31979L1067

ESIMENE KOMISJONI DIREKTIIV,

13. november 1979,

milles sätestatakse ühenduse analüüsimeetodid teatavate inimtoiduks ettenähtud, osaliselt või täielikult dehüdrateeritud, kauasäilivate piimatoodete kontrollimiseks

(79/1067/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 18. detsembri 1975. aasta direktiivi 76/118/EMÜ teatavate inimtoiduks ettenähtud, osaliselt või täielikult dehüdrateeritud, kauasäilivaid piimatooteid käsitlevate liikmesriikide õigusaktide ühtlustamise kohta, ([1]) eriti selle artiklit 11,

ning arvestades, et:

direktiivi 76/118/EMÜ artikli 11 kohaselt tuleb teatavate, osaliselt või täielikult dehüdrateeritud, kauasäilivate piimatoodete koostis kindlaks teha ühenduse analüüsimeetodite kohaselt;

on soovitav vastu võtta esmane rühm meetodeid, mille kohta on läbi viidud uurimused;

käesolevas direktiivis ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise toiduainekomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid võtavad kõik vajalikud meetmed tagamaks, et I lisas sätestatud kriteeriumide kontrollimiseks vajalikud analüüsid viiakse läbi kooskõlas II lisas kirjeldatud meetoditega.

Artikkel 2

Kui ühe analüüsi jaoks on kirjeldatud erinevad meetodid, võib proovi analüüsida ükskõik kumma meetodi järgi. II lisas viidatud analüüsiaruandes tuleb ära märkida, millist meetodit rakendati.

Artikkel 3

Liikmesriigid jõustavad kõik käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid 18 kuu jooksul direktiivi teatavakstegemisest. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 13. november 1979

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Étienne DAVIGNON

([1]) EÜT L 24, 30.1.1976, lk 49.

I LISA

ESIMESE TEATAVATE OSALISELT VÕI TÄIELIKULT DEHÜDRATEERITUD KAUASÄILIVATE PIIMATOODETE ÜHENDUSE ANALÜÜSIMEETODITE DIREKTIIVI REGULEERIMISALA

I. **Üldsätted**

II. **Kuivainesisalduse määramine:**

— magustamata kõrge rasvasisaldusega kondenspiimas (kasutades II lisa 1. meetodit),

— magustamata kondenspiimas (kasutades II lisa 1. meetodit),

— magustamata madala rasvasisaldusega kondenspiimas (kasutades II lisa 1. meetodit),

— magustamata kondenslõssis (kasutades II lisa 1. meetodit),

— magustatud kondenspiimas (kasutades II lisa 1. meetodit),

— magustatud madala rasvasisaldusega kondenspiimas (kasutades II lisa 1. meetodit),

— magustatud kondenslõssis (kasutades II lisa 1. meetodit).

III. **Niiskusesisalduse määramine:**

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 2. meetodit),

— piimapulbris (kasutades II lisa 2. meetodit),

— madala rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 2. meetodit),

— lõssipulbris (kasutades II lisa 2. meetodit).

IV. **Rasvasisalduse määramine:**

— magustamata kõrge rasvasisaldusega kondenspiimas (kasutades II lisa 3. meetodit),

— magustamata kondenspiimas (kasutades II lisa 3. meetodit),

— magustamata madala rasvasisaldusega kondenspiimas (kasutades II lisa 3. meetodit),

— magustamata kondenslõssis (kasutades II lisa 3. meetodit),

— magustatud kondenspiimas (kasutades II lisa 3. meetodit),

— magustatud madala rasvasisaldusega kondenspiimas (kasutades II lisa 3. meetodit),

— magustatud kondenspiimas (kasutades II lisa 3. meetodit).

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 4. meetodit),

— piimapulbris (kasutades II lisa 4. meetodit),

— madala rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 4. meetodit),

— lõssipulbris (kasutades II lisa 4. meetodit).

V. **Sahharoosisisalduse määramine:**

— magustatud kondenspiimas (kasutades II lisa 5. meetodit),

— magustatud madala rasvasisaldusega kondenspiimas (kasutades II lisa 5. meetodit),

— magustatud kondenslõssis (kasutades II lisa 5. meetodi).

VI. **Piimhappe ja laktaatide sisalduse määramine:**

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 6. meetodit),

— piimapulbris (kasutades II lisa 6. meetodit),

— madala rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 6. meetodit),

— lõssipulbris (kasutades II lisa 6. meetodit).

VII. **Fosfataasi aktiivsuse määramine:**

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 7. või 8. meetodit),

— piimapulbris (kasutades II lisa 7. või 8. meetodit),

— madala rasvasisaldusega piimapulbris (kasutades II lisa 7. või 8. meetodit),

— lõssipulbris (kasutades II lisa 7. või 8. meetodit).

II LISA

TEATAVATE INIMTOIDUKS ETTENÄHTUD OSALISELT VÕI TÄIELIKULT DEHÜDRATEERITUD KAUASÄILIVATE PIIMATOODETE KOOSTISE ANALÜÜSI MEETODID

ÜLDSÄTTED

1. PROOVI ETTEVALMISTAMINE KEEMILISEKS ANALÜÜSIKS

1.1. **Magustamata kõrge rasvasisaldusega kondenspiim**

Magustamata kondenspiim

Magustamata madala rasvasisaldusega kondenspiim

Magustamata kondenslõss

Suletud (plekk)purki loksutatakse ja pööratakse ümber. Purk avatakse ja piim valatakse aeglaselt teise, hermeetiliselt suletavasse nõusse, piima korduva ümbervalamisega läbi segades. Jälgitakse, et kõik seinte ja põhja külge jäänud rasv ja piim proovi massi segatud saaks. Nõu suletakse. Kui selle sisu ei ole homogeenne, soojendatakse nõud vesivannil 40 °C juures ja loksutatakse tugevalt iga 15 minuti tagant. Kahe tunni järel võetakse nõu vesivannilt ära ja lastakse toatemperatuurini jahtuda. Kaas võetakse pealt ära ja sisu segatakse põhjalikult lusika või spaatliga läbi (kui rasv on eraldunud, ei tohiks proovi analüüsida). Hoitakse jahedas kohas.

1.2. **Magustatud kondenspiim**

Magustatud kondenslõss

Magustatud madala rasvasisaldusega kondenspiim

(Plekk)purgid: avamata purki soojendatakse vesivannil 30 kuni 40 °C juures umbes 30 minutit. Purk avatakse ja sisu segatakse põhja- ja pinnakihtide ülejäänud seguga segamiseks nii vertikaalsuunalisi kui ringliigutusi tehes põhjalikult lusika või spaatliga läbi. Jälgitakse, et kogu seinte ja põhja külge jäänud rasv ja piim saaksid proovi massi segatud. Kui võimalik, valatakse purgi sisu teise, õhukindla kaanega varustatud nõusse. Nõud hoitakse jahedas kohas.

Tuubid: tuubi ots lõigatakse ära ja sisu valatakse õhukindla kaanega varustatud nõusse. Seejärel lõigatakse tuub pikuti pooleks. Kõik siseseintele jäänud materjal kaabitakse välja ja segatakse hoolikalt ülejäänud massi hulka. Hoitakse jahedas kohas.

1.3. **Kõrge rasvasisaldusega piimapulber**

Piimapulber

Madala rasvasisaldusega piimapulber

Lõssipulber

Pulber viiakse kuiva puhtasse õhukindla kaanega varustatud nõusse, mille maht ületab pulbri mahtu kaks korda. Nõu suletakse koheselt ja pulber segatakse raputuste ja ümberpööramistega hoolikalt läbi. Proovi ettevalmistamise käigus tuleks vältida pulbri kokkupuudet atmosfääriõhuga, et miinimumini viia niiskuse absorptsioon õhust.

2. REAKTIIVID

2.1. **Vesi**

2.1.1. Kui tekstis mainitakse vee kasutamist lahustamisel, lahjendamisel või pesemisel, tuleb kasutada destilleeritud vett või vähemalt samasuguse puhtusega deioniseeritud vett.

2.1.2. Kui tekstis on põhjalikumalt täpsustamata mainitud “lahustamist”, “lahust” või “lahjendust”, peetakse silmas “vees lahustamist”, “vesilahust” ja “veega lahjendamist”.

2.2. **Kemikaalid**

Kõik kemikaalid peavad omama tunnustatavat analüütilise reaktiivi puhtusklassifikatsiooni, kui ei ole märgitud teisiti.

3. SEADMED

3.1. **Seadmete loetelu**

Seadmete loetelus on ainult need seadmed, millel on spetsiifiline otstarve ja seadmed, mis on seotud konkreetse kirjeldusega.

3.2. **Analüütilised kaalud**

"Analüütilised kaalud" tähendavad kaalusid, millega saab kaaluda vähemalt 0,1 mg täpsusega.

4. TULEMUSTE ESITAMINE

4.1. **Protsentuaalse sisalduse arvutamine**

Kui ei ole märgitud teisiti, arvutatakse tulemus massiprotsendina proovis, vastavalt laboratooriumi tulemustele.

