, 10 und 20 µg Phenol in 1 ml.

7.2. 1 ml Wasser oder 1 ml jeder Referenzlösung (7.1) in die Reagenzgläser pipettieren, um eine Reihe von Proben zu erhalten, die 0 (Nullwert) — 2 — 6 — 10 und 20 µg Phenol enthalten.

7.3. Nacheinander in jedes Reagenzglas 1 ml der Kupfersulfatlösung (4.7), 5 ml des Farbverdünnungspuffers (4.6), 3 ml Wasser und 0,1 ml Lösung E (4.5) hinzufügen. Mischen.

7.4. Die Reagenzgläser bei Zimmertemperatur vor Sonnenlicht geschützt 30 Minuten stehen lassen.

7.5. Die optische Dichte der Lösungen aus den Reagenzgläsern im Vergleich zum Nullwert bei der in 5.3 angegebenen Wellenlänge messen.

7.6. Die Eichkurve durch Aufzeichnen der optischen Dichtewerte gegen die Phenolmengen in µg wie bei 7.2 angegeben aufzeichnen.

8. AUSWERTUNG

8.1. **Berechnung**

8.1.1. Die nach 6.2.9 erhaltenen Werte unter Benutzung der Eichkurve in µg Phenol umrechnen.

8.1.2. Die Phosphataseaktivität, ausgedrückt als µg Phenol je ml rekonstituierter Milch, wird nach folgender Formel berechnet:

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

hierin ist P = die Phenolmenge in µg entsprechend 8.1.1.

8.1.3. Falls es nötig war, entsprechend der Angabe nach 6.2.10 zu verdünnen, das unter 8.1.2 erhaltene Resultat mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

8.2. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander von demselben Untersucher, mit derselben Probe und unter denselben Bedingungen durchgeführt worden sind, darf 2 µg freigesetztes Phenol je 1 ml rekonstituierter Milch nicht überschreiten.

METHODE 8: BESTIMMUNG DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT (ASCHAFFENBURG- UND MULLEN-VERFAHREN)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode beschreibt die Bestimmung der Phosphataseaktivität in

— Milchpulver mit hohem Fettgehalt,
— Milchpulver (Vollmilchpulver),
— teilentrahmtem Milchpulver,
— Magermilchpulver.

2. DEFINITION

Die Phosphataseaktivität von Trockenmilch ist ein Maß für die Menge an aktiver alkalischer Phosphatase im Produkt. Sie wird in µg p-Nitrophenol, die nach der hier beschriebenen Methode von 1 ml der rekonstituierten Probe freigesetzt werden, bestimmt.

3. PRINZIP

Die rekonstituierte Probe wird mit einem Puffersubstrat bei pH 10,2 verdünnt und bei einer Temperatur von 37 °C 2 Stunden bebrütet. Die in der Probe vorhandene alkalische Phosphatase setzt unter diesen Bedingungen p-Nitrophenol aus Dinatrium (p-Nitrophenyl)-phosphat frei.

Das freigesetzte p-Nitrophenol wird durch direkten Vergleich mit Standardfarbgläsern in einem einfachen Komparator unter Verwendung von reflektiertem Licht bestimmt.

4. REAGENZIEN

4.1. Natriumcarbonat-Hydrogencarbonat-Puffer

3,5 g wasserfreies Natriumcarbonat und 1,5 g Natrium-Hydrogencarbonat in Wasser auflösen und in einem Meßkolben auf 1000 ml verdünnen.

4.2. Puffersubstrat

1,5 g Dinatrium p-Nitrophenyl-Phosphat im Natriumcarbonat-Hydrogencarbonat-Puffer (4.1) auflösen und in einem Meßkolben mit dem Puffer (4.1) auf 1000 ml auffüllen.

Diese Lösung ist einen Monat stabil, wenn sie in einem Kühlschrank ($\leqslant 4\ ^{\circ}C$) gelagert wird, jedoch sollte eine Farbprüfung an solchen gelagerten Lösungen durchgeführt werden; siehe 6, Anmerkung 3.

4.3. Fällungsreagenzien

4.3.1. Zinksulfatlösung

30,0 g Zinksulfat in Wasser auflösen und in einem Meßkolben auf 100 ml verdünnen.