4.2. **Kümnendkohtade arv**

Tulemus ei tohi sisaldada rohkem kümnendkohti, kui on analüüsimeetodi täpsust arvestades põhjendatud.

5. ANALÜÜSIARUANNE

Analüüsiaruandes märgitakse nii kasutatud analüüsimeetod kui saadud tulemus. Lisaks märgitakse analüüsimeetodi täpsustamata või lahtiseks jäetud üksikasjad, nagu ka tingimused, mis võisid saadud tulemusi mõjutada.

Aruandes esitatakse kogu proovi lõplikuks identifitseerimiseks vajalik info.

1. MEETOD: KUIVAINESISALDUSE MÄÄRAMINE

(kuivatuskapp 99°C)

1. REGULEERIMISALA

Käesolev meetod võimaldab määrata kuivainesisalduse:

— magustamata kõrge rasvasisaldusega kondenspiimas,

— magustamata kondenspiimas,

— magustamata madala rasvasisaldusega kondenspiimas,

— magustamata kondenslõssis,

— magustatud kondenspiimas,

— magustatud madala rasvasisaldusega kondenspiimas,

— magustatud kondenslõssis.

2. MÄÄRATLUS

Kuivainesisaldus kondenseeritud piimas: käesoleva meetodiga leitud kuivainesisaldus.

3. PÕHIMÕTE

Teadaolev proovikogus lahjendatakse veega, segatakse liivaga ja kuivatatakse 99 °C ± 1 °C. Jääkmass peale kuivamist on kuivainemass ja väljendatakse massiprotsentides proovi massist.

4. REAKTIIVID

Vesinikkloriidhappega töödeldud kvarts- või mereliiv (terasuurus 0,18 kuni 0,5 mm, st liiv, mis läbib 500mikronilise sõela ja ei läbi 180 mikronilist sõela). Liiv peaks vastama järgnevale kontrollkatsele:

Umbes 25 g liiva kuumutatakse 2 tundi kuivatuskapis (5.3) vastavalt punktides 6.1 kuni 6.3 kirjeldatule. Lisatakse 5 ml vett, kuumutatakse jälle 2 tundi kuivatuskapis, jahutatakse ja kaalutakse uuesti. Kahe saadud massi erinevus ei tohiks ületada 0,5 mg.

Vajadusel töödeldakse liiva kolm päeva 25 % vesinikkloriidhappega, aeg-ajalt segades. Seejärel pestakse liiva veega, kuni happeline reaktsioon kaob või pesuvesi kloriididevabaks jääb. Kuivatatakse 160 °C juures ja kontrollitakse eespool kirjeldatu kohaselt uuesti.

5. SEADMED

5.1. Analüütilised kaalud.

5.2. Metallnõud, eelistatavalt niklist, alumiiniumist või roostevabast terasest. Nõudel peavad olema kaaned, mis sulguvad tihedalt, kuid on kergesti ära võetavad. Sobivad mõõdud on: diameeter 60 kuni 80 mm ja sügavus umbes 25 mm.

5.3. Atmosfäärirõhul töötav kuivatuskapp, hea õhuvahetusega, reguleeritav temperatuurile 99 °C ± 1 °C. Temperatuur peaks olema ühtlane kogu kuivatuskapi ulatuses.

5.4. Eksikaator, mis on varustatud äsjaaktiveeritud silikageeli või samaväärse kuivatusaine ning veesisalduse indikaatoriga.

5.5. Klaaspulgad, mille üks ots on lamendatud, sellise pikkusega, et mahuvad üleni metallnõudesse (5.2).

5.6. Keev vesivann.

6. TÖÖ KÄIK

6.1. Umbes 25 g liiva (4) pannakse koos lühikese klaaspulgaga (5.5) nõusse (5.2).

6.2. Nõu asetatakse lahtiselt koos kaanega kuivatuskappi (5.3) ja kuumutatakse kaks tundi.

6.3. Nõu suletakse kaanega ja paigutatakse eksikaatorisse (5.4), lastakse jahtuda toatemperatuurini ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega (M_0).

6.4. Liiv kallutatakse nõu ühele servale. Tühja ossa viiakse umbes 1,5 g magustatud kondenspiima proovist ja 3,0 g magustamata kondenspiima. Kaas pannakse uuesti peale ja nõu kaalutakse 0,1 mg täpsusega (M_1).

6.5. Kaas võetakse pealt ära, lisatakse 5 ml vett ning segatakse klaaspulga abil kokku vedelikud ja seejärel liiv ja vedel osa. Klaaspulk jäetakse segusse.

6.6. Nõu asetatakse keevale vesivannile (5.6) senikauaks, kuni vesi on aurustunud; selleks kulub tavaliselt 20 minutit. Segu segatakse aegajalt klaaspulgaga, õhutades massi, et see kuivades ei paakuks. Klaaspulk jäetakse nõusse.

6.7. Nõu ja kaas pannakse eraldi pooleteiseks tunniks kuivatuskappi.

6.8. Nõu suletakse kaanega ja paigutatakse eksikaatorisse (5.4), lastakse jahtuda toatemperatuurini ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega.

6.9. Nõu asetatakse uuesti lahtiselt koos kaanega kuivatuskappi ja kuumutatakse veel tund aega.

6.10. Korratakse protseduuri 6.8.

6.11. Korratakse kirjeldatud protseduure 6.9 ja 6.10, kuni kahel järjestikusel kaalumisel saadud masside vahe on alla 0,5 mg või kuni mass tõusma hakkab. Kui mass tõuseb, kasutatakse arvutustes (7.1) väikseimat saadud massinäitu. Kaalumise lõpptulemus pannakse kirja massina (M_2) grammides.

7. TULEMUSTE ESITAMINE

7.1. **Arvutusmeetod**

Kuivainesisaldus väljendatuna massiprotsentides proovi massist, leitakse vastavalt valemile:

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

kus:

M_0 = nõu, kaane ja liiva mass grammides peale protseduuri 6.3;

M_1 = nõu, kaane, liiva ja proovi mass grammides enne protseduuri 6.4;

M_2 = nõu, kaane, liiva ja kuivatatud proovi mass grammides peale protseduuri 6.11.

7.2. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel või vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi erineda rohkem kui 0,2 grammi kuivainesisalduse võrra 100 grammi proovi kohta.

8. PIIMA ÜLDKUIVAINE JA RASVATA KUIVAINE SISALDUSE ARVUTAMINE.

8.1. Magustatud kondenspiima **üldkuivaine** sisaldus leitakse järgmiselt:

Üldkuivaine (leitud kasutades II lisa 1. meetodit) sahharoos (leitud kasutades II lisa 5. meetodit).

8.2. Magustatud kondenspiima **rasvata kuivaine** sisaldus leitakse järgmiselt:

Üldkuivaine (leitud kasutades II lisa 1. meetodit) – (sahharoosisisaldus (leitud kasutades II lisa 5. meetodit) ja rasvasisaldus (leitud kasutades II lisa 3. meetodit)).

8.3. Magustamata kondenspiima **rasvata kuivaine** sisaldus leitakse järgmiselt:

Üldkuivaine (leitud kasutades II lisa 1. meetodit) rasvasisaldus (leitud kasutades II lisa 3. meetodit).

2. MEETOD: NIISKUSESISALDUSE MÄÄRAMINE

(kuivatuskapp 102 °C)

1. REGULEERIMISALA

Käesolev meetod võimaldab määrata massikao kuivamisel:

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris,

— piimapulbris,

— madala rasvasisaldusega piimapulbris,

— lõssipulbris.

2. MÄÄRATLUS

Niiskusesisaldus: käesoleva meetodiga leitud massikadu kuivamisel.

3. PÕHIMÕTE

Määratakse uuritava koguse jääkmass peale kuivatamist atmosfäärirõhul konstantse massini temperatuuril 102 °C ± 1 °C. Massikadu väljendatakse protsentides proovi massist.

4. SEADMED

4.1. Analüütilised kaalud.

4.2. Nõud, eelistatavalt niklist, alumiiniumist, roostevabast terasest või klaasist. Nõudel peavad olema kaaned, mis sulguvad tihedalt, kuid on kergesti ära võetavad. Sobivad mõõdud on: diameeter 60 kuni 80 mm ja sügavus umbes 25 mm.

4.3. Atmosfäärirõhul töötav kuivatuskapp, hea õhuvahetusega, reguleeritava temperatuuriga (temperatuurile 102 °C ± 1 °C). Temperatuur peaks olema ühtlane kogu kuivatuskapi ulatuses.

4.4. Eksikaator, mis on varustatud äsjaaktiveeritud silikageeli või samaväärse kuivatusaine ning veesisalduse indikaatoriga.

5. TÖÖ KÄIK

5.1. Nõu (4.2) avatakse ja asetatakse lahtiselt koos kaanega kuivatuskappi (4.3) ja kuumutatakse umbes tund aega.

5.2. Nõu suletakse kaanega ja paigutatakse eksikaatorisse (4.4), lastakse jahtuda toatemperatuurini ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega (M_0).

5.3. Nõusse pannakse umbes 2 g piimapulbri proovist, nõu kaetakse kaanega ning suletud nõu kaalutakse võimalikult kiiresti 0,1 mg täpsusega (M_1).

5.4. Nõu avatakse ja asetatakse lahtiselt koos kaanega kuivatuskappi ja kuumutatakse umbes kaks tundi.

5.5. Nõu suletakse kaanega ja paigutatakse eksikaatorisse, lastakse jahtuda toatemperatuurini ja kaalutakse võimalikult kiiresti 0,1 mg täpsusega.

5.6. Nõu avatakse ja kuumutatakse lahtiselt koos kaanega kuivatuskapis umbes tund aega.

5.7. Korratakse protseduuri 5.5.

5.8. Korratakse protseduure 5.6 ja 5.5, kuni kahel järjestikusel kaalumisel saadud massi vähenemine ei ületa 0,5 mg või kuni mass tõusma hakkab. Kui mass tõuseb, kasutatakse arvutustes (6.1) väikseimat saadud massinäitu. Kaalumise lõpptulemus pannakse kirja massina M_2 grammides.

6. TULEMUSTE ESITAMINE

6.1. **Arvutusmeetod**

Massikadu kuivamisel, väljendatuna massiprotsentides proovi massist, leitakse vastavalt valemile:

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

kus:

M_0 = nõu ja kaane mass grammides peale protseduuri 5.2;

M_1 = nõu, kaane ja proovi mass grammides peale protseduuri 5.3;

M_2 = nõu, kaane ja lõpliku proovi mass grammides peale protseduuri 5.5.

6.2. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi erineda rohkem kui 0,1 grammi niiskusesisalduse võrra 100 grammi proovi kohta.

3. MEETOD: RASVASISALDUSE MÄÄRAMINE KONDENSPIIMADES (RÖSE-GOTTLIEBI MEETOD)

1. REGULEERIMISALA

Käesolev meetod võimaldab määrata rasvasisalduse:

— magustamata kõrge rasvasisaldusega kondenspiimas,

— magustamata kondenspiimas,

— magustamata madala rasvasisaldusega kondenspiimas,

— magustamata kondenslõssis,

— magustatud kondenspiimas,

— magustatud madala rasvasisaldusega kondenspiimas,

— magustatud kondenslõssis.

2. MÄÄRATLUS

Rasvasisaldus kondenspiimades: käesoleva meetodiga leitud rasvasisaldus.

3. PÕHIMÕTE

Rasvasisaldus määratakse rasva ekstraktsioonil proovi ammoniakaalsest alkoholilahusest dietüüleetri ja petrooleetriga, millele järgneb solventide aurustamine, jäägi kaalumine ja massiprotsendi proovi massist arvutamine Röse-Gottliebi põhimõtte kohaselt.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid vastama pimekatses (6.1) äratoodud nõuetele. Vajaduse korral võib reaktiive umbes 1 g piimarasva juuresolekul 100 ml solvendi kohta üle destilleerida.

4.1. Ligikaudu 25 % (massiprotsent) NH_3 sisaldusega ammoniaagilahus (tihedus 20 °C juures ligikaudu 0,91 g/ml), või suurema teadaoleva kontsentratsiooniga lahus.

4.2. Etanool, 96 ± 2 % (mahuprotsent), või selle puudumisel metanooliga denatureeritud etanool, etüülmetüülketoon või petrooleeter.

4.3. Dietüüleeter, peroksiidivaba.

Märkus 1:
Et kontrollida peroksiidide olemasolu, lisatakse 10 ml eetrile klaaskorgiga silindris, mida on eelnevalt eetriga loputatud, 1 ml värskelt valmistatud 10 % kaaliumjodiidi lahust. Silindrit loksutatakse ja lastakse minut seista. Kummaski kihis ei tohi kollast värvi näha olla.

Märkus 2:
Dietüüleetrit on võimalik hoida peroksiidivabana, lisades talle märga tsinkfooliumi, mis on üheks minutiks olnud üleni kastetud lahjendatud hapustatud vasksulfaadilahusesse ja seejärel veega üle pestud. Liitri kohta kasutatakse ligikaudu 8 000 mm^2 tsinkfooliumi, mis on lõigatud sellise pikkusega ribadeks et nad ulatuksid vähemalt mahuti poole kõrguseni.

4.4. Petrooleeter, keemistemperatuuri vahemikuga 30 kuni 60 °C.

4.5. Segasolvent, mis on valmistatud vahetult enne tarvitamist, segades kokku võrdsed kogused dietüüleetrit (4.3) ja petrooleetrit (4.4) (kui on märgitud segasolvendi kasutamine, võib selle asendada kas dietüüleetri või petrooleetriga).

5. SEADMED

5.1. Analüütilised kaalud.

5.2. Sobivad ekstraktsioonitorud või -kolvid, millel on klaaslihvkorgid või muud sulgurid, mis on kasutatavate solventide suhtes inertsed.

5.3. 150 kuni 250 ml mahuga õhukeseseinalised ja lamedapõhjalised kolvid.

5.4. Atmosfäärirõhul töötav kuivatuskapp, hea õhuvahetusega, reguleeritava temperatuuriga (reguleeritud temperatuurile 102 °C ± 1 °C).

5.5. Rasvata mittepoorsed mitterabedad keemistsentrid, näiteks klaashelmed või ränikarbiidi tükid (selle vahendi kasutamine on vabalt valitav; vt punkt 6.2.1).

5.6. Sifoon, ekstraktsioonitorude külge sobiv.

5.7. Tsentrifuug (vabalt valitav).

6. TÖÖ KÄIK

6.1. **Pimekatse**

Üheaegselt proovi rasvasisalduse määramisega viiakse läbi pimekatse 10 ml veega, kasutades sama tüüpi ekstraktsiooniseadet, samu reaktiive samades kogustes, ja sama allpool kirjeldatud protseduuri, v.a punkt 6.2.2. Kui pimekatsel leitud rasvasisaldus ületab 0,5 mg, tuleb reaktiive kontrollida ja saastunud reaktiiv või reaktiivid puhastada või asendada.

6.2. **Määramine**

6.2.1. Kolbi (5.3) (vajadusel koos keemistsentritega (5.5), et keemine järgneva solventide eemaldamise käigus toimuks rahulikult) kuivatatakse kuivatuskapis (5.4) pool tundi kuni tund aega. Kolvil lastakse jahtuda kaaluruumi temperatuurini ja kaalutakse jahtunud kolb 0,1 mg täpsusega.

6.2.2. Ettevalmistatud proovi segatakse ja kaalutakse koheselt, 1 mg täpsusega, 2 kuni 2,5 g magustatud või 4 kuni 5 g magustamata proovi kas otse ekstraktsiooniseadmes (5.2) või kaalude vahena sellesse. Lisatakse vett ruumalani 10,5 ml, ja loksutatakse ettevaatlikult, kergelt soojendades (40 kuni 50 °C juures), kuni saadus on täielikult dispergeeritud. Saadus peab olema täielikult dispergeeritud, vastasel juhul tuleks määramist korrata.

6.2.3. Lisatakse 1,5 ml 25 % ammoniaagilahust (4.1) või sellele vastav kogus kontsentreeritumat lahust ja segatakse hoolikalt läbi.

6.2.4. Lisatakse 10 ml etanooli (4.2) ja segatakse vedelikud ettevaatlikult, kuid põhjalikult, avatud seadmes läbi.

6.2.5. Lisatakse 25 ml dietüüleetrit (4.3). Jahutatakse voolava vee all. Seade suletakse, seda loksutatakse tugevalt ja pööratakse 1 minuti jooksul korduvalt ümber.

6.2.6. Kork eemaldatakse ettevaatlikult ja lisatakse 25 ml petrooleetrit (4.4), kasutades esimesi milliliitreid korgi ja seadme kaela sisepinna pesemiseks, lastes pesuvedelikul seadmesse voolata. Seade suletakse taas korgiga ning seda loksutatakse ja pööratakse 30 sekundi jooksul korduvalt ümber. Kui punktis 6.2.7 ei kasutata tsentrifuugimist, ei tohi loksutada liiga tugevalt.

6.2.7. Seadmel lastakse seista, kuni pealmine vedelikukiht on selginenud ja selgelt alumisest veekihist eraldunud. Teise võimalusena võib eraldamist läbi viia, kasutades sobivat tsentrifuugi (5.7).

Märkus:
Kui tsentrifuugi ajamiks ei ole kolmefaasiline mootor, võib esineda sädemeid ning tuleb hoolt kanda, et ei toimuks plahvatust või süttimist eetriaurude tõttu, mis võivad pärineda näiteks purunenud torust.

6.2.8. Kork eemaldatakse ning pestakse seda ja seadme kaela sisepinda segasolvendiga (4.5), lastes pesuvedelikul seadmesse voolata. Pealmisest vedelikukihist viiakse ettevaatlikult dekanteerimise või sifooni (5.6) abil nii palju kui võimalik ettevalmistatud kolbi (6.2.1).

Märkus:

Kui sifooni ei kasutata, võib vajalikuks osutuda mõningase koguse vee lisamine, et tõsta dekanteerimise hõlbustamiseks vedelike eralduspiiri.