4.3.2. Kalium-Hexacyanoferrat(II)lösung

17,2 g Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Trihydrat in Wasser auflösen und in einem Meßkolben auf 100 ml verdünnen.

5. GERÄTE

5.1. Analysenwaage

5.2. Wasserbad, thermostatisch auf $37 \pm 1\ ^{\circ}C$ eingestellt

5.3. Komparator mit einer besonderen, auf µg p-Nitrophenol je ml Milch geeichte, Standardfarbgläser aufweisende Scheibe und 2 Küvetten von 25 mm

6. DURCHFÜHRUNG

Vorsichtsmaßnahmen:

1. Nach der Verwendung müssen die Reagenzgläser geleert, mit Wasser gespült, in heißem Wasser mit einem alkalischen Waschmittel gewaschen und anschließend in reinem heißem Leitungswasser gespült werden. Schließlich müssen sie vor der Verwendung mit Wasser gespült und getrocknet werden.

   Die Pipetten sind gründlich in sauberem kaltem Leitungswasser sofort nach der Verwendung zu spülen, anschließend muß vor der Verwendung mit Wasser gespült und getrocknet werden.

2. Die Stopfen der Reagenzgläser müssen sofort nach der Verwendung in heißem Leitungswasser gründlich gespült werden, anschließend sind sie 2 Minuten in Wasser abzukochen.

3. Die Puffersubstratlösung (4.2) sollte mindestens 1 Monat stabil bleiben, wenn sie in einem Kühlschrank bei $4\ ^{\circ}C$ oder darunter aufbewahrt wird. Etwaige Instabilitäten zeigen sich an der Bildung einer Gelbfärbung. Während die Probe immer gegen eine abgekochte Kontrollprobe abgelesen wird, die die gleiche Puffersubstratlösung enthält, wird empfohlen, daß die Lösung nicht verwendet werden sollte, wenn sich eine Farbablesung ergibt, die in einer 25-mm-Küvette des Komparators, bei dem in der anderen Küvette destilliertes Wasser verwendet wird, mehr als 10 µg beträgt.

4. Eine getrennte Pipette für jede Probe verwenden und Speichelkontamination der Pipette vermeiden.

5. Die Probe darf zu keiner Zeit direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.

6.1. **Vorbereitung der Probe**

10 g Pulver in 90 ml Wasser auflösen. Die Temperatur für die Lösung des Pulvers darf $35\ ^{\circ}C$ nicht überschreiten.

6.2. **Bestimmung**

6.2.1. 15 ml des Puffersubstrats in ein sauberes trockenes Reagenzglas pipettieren, anschließend 2 ml der zu testenden rekonstituierten Probe (6.1). Das Reagenzglas verschließen, durch Stürzen mischen und in das 37 °C-Wasserbad stellen.

6.2.2. Gleichzeitig ein Reagenzglas mit 15 ml Puffersubstrat und 2 ml der abgekochten rekonstituierten Probe in der gleichen Art wie die zu prüfende Probe in das Wasserbad stellen.

6.2.3. Nach 2 Stunden beide Reagenzgläser aus dem Wasserbad entfernen, 0,5 ml Zinksulfatlösung (4.3.1) hinzufügen, den Stopfen wieder aufsetzen, kräftig schütteln und 3 Minuten stehen lassen. 0,5 ml Kalium-Hexacyanoferrat(II)lösung (4.3.2) hinzugeben, gründlich mischen, filtern und das klare Filtrat in einem sauberen Reagenzglas auffangen.

6.2.4. Das Filtrat in eine 25-mm-Küvette einbringen und mit dem Filtrat der abgekochten Gegenprobe im Komparator unter Verwendung der Spezialscheibe (5.3) vergleichen.

7. AUSWERTUNG

7.1. **Berechnung**

Die direkte Ablesung nach 6.2.4 wird als µg p-Nitrophenol je ml der rekonstituierten Probe ausgedrückt.

7.2. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von Doppelbestimmungen, die gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander mit derselben Probe von demselben Untersucher und unter denselben Bedingungen durchgeführt worden sind, darf nicht mehr als 2 µg Nitrophenol je ml rekonstituierter Milch betragen.