6.2.9. Mõne milliliitri segasolvendiga (4.5) loputatakse, kas seadme kaela seest ja väljast, või sifooni otsa ja alumist osa. Seadme väliosadelt pärinev pesuvedelik lastakse voolata kolbi, kaela sisepinnalt ning sifoonilt pärinev pesuvedelik lastakse voolata ekstraktsiooniseadmesse.

6.2.10. Tehakse teine ekstraktsioon, korrates protseduuri 6.2.5 kuni 6.2.9 (k.a), kuid kasutades ainult 15 ml dietüüleetrit ja 15 ml petrooleetrit.

6.2.11. Tehakse kolmas ekstraktsioon, korrates protseduuri 6.2.10, kuid jättes ära viimase pesemise (6.2.9).

Märkus:

Kolmas ekstraktsioon ei ole nõutav, kui analüüsitakse magustamata kondenslõssi ja magustatud kondenslõssi proove.

6.2.12. Ettevaatlikult aurustatakse või destilleeritakse nii palju solventi (k.a etanool) pealt ära kui võimalik. Kui kolb on väikese mahuga, on peale iga ekstraktsiooni vaja osa solventi eespool kirjeldatud viisil eemaldada.

6.2.13. Kui ei ole enam märgatavat solvendilõhna, asetatakse kolb külili kuivatuskappi ja kuumutatakse tund aega.

6.2.14. Kolb võetakse kuivatuskapist välja, lastakse jahtuda kaaluruumi temperatuurini ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega.

6.2.15. Korratakse punkte 6.2.13 ja 6.2.14 kuumutamisperioodidega 30 kuni 60 minutit, kuni kahel järjestikusel kaalumisel saadud masside vahe on alla 0,5 mg või kuni mass tõusma hakkab. Kui mass tõuseb, kasutatakse arvutustes (7.1) väikseimat saadud massi. Kaalumise lõpptulemus pannakse kirja massina (M_1) grammides.

6.2.16. Lisatakse 15 kuni 25 ml petrooleetrit, veendumaks, et ekstraheeritud aine on täielikult lahustuv. Soojendatakse kergelt ja loksutatakse solventi ringi, kuni kogu rasv on lahustunud.

6.2.16.1. Kui ekstraheeritud aine on petrooleetris täielikult lahustuv, on rasva mass punktide 6.2.1 ja 6.2.15 kohaselt määratud kaalude vahe.

6.2.16.2. Kui leitakse lahustumatut ainet või kahtlustatakse selle olemasolu, ekstraheeritakse rasv kolvist korduvate sooja petrooleetriga pesemistega täielikult, lastes lahustumatu ainel enne iga dekanteerimist settida. Kaela välispinda pestakse kolm korda. Kolbi kuumutatakse, pannakse ta üheks tunniks külili kuivatuskappi, lastakse seejärel jahtuda kaaluruumi temperatuurini nagu varem (6.2.1) ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega. Rasva mass on punkti 6.2.15 kohaselt määratud ja nüüd määratud masside vahe.

7. TULEMUSTE ESITAMINE

7.1. **Arvutusmeetod**

Ekstraheeritud rasva mass grammides on:

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

ja rasvasisaldus väljendatuna massiprotsentides proovi massist on:

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

kus:

M_1 = rasvaga kolvi M mass grammides peale punkti 6.2.15;

M_2 = kolvi M mass grammides peale punkti 6.2.1, või lahustumatu aine esinemise või esinemiskahtluse korral peale punkti 6.2.16.2;

B_1 = pimekatses kolvi B mass grammides peale punkti 6.2.15;

B_2 = kolvi B mass grammides peale punkti 6.2.1, või lahustumatu aine esinemise või esinemiskahtluse korral peale punkti 6.2.16.2;

S = kasutatud proovi mass grammides.

7.2. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel või vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi erineda rohkem kui 0,05 grammi rasvasisalduse võrra 100 grammi proovi kohta.

4. MEETOD: RASVASISALDUSE MÄÄRAMINE PIIMAPULBRITES (RÖSE GOTTLIEBI MEETOD)

1. REGULEERIMISALA

Käesolev meetod võimaldab määrata rasvasisalduse:

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris,

— piimapulbris,

— madala rasvasisaldusega piimapulbris,

— lõssipulbris.

2. MÄÄRATLUS

Rasvasisaldus piimapulbrites: käesoleva meetodiga leitud rasvasisaldus.

3. PÕHIMÕTE

Rasvasisaldus määratakse rasva ekstraktsioonil proovi ammoniakaalsest alkoholilahusest dietüüleetri ja petrooleetriga, millele järgneb solventide aurustamine, jäägi kaalumine ja massiprotsendi arvutamine proovi massist Röse-Gottliebi põhimõtte kohaselt.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid vastama pimekatses (6.1) toodud nõuetele. Kui vaja, võib reaktiive umbes 1 g piimarasva juuresolekul 100 ml solvendi kohta üle destilleerida.

4.1. Ligikaudu 25 % (massiprotsent) NH_3 sisaldusega ammoniaagilahus (tihedus 20°C juures ligikaudu 0,91 g/ml), või suurema teadaoleva kontsentratsiooniga lahus.

4.2. Etanool, 96 ± 2 % (mahuprotsent) või selle puudumisel metanooliga denatureeritud etanool, etüülmetüülketoon või petrooleeter.

4.3. Peroksiidivaba dietüüleeter.

Märkus 1:
Et kontrollida peroksiidide olemasolu, lisatakse 10 ml eetrile klaaskorgiga silindris, mida on eelnevalt eetriga loputatud, 1 ml värskelt valmistatud 10 % kaaliumjodiidi lahust. Silindrit loksutatakse ja lastakse minut seista. Kummaski kihis ei tohi kollast värvi näha olla.

Märkus 2:
Dietüüleetrit on võimalik hoida peroksiidivabana, lisades talle märga tsinkfooliumi, mis on üheks minutiks olnud üleni kastetud lahjendatud hapustatud vasksulfaadilahusesse ja seejärel veega üle pestud. Liitri kohta kasutatakse ligikaudu 8 000 mm^2 tsinkfooliumi, mis on lõigatud sellise pikkusega ribadeks et nad ulatuksid vähemalt mahuti poole kõrguseni.

4.4. Petrooleeter, keemistemperatuuri vahemikuga 30 kuni 60 °C.

4.5. Segasolvent, mis on valmistatud vahetult enne tarvitamist, segades kokku võrdsed kogused dietüüleetrit (4.3) ja petrooleetrit (4.4) (kui on märgitud, et kasutatakse segasolventi, võib selle asendada kas dietüüleetri või petrooleetriga).

5. SEADMED

5.1. Analüütilised kaalud.

5.2. Sobivad ekstraktsioonitorud või -kolvid, millel on klaaslihvkorgid või muud kasutatavate solventide suhtes inertsed sulgurid.

5.3. 150 kuni 200 ml mahuga õhukeseseinalised ja lamedapõhjalised kolvid.

5.4. Atmosfäärirõhul töötav kuivatuskapp, hea õhuvahetusega, reguleeritava tempreatuuriga (reguleeritud temperatuurile 102 °C ± 1 °C).

5.5. Rasvata mittepoorsed mitterabedad keemistsentrid, näiteks klaashelmed või ränikarbiidi tükid (selle vahendi kasutamine on vabalt valitav: vt punkt 6.2.1)

5.6. Vesivann, temperatuuriga 60 kuni 70 °C.

5.7. Sifoon, ekstraktsioonitorude külge sobiv.

5.8. Tsentrifuug (vabalt valitav).

6. TÖÖ KÄIK

6.1. **Pimekatse**

Üheaegselt proovi rasvasisalduse määramisega viiakse läbi pimekatse 10 ml veega, kasutades sama tüüpi ekstraktsiooniseadet, samu reaktiive samades kogustes, ja sama allpool kirjeldatud protseduuri, v.a punkt 6.2.2. Kui pimekatsel leitud rasvasisaldus ületab 0,5 mg, tuleb reaktiive kontrollida ja saastunud reaktiiv või reaktiivid puhastada või asendada.

6.2. **Määramine**

6.2.1. Kolbi (5.3), vajadusel koos keemistsentritega (5.5), et keemine järgneva solventide eemaldamise käigus toimuks rahulikult, kuivatatakse kuivatuskapis (5.4) pool tundi kuni tund aega. Kolvil lastakse jahtuda kaaluruumi temperatuurini ja kaalutakse jahtunud kolb 0,1 mg täpsusega.

6.2.2. Umbes 1 g piimapulbrit või umbes 1,5 g madala rasvasisaldusega piimapulbrit või lõssipulbrit kaalutakse 1 mg täpsusega, kas otse ekstraktsiooniseadmes (5.2) või kaalude vahena sellesse. Lisatakse 10 ml vett ja loksutatakse ettevaatlikult kuni pulber on täielikult dispergeeritud (mõnel juhul on vaja kuumutada).

6.2.3. Lisatakse 1,5 ml 25 % ammoniaagilahust (4.1) või sellele vastav kogus kontsentreeritumat lahust ja kuumutatakse aeg-ajalt loksutades vesivannil (5.6) 15 minutit 60 kuni 70 °C juures. Jahutatakse, näiteks voolava vee all.

6.2.4. Lisatakse 10 ml etanooli (4.2) ja segatakse vedelikud ettevaatlikult, kuid põhjalikult, avatud seadmes läbi.

6.2.5. Lisatakse 25 ml dietüüleetrit (4.3). Jahutatakse voolava vee all. Seade suletakse, loksutatakse tugevalt ja pööratakse 1 minuti jooksul korduvalt ümber.

6.2.6. Kork eemaldatakse ettevaatlikult ja lisatakse 25 ml petrooleetrit (4.4), kasutades esimesi milliliitreid korgi ja seadme kaela sisemuse pesemiseks, lastes pesuvedelikul seadmesse voolata. Seade suletakse taas korgiga ning seda loksutatakse ja pööratakse 30 sekundi jooksul korduvalt ümber. Kui punktis 6.2.7 ei kasutata tsentrifuugimist, ei tohi loksutada liiga tugevalt.

6.2.7. Seadmel lastakse seista, kuni pealmine vedelikukiht on selginenud ja selgelt alumisest veekihist eraldunud. Teise võimalusena viiakse eraldamine läbi, kasutades sobivat tsentrifuugi (5.7).

Märkus:

Kui tsentrifuugi ajamiks ei ole kolmefaasiline mootor, võib esineda sädemeid ning tuleb hoolt kanda, et ei toimuks plahvatust või süttimist eetriaurude tõttu, mis võivad pärineda näiteks purunenud torust.

6.2.8. Kork eemaldatakse ning pestakse seda ja seadme kaela sisepinda segasolvendiga (4.5), lastes pesuvedelikul seadmesse voolata. Ettevaatlikult viiakse pealmisest vedelikukihist dekanteerimise või sifooni (5.7) abil nii palju kui võimalik ettevalmistatud kolbi (6.2.1).

Märkus:

Kui sifooni ei kasutata, võib vajalikuks osutuda mõningase koguse vee lisamine, et tõsta dekanteerimise hõlbustamiseks vedelike eralduspiiri.

6.2.9. Mõne milliliitri segasolvendiga (4.5) loputatakse kas seadme kaela seest ja väljast või sifooni otsa ja alumist osa. Seadme välispinnalt pärinev pesuvedelik lastakse voolata kolbi, kaela sisepinnalt ning sifoonilt pärinev pesuvedelik lastakse voolata ekstraktsiooniseadmesse.

6.2.10. Tehakse teine ekstraktsioon, korrates protseduuri 6.2.5 kuni 6.2.9 (k.a), kuid kasutades ainult 15 ml dietüüleetrit ja 15 ml petrooleetrit.

6.2.11. Tehakse kolmas ekstraktsioon, korrates protseduuri 6.2.10, kuid jättes ära viimase pesemise (6.2.9).

Märkus:
Kui analüüsitakse lõssipulbri proove, ei ole kolmas ekstraktsioon kohustuslik.

6.2.12. Ettevaatlikult aurustatakse või destilleeritakse nii palju solventi pealt ära (k.a. etanool) kui võimalik. Kui kolb on väikese mahuga, on vaja peale iga ekstraktsiooni osa solventi eelpoolkirjeldatud moel eemaldada.

6.2.13. Kui ei ole enam märgatavat solvendilõhna, asetatakse kolb külili kuivatuskappi ja kuumutatakse tund aega.

6.2.14. Kolb võetakse kuivatuskapist välja, lastakse jahtuda kaaluruumi temperatuurini nagu varem (6.2.1) ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega.

6.2.15. Korratakse punkte 6.2.13 ja 6.2.14 kuumutamisperioodidega 30 kuni 60 minutit, kuni kahel järjestikusel kaalumisel saadud masside vahe on alla 0,5 mg või kuni mass tõusma hakkab. Kui mass tõuseb, kasutatakse arvutustes (7.1) väikseimat saadud massinäitu. Kaalumise lõpptulemus pannakse kirja massina M_1 grammides.

6.2.16. Lisatakse 15 kuni 25 ml petrooleetrit veendumaks, et ekstraheeritud materjal on täielikult lahustuv. Soojendatakse kergelt ja loksutatakse solventi ringi, kuni kogu rasv on lahustunud.

6.2.16.1. Kui ekstraheeritud aine on petrooleetris täielikult lahustuv, on rasva mass punktide 6.2.1 ja 6.2.15 kohaselt määratud kaalude vahe.

6.2.16.2. Kui leitakse lahustumatut ainet või kahtlustatakse selle olemasolu, ekstraheeritakse rasv kolvist korduvate sooja petrooleetriga pesemistega täielikult, lastes lahustumatul ainel enne iga dekanteerimist settida. Kaela väliskülge pestakse kolm korda.

Kolbi kuumutatakse, pannakse üheks tunniks külili kuivatuskappi, lastakse seejärel jahtuda kaaluruumi temperatuurini nagu enne (6.2.1) ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega. Rasva mass on punkti 6.2.15 kohaselt määratud ja nüüd määratud masside vahe.

7. TULEMUSTE ESITAMINE

7.1. **Arvutusmeetod**

Ekstraheeritud rasva mass grammides on:

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

ja rasvasisaldus väljendatuna massiprotsentides proovi massist on:

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

kus:

M_1 = kolvi M mass grammides peale punkti 6.2.15;

M_2 = kolvi M mass grammides peale punkti 6.2.1, või lahustumatu aine esinemise või esinemiskahtluse korral peale punkti 6.2.16.2;

B_1 = pimekatsel kolvi B mass grammides peale punkti 6.2.15;

B_2 = kolvi B mass grammides peale punkti 6.2.1 või lahustumatu aine esinemise või esinemiskahtluse korral peale punkti 6.2.16.2;

S = kasutatud proovi mass grammides.

7.2. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel või vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi erineda rohkem kui 0,2 grammi rasvasisalduse võrra 100 grammi proovi kohta, v.a kooritud piimapulbri puhul, mille puhul erinevus ei tohi olla suurem kui 0,1 g rasva 100 grammi proovi kohta.

5. MEETOD: SAHHAROOSISISALDUSE MÄÄRAMINE KONDENSPIIMADES (POLARIMEETRILINE MEETOD)

1. REGULEERIMISALA

Käesolev meetod võimaldab määrata sahharoosisisalduse:

— magustatud kondenspiimas,

— magustatud madala rasvasisaldusega kondenspiimas,

— magustatud kondenslõssis.

Proovid ei tohi sisaldada invertsuhkrut.

2. MÄÄRATLUS

Sahharoosisisaldus magustatud kondenseeritud piimatoodetes: käesoleva meetodiga leitud sahharoosisisaldus.

3. PÕHIMÕTE

Meetod põhineb Clerget' inversiooni põhimõttel – proovi ettevaatlikul töötlemisel happega, mille tulemusel sahharoos hüdrolüüsub täielikult ning laktoos ja teised suhkrud peaaegu üldse mitte. Sahharoosisisaldus leitakse lahuse optilise aktiivsuse muutusest.

Valmistatakse proovi selge laktoosi mutarotatsioonita filtraat, töödeldes lahust ammoniaagiga, järgnevalt lahuse neutraliseerimise ning tsinkatsetaadi- ja kaaliumheksatsüanoferraat(II)lahuste järjestikuse lisamisega selitamisega.

Osas filtraadist hüdrolüüsitakse sahharoos kirjeldatud moel.

Sahharoosisisaldus arvutatakse vastavaid valemeid kasutades filtraadi optilisest aktiivsusest enne ja peale inversiooni.

4. REAKTIIVID

4.1. 1 M tsinkatsetaadi lahus: 21,9 g kristalset tsinkatsetaatdihüdraati $Zn(C_2H_3O_3)_2 \cdot 2H_2O$ lahustatakse 3 ml jäääädikhappes, lahus viiakse veega ruumalani 100 ml.

4.2. 0,25 M kaaliumheksatsüanoferraat(II)lahus: 10,6 g kristalset kaaliumheksatsüanoferraat(II)trihüdraati $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ lahustatakse vees ja lisatakse vett ruumalani 100 ml.

4.3. Vesinikkloriidhappe lahus, 6,35 ± 0,20 M (20–22 %) või 5,0 ± 0,2 M (16–18 %).

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

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

4.6. Broomtümoolsinise indikaatorlahus (0,01 g/cm³) etanoolis.

5. SEADMED

5.1. Kaalud, tundlikkusega 10 mg.

5.2. Polarimeetri küvett, 2 dm, täpselt kalibreeritud pikkusega.

5.3. Polarimeeter või sahharimeeter:

a) Naatriumilambi või rohelise elavhõbedalambi valgusega (elavhõbedaaurulamp prismaga või spetsiaalse *Wratten Screen No 77 A*-ga), polarimeeter, mida loetakse täpsusega vähemalt 0,05 nurgakraadi.

b) Rahvusvahelise suhkruskaalaga sahharimeeter, mis kasutab kas nähtavat valgust, mis läbib 15 mm 6 % kaaliumdikromaadilahusest filtri või naatriumlambi valgust, ning mida loetakse täpsusega vähemalt 0,1° rahvusvahelisel suhkruskaalal.

5.4. Vesivann, mis on reguleeritud temperatuurile 60 °C ± 1 °C.

6. TÖÖ KÄIK

6.1. **Kontrollkatse**

Töö käigu, reaktiivide ja aparatuuri standardiseerimiseks viiakse kahe paralleelkatsega läbi kontrollkatse, kus kasutatakse segu 100 g piimast ja 18 g puhtast sahharoosist või 110 g lõssist ja 18 g puhtast sahharoosist, mis mõlemad vastavad 40 grammile 45 % suhkrusisaldusega kondenspiimale. Arvutatakse suhkrusisaldus, kasutades punktis 7 toodud valemit ja asendades M, F ja P valemis 1 vastavalt võetud piimakogusega ja selle piima rasva- ja valgusisaldusega, ning valemis 2 M väärtusega 40,00. Leitud väärtuste keskmine ei tohi erineda väärtusest 45 % rohkem kui 0,2 % võrra.

6.2. **Määramine**

6.2.1. 100 ml keeduklaasi kaalutakse 10 mg täpsusega umbes 40 g hästisegatud proovi. Lisatakse 50 ml kuuma vett (80 kuni 90 °C) ja segatakse põhjalikult.

6.2.2. Segu viiakse kvantitatiivselt 200 ml mõõtkolbi ja loputatakse keeduklaasi järjestikuste koguste 60 °C juures oleva veega, kuni koguruumala on 120 kuni 150 ml. Segatakse ja lastakse jahtuda toatemperatuurini.

6.2.3. Lisatakse 5 ml lahjendatud ammoniaagilahust (4.4). Segatakse ja lastakse 15 minutit seista.

6.2.4. Ammoniaak neutraliseeritakse vastava koguse lahjendatud äädikhappelahuse (4.5) lisamisega. Täpne vajaminev kogus milliliitrites määratakse eelneva ammoniaagilahuse tiitrimisega, kasutades indikaatorina broomtümoolsinist (4.6). Segatakse.

6.2.5. Ettevaatlikult, kaldasendis kolbi ringjalt loksutades, lisatakse 12,5 ml tsinkatsetaadilahust (4.1).

6.2.6. Analoogselt tsinkatsetaadilahusega lisatakse 12,5 ml kaaliumheksatsüanoferraadilahust (4.2).

6.2.7. Kolvi sisu viiakse temperatuurile 20 °C ja täidetakse 200 ml kriipsuni 20 °C juures oleva veega.

Märkus:

Kõigis senikirjeldatud protseduurides pidanuks vee ja reaktiivide lisamised olema läbi viidud, vältides õhumullide teket, ja nende segamised läbi viidud kolvi ringjalt liigutamise, mitte raputamisega. Kui enne ruumala viimist 200 milliliitrini leitakse õhumulle, võib nende eemaldamiseks kolvi ajutiselt vaakumpumba külge ühendada ja kolbi ringi keerutada.

6.2.8. Kolb suletakse kuiva korgiga ja segatakse tugeva loksutamisega läbi.

6.2.9. Lastakse mõned minutid seista ja filtreeritakse läbi kuiva filterpaberi, jättes esimesed 25 ml filtraati kõrvale.

6.2.10. Algne polarisatsioon: määratakse filtraadi optiline aktiivsus temperatuuril 20 °C ± 1 °C.

6.2.11. Inversioon: 40 ml eelpool saadud filtraati pipeteeritakse 50 ml mõõtkolbi. Lisatakse 6,0 ml 6,35 M vesinikkloriidhapet või 7,5 ml 5,0 M vesinikkloriidhapet (4.3).

Kolb pannakse 15 minutiks 60 °C vesivannile, veendudes, et kogu kolvi kumer osa on allpool veepinda. Esimese viie minuti jooksul segatakse kolbi ringjate liigutustega, selle aja jooksul peaks kolvi sisu olema omandanud vanni temperatuuri. Jahutatakse temperatuurini 20 °C ja täidetakse kriipsuni 20 °C juures oleva veega. Segatakse ja lastakse sellel temperatuuril tund aega seista.

6.2.12. *Polarisatsioon peale inversiooni*

Määratakse temperatuuril 20 °C ± 1 °C inversiooni läbi teinud lahuse optiline aktiivsus. (Kui polarimeetri küvetis oleva vedeliku temperatuur T erineb mõõtmise ajal etteantust rohkem kui 0,2 °C võrra, tuleb rakendada punktis 7.2 osutatud temperatuuriparandust).

7. TULEMUSTE ESITAMINE

7.1. **Arvutusmeetod**

Sahharoosisisaldus arvutatakse järgmiste valemite abil:

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

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

kus:

S = sahharoosisisaldus;

M = proovi mass grammides;

F = proovi rasvasisaldus grammides;

P = proovi valgusisaldus (N×6,38);

V = ruumala, milleni proov enne filtreerimist lahjendatakse;

v = ruumalaparandus milliliitrites, arvestamaks selitamise käigus tekkinud sadet;

D = algne polarisatsioon (polarisatsioon enne inversiooni);

I = polarimeetri näit peale inversiooni;

L = polarimeetri küveti pikkus detsimeetrites;

Q = inversioonifaktor, mille väärtused on toodud allpool.

Märkus:

a) Kui kaalutakse täpselt 40,00 g kondenspiima ja kasutatakse naatriumlambi valgust, nurgakraade ja 2 dm polarimeetri küvetti temperatuuril 20 °C ± 1 °C, võib tavalise kondenspiima sahharoosisisalduse arvutada järgmisest valemist:

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

b) Kui inversiooni läbiteinud lahuse polarisatsiooni mõõdetakse mingil muul temperatuuril kui 20 °C, tuleks arvud läbi korrutada väärtusega:

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

7.2. **Inversioonifaktori Q väärtused**

Järgnevad valemid annavad täpsed Q väärtused mitmesuguste valgusallikate jaoks, koos kontsentratsiooni- ja temperatuuriparandustega:

Naatriumlambivalgus ja polarimeeter nurgakraadidega:

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

Roheline elavhõbedalambi valgus ja polarimeeter nurgakraadidega:

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

Valge valgus dikromaatfiltriga ja sahharimeeter rahvusvahelise suhkruskaala kraadidega:

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

Eeltoodud valemites:

C = lahuse üldsuhkru protsendiline sisaldus eripöörangu järgi pärast inversiooni;

T = lahuse temperatuur polarimeetri näidu lugemise ajal pärast inversiooni.

Märkus 1:

Üldsuhkru protsendilise sisalduse C lahuses pärast inversiooni võib arvutada otse näidust ja selle muutusest inversioonil, võttes arvesse sahharoosi, laktoosi ja invertsuhkru eripöörangu tavalisi väärtusi.

Parandus 0,0006 (C − 9) jne on õige ainult juhul, kui C on ligikaudu 9. Tavalise kondenspiima puhul, kus C on lähedane üheksale, võib selle paranduse jätta arvestamata.

Märkus 2:
Temperatuurikõikumine 1 °C võrra temperatuuril 20 °C muudab algse lahuse mõõtmisel tulemust vähe, kuid invertlahuse mõõtmisel muudab juba 0,2 °C suurune kõikumine vajalikuks temperatuuriparanduse rakendamise. Parandus – 0,0033 (T – 20) jne on täpne ainult vahemikus 18 kuni 22 °C.

7.3. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel või vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi erineda rohkem kui 0,3 grammi sahharoosi võrra 100 grammi kondenspiima kohta.

6. MEETOD: PIIMHAPPE- JA LAKTAATIDESISALDUSE MÄÄRAMINE

1. REGULEERIMISALA

Käesolev meetod võimaldab määrata piimhappe- ja laktaatidesisalduse väljendatuna piimhappesisaldusena:

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris,

— piimapulbris,

— madala rasvasisaldusega piimapulbris,

— lõssipulbris.

2. MÄÄRATLUS

Piimapulbrite piimhappe- ja laktaatidesisaldus: käesoleva meetodiga määratud piimhappe- ja laktaatidesisalduse väljendatuna piimhappesisaldusena.

3. PÕHIMÕTE

Proovi lahusest eraldatakse vasksulfaadi ja kaltsiumhüdroksiidi lisamise ja järgneva filtreerimisega üheaegselt nii rasv, valk kui laktoos.

Filtraadis olevad laktaadid ja piimhape viiakse kontsentreeritud väävelhappe abil vask(II)sulfaadi juuresolekul atseetaldehüüdiks.

Piimhappesisaldus määratakse kolorimeetriliselt, kasutades p-hüdroksüdifenüüli.

Piimhappe- ja laktaatidesisaldus väljendatakse piimhappesisaldusena milligrammides 100 g rasvata kuivaine kohta.

4. REAKTIIVID

4.1. Vask(II)sulfaadilahus: 250 g vask(II)sulfaati ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) lahustatakse vees ja lahuse ruumala viiakse veega 1 000 milliliitrini.

4.2. Kaltsiumhüdroksiidisuspensioon.

4.2.1. 300 g kaltsiumhüdroksiidi ($Ca(OH)_2$) peenestatakse uhmris koos veega, mida kasutatakse kokku 900 ml. Suspensioon tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

4.2.2. Kaltsiumhüdroksiidisuspensioon: 300 g kaltsiumhüdroksiidi ($Ca(OH)_2$) peenestatakse uhmris koos veega, mida kasutatakse kokku 1 400 ml. Suspensioon tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

4.3. Väävelhappe ja vask(II)sulfaadi lahus: 300 ml väävelhappele (95,9–97,0 % (massiprotsent) H_2SO_4) lisatakse 0,5 ml vask(II)sulfaadilahust (4.1).

4.4. p-hüdroksüdifenüüli ($C_6H_3C_6H_4OH$) lahus: 0,75 g p-hüdroksüdifenüüli lahustatakse loksutades ja kergelt soojendades 5 ml naatriumhüdroksiidi vesilahuses, mis sisaldab 100 ml kohta 5 g NaOH. Lahuse ruumala viiakse mõõtkolvis 50 milliliitrini. Lahust säilitatakse pruunis klaaspudelis pimedas ja jahedas kohas. Värvuse muutuse või hägususe esinemisel ei tohi lahust kasutada. Maksimaalne säilivusaeg 72 tundi.

4.5. Piimhappe standardlahus: vahetult enne kasutamist lahustatakse 0,1067 g liitiumlaktaati ($CH_3CHOHCOOLi$) vees ja viiakse lahuse ruumala mõõtkolvis 1 000 milliliitrini. 1 ml antud lahust vastab 0,1 mg piimhappele.

4.6. Standardne taastatud piim: analüüsitakse mitut kõrgekvaliteedilise piimapulbri proovi. Kalibratsioonikõvera saamiseks valitakse madalaima piimhappesisaldusega proov piimhappesisaldusega alla 30 mg 100 g rasvata piimakuivaine kohta. Järgitakse punktides 6.2.1 ja 6.2.2 kirjeldatud töö käiku.

5. SEADMED

5.1. Analüütilised kaalud.

5.2. Spektrofotomeeter, mis sobib mõõtmisteks lainepikkusel 570 nm.

5.3. Vesivann temperatuuriga 30 °C ± 2 °C.

5.4. Uhmer ja uhmrinui.

5.5. Filterpaber (Schleicher and Schull 595, Whatman 1 või samaväärne).

5.6. Katseklaasid, *Pyrex*'ist või samaväärsed (mõõtudega 25 × 150 mm).

Märkus:
Kõik klaasnõud peavad olema täiuslikult puhtad ja kasutatakse ainult käesolevas määramises. Sademejääke sisaldavaid klaasnõusid loputatakse enne pesemist kontsentreeritud vesinikkloriidhappega.

6. TÖÖ KÄIK

6.1. **Pimekatse**

Viiakse läbi pimekatse, viies 30 ml vett 50 ml mõõtsilindrisse ja töödeldes seda punktides 6.2.4 kuni 6.2.11 (k.a) kirjeldatu kohaselt. Kui pimekatsel vee suhtes mõõtmisel saadud tulemus ületab 20 mg piimhappega ekvivalentse koguse 100 g rasvata kuivaine kohta, tuleb reaktiive kontrollida ja saastunud reaktiiv või reaktiivid puhastada või asendada. Pimekatse viiakse läbi samaaegselt proovi analüüsiga.

6.2. **Määramine**

Märkus:

Vältida tuleb lisandite, eriti higi ja sülje sattumist proovi.

6.2.1. Määratakse proovi rasvavaba kuivainesisaldus (a), lahutades 100-st meetodi 4 abil leitud rasvasisalduse ja meetodi 2 abil leitud niiskusesisalduse.

6.2.2. Täpsusega 0,1 g kaalutakse välja proovikogus $\frac{1000}{(a - 10)}$ g. Proovikogus lisatakse 100 milliliitrile veele ja segatakse põhjalikult.

6.2.3. Saadud lahusest pipeteeritakse 5 ml 50 ml mõõtsilindrisse ja lahjendatakse veega ruumalani umbes 30 ml.

6.2.4. Pidevalt loksutades lisatakse aeglaselt 5 ml vask(II)sulfaadi lahust (4.1) ja lastakse seista 10 minutit.

6.2.5. Pidevalt loksutades lisatakse aeglaselt 5 ml kaltsiumhüdroksiidisuspensiooni (4.2.1) või 10 ml kaltsiumhüdroksiidisuspensiooni (4.2.2).

6.2.6. Lahuse ruumala viiakse veega 50 milliliitrini, loksutatakse tugevalt, lastakse 10 minutit seista ja filtreeritakse. Filtraadi esimene osa jäetakse kõrvale.

6.2.7. 1 ml filtraati pipeteeritakse katseklaasi (5.6).

6.2.8. Katseklaasi lisatakse büreti või gradueeritud pipeti abil 6,0 ml väävelhappe ja vask(II)sulfaadi lahust (4.3). Segatakse.

6.2.9. Kuumutatakse keeval veevannil 5 minutit. Jahutatakse voolava vee all toatemperatuurini.

6.2.10. Lisatakse 2 tilka p-hüdroksüdifenüülreaktiivi (4.4) ja loksutatakse tugevalt, et reaktiiv vedelikus ühtlaselt jaotuks. Katseklaas pannakse 15 minutiks temperatuuril 30 °C ± 2 °C olevale veevannile, aeg-ajalt katseklaasi loksutades.

6.2.11. Katseklaas pannakse 90 sekundiks keevale veevannile. Seejärel jahutatakse ta voolava vee all toatemperatuurini.

6.2.12. Kolme tunni jooksul mõõdetakse optiline tihedus pimekatse (6.1) suhtes punktis 5.2 märgitud lainepikkusel.

6.2.13. Kui optiline tihedus ületab kõrgeimat punkti kalibratsioonikõveral, korratakse katset sobiva lahjendusega punkti 6.2.6 kohaselt saadud filtraadist.

6.3. **Standardi ettevalmistamine**

6.3.1. Viide 50 ml mõõtsilindrisse pipeteeritakse 5 ml standardset taastatud piima (4.6). Silindritesse pipeteeritakse seejärel vastavalt 0, 1, 2, 3 ja 4 ml standardlahust (4.5) nii, et saadakse standardlahuste vahemik, mis vastab 0, 20, 40, 60 ja 80 mg lisatud piimhappele 100 g kuivpiima rasvata kuivaine kohta.

6.3.2. Lahused lahjendatakse veega ruumalani umbes 30 ml ja töödeldakse punktides 6.2.4 kuni 6.2.11 kirjeldatu kohaselt.

6.3.3. Standardite (6.3.1) optilised tihedused mõõdetakse pimekatse (6.1) suhtes punktis 5.2 märgitud lainepikkusel. Joonistatakse diagramm optiline tihedus *versus* punktis 6.3.1 antud lisatud piimhappe kogused, st. 0, 20, 40, 60 ja 80 mg 100 g kuivpiima rasvata kuivaine kohta. Punktidest tõmmatakse läbi nendega võimalikult hästi sobiv sirge ja joonistatakse kalibratsioonikõver, liigutades sirget paralleelselt iseendaga nii, et ta läbib algpunkti.

7. TULEMUSTE ESITAMINE

7.1. **Arvutusmeetod**

Punktis 6.2.12 või 6.2.13 leitud optiline tihedus viiakse standardkõvera abil üle piimhappekoguseks 100 g proovi rasvata kuivaine kohta. Kui filtraati lahjendati vastavalt punktile 6.2.13, korrutatakse saadud tulemus lahjendusteguriga.

7.2. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel või vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi piimhappesisaldusteni 80 mg erineda rohkem kui 8 milligrammi piimhappesisalduse võrra 100 grammi rasvata kuivaine kohta. Suuremate väärtuste puhul ei tohi erinevus ületada 10 protsenti väikseimast leitud väärtusest.

7. MEETOD: FOSFATAASI AKTIIVSUSE MÄÄRAMINE (SANDERSI JA SAGERI MODIFITSEERITUD MEETOD)

1. REGULEERIMISALA

Käesolev meetod võimaldab määrata fosfataasi aktiivsuse:

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris,

— piimapulbris,

— madala rasvasisaldusega piimapulbris,

— lõssipulbris.

2. MÄÄRATLUS

Fosfataasi aktiivsus kuivpiimatoodetes on aktiivse aluselise fosfataasi sisalduse mõõt. See väljendatakse mikrogrammides fenoolis, mis vabaneb allpool kirjeldatud protsessis kontsentraadist segatud piimaga.

3. PÕHIMÕTE

Pulbriliste piimatoodete fosfataasi aktiivsus määratakse fosfataasi võime järgi vabastada dinaatriumfenüülfosfaadist fenooli. Ettenähtud tingimustel vabaneva fenooli hulk määratakse Gibbsi reaktiivi mõjul tekkiva värvi spektrofotomeetrilisel mõõtmisel.

4. REAKTIIVID

4.1. **Lahus A**

Baariumboraathüdroksiidpuhver: temperatuuril 20 °C pH 10,6 ± 0,1.

25,0 g baariumhüdroksiidi ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) lahustatakse vees ja lahuse ruumala viiakse 500 milliliitrini.

11,0 g boorhapet (H_3BO_3) lahustatakse vees ja lahuse ruumala viiakse 500 milliliitrini.

Mõlemad lahused soojendatakse temperatuurini 50°C ja segatakse kokku.

Loksutatakse ja jahutatakse segu toatemperatuurini.

pH reguleeritakse baariumhüdroksiidiga väärtuseni 10,6 ± 0,1, filtreeritakse.

Lahust säilitatakse tihedalt suletud mahutis.

Enne tarvitamist lahjendatakse puhvrit veega vahekorras 1 : 1.

4.2. **Lahus B:**

Värviilmutuspuhver.

Vees lahustatakse 6,0 g naatriummetaboraati ($NaBO_2$) (või 12,6 g tetrahüdraati $NaBO_2 \cdot 4H_2O$) ja 20,0 g naatriumkloriidi (NaCl) ja viiakse ruumala 1000 milliliitrini.

4.3. **Lahus C:**

Puhversubstraatlahus.

4.3.1. 0,5 g dinaatriumfenüülfosfaati ($Na_2C_6H_3PO_4 \cdot 2H_2O$) lahustatakse 4,5 ml lahuses B (4.2). Lisatakse 2 tilka lahust E (4.5) ja lastakse 30 minutit seista. Värv ekstraheeritakse 2,5 ml butanooliga (4.10). Vajaduse korral korratakse värviekstraktsiooni. Peale eraldamist jäetakse butanool kõrvale. Lahust võib säilitada külmikus mitu päeva. Värvi ilmutamist ja ekstraheerimist korratakse veelkord enne kasutamist.

4.3.2. 1 ml sellest lahusest pipeteeritakse 100 ml mõõtkolbi ja kolb täidetakse lahusega A kriipsuni. Puhverlahus valmistatakse vahetult enne kasutamist.

4.4. **Lahus D:**

Sadesti.

3,0 g tsinksulfaati ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ja 0,6 g vask(II)sulfaati ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) lahustatakse vees ning lahuse ruumala viiakse veega 100 milliliitrini.

4.5. **Lahus E:**

Gibbsi reaktiiv

10 ml 96 % etanoolis lahustatakse 0,040 g 2,6-dibromokinoon-1,4-kloroimiidi ($O \cdot C_6H_2Br_2 \cdot NCl$). Lahust säilitatakse külmikus tumedas klaaspudelis. Värvuse muutuse esinemisel jäetakse reaktiiv kõrvale.

4.6. Värvilahjenduspuhver

10 ml lahust B (4.2) – värviilmutuspuhvrit – lahjendatakse veega ruumalani 100 ml.

4.7. Vasksulfaadi lahus

Vees lahustatakse 0,05 g vask(II)sulfaati ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ja viiakse ruumala veega 100 milliliitrini.

4.8. Fenooli standardlahus

Vees lahustatakse 0,200 ± 0,001 g puhast fenooli ja viiakse ruumala mõõtkolvis veega 100 milliliitrini. Lahust võib külmikus säilitada mitu kuud. 10 ml sellest lahusest lahjendatakse veega 100 milliliitrini. Lahjendatud lahus sisaldab 1 ml kohta 200 μg fenooli ja seda võib kasutada lahjemate lahuste valmistamisel.

4.9. Keedetud destilleeritud vesi.

4.10. n-Butanool.

5. SEADMED

5.1. Analüütilised kaalud.

5.2. Vesivann, mis on reguleeritud temperatuurile 37 °C ± 1 °C.

5.3. Spektrofotomeeter, mis sobib mõõtmisteks lainepikkusel 610 nm.

5.4. Filterpaber (Schleicher and Schull 597, Whatman 42 või samaväärne).

5.5. Vesivann, mis on reguleeritud temperatuurile 100 °C.

5.6. Alumiiniumfoolium.

6. TÖÖ KÄIK

Ettevaatusabinõud:

1. Vältida tuleb otsest päikesevalgust.
2. Kõik klaasnõud, korgid ja ainete eemaldamisvahendid peavad olema täiuslikult puhtad. Soovitav on neid veega loputada ja keeta või auruga töödelda.
3. Vältida tuleb plastikmaterjale (näiteks korgid), kuna nad võivad sisaldada fenoole.
4. Sülg sisaldab fosfataasi, seetõttu tuleb hoolikalt hoiduda saastamisest süljega.

6.1. **Proovi ettevalmistamine**

6.1.1. 10 g proovi kaalutakse 0,1 g täpsusega ja lahustatakse 90 ml vees. Pulbri lahustamisel ei tohi temperatuur mingil juhul ületada 35 °C.

6.2. **Määramine**

6.2.1. Mõlemasse katseklaasi viiakse 1 ml kontsentraadist lahjendatud piima, mis on valmistatud punktis 6.1.1 kirjeldatu kohaselt.

6.2.2. Üht katseklaasi kuumutatakse keeval vesivannil 2 minutit. Katseklaas ja vesivann (5.5) või näiteks keeduklaas kaetakse alumiiniumfooliumiga, et tagada katseklaasi kuumutamine kogu katseklaasi ulatuses. Seejärel jahutatakse katseklaas külmas vees toatemperatuurini. Katseklaas on kasutamiseks pimekatsena. Kõigis järgnevates operatsioonides käsitletakse mõlemat katseklaasi ühtemoodi.

6.2.3. Lisatakse 10 ml lahust C (4.3.2). Segatakse ja pannakse katseklaas temperatuuri 37 °C ± 1 °C juures olevale vesivannile (5.2).

6.2.4. Lastakse perioodiliselt segades vesivannil 60 minutit inkubeeruda.

6.2.5. Katseklaasid viiakse koheselt üle keevale vesivannile (5.5) ja kuumutatakse kaks minutit; seejärel jahutatakse nad külmas vees toatemperatuurini.

6.2.6. Lisatakse 1 ml lahust D (4.4), segatakse ja filtreeritakse läbi kuiva filterpaberi, jättes kõrvale esimese läbijooksu kuni selge filtraadi saamiseni.

6.2.7. Kummastki filtraadist pannakse 5 ml katseklaasidesse, lisatakse 5 ml lahust B (4.2) ja 0,1 ml lahust E (4.5) ja segatakse.

6.2.8. Värvusel lastakse tekkida 30 minutit toatemperatuuril, vältides otsest päikesevalgust.

6.2.9. Mõõdetakse punktis 5.3 toodud lainepikkusel proovilahuse optiline tihedus pimekatse suhtes.

6.2.10. Määramist korratakse, kui lahuse optiline tihedus ületab punkti 7 kohaselt valmistatud 20 µg fenooliga standardlahuse oma.

Nimetatud piiri ületamisel lahjendatakse sobiv kogus punkti 6.1.1 kohaselt kontsentraadist lahjendatud piima sobiva koguse punkti 6.2.2 kohaselt olemasoleva fosfataasi inaktiveerimiseks hoolikalt läbikeedetud piimaga.

7. STANDARDKÕVERA SAAMINE

7.1. Nelja 100 ml mõõtkolbi pipeteeritakse 1, 3, 5 ja 10 ml punkti 4.8 kohaselt lahjendatud standardlahust ja täidetakse kolvid veega kriipsuni; lahjendused sisaldavad vastavalt 2, 6, 10 ja 20 µg fenooli ühes milliliitris.

7.2. Katseklaasidesse pipeteeritakse kas 1 ml vett või 1 ml igast standardlahusest (7.1) saamaks prooviseeriat fenoolisisaldustega 0 (1 ml veega pimekatsel saadud väärtus), 2, 6, 10 ja 20 µg fenooli.

7.3. Igasse katseklaasi pipeteeritakse üksteise järel 1 ml vask(II)sulfaadilahust (4.7), 5 ml värvilahjenduspuhverlahust (4.6), 3 ml vett ja 0,1 ml lahust E (4.5). Segatakse.

7.4. Katseklaasid jäetakse 30 minutiks toatemperatuurile seisma, vältides otsesest päikesevalgust.

7.5. Iga katseklaasis oleva lahusega mõõdetakse punktis 5.3 osutatud lainepikkusel neeldumine pimekatsel saadud väärtuse suhtes.

7.6. Joonistatakse standardkõver neelduvus *versus* fenoolisisaldus mikrogrammides vastavalt punktile 7.2.

8. TULEMUSTE ESITAMINE

8.1. **Arvutused**

8.1.1. Punkti 6.2.9 kohaselt saadud tulemused viiakse standardkõvera põhjal üle fenoolikogusteks mikrogammides.

8.1.2. Arvutatakse fosfataasi aktiivsus väljendatuna fenoolikoguses mikrogrammides 1 ml kontsentraadist lahjendatud piima kohta, kasutades valemit:

fosfataasi aktiivsus = 2,4 × P,

kus P = fenoolikogus mikrogrammides vastavalt punktile 8.1.1.

8.1.3. Kui osutus vajalikuks lahjendamine vastavalt punktile 6.2.10, korrutatakse punkti 8.1.2 kohaselt saadud tulemus lahjendusteguriga.

8.2. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel või vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi ületada 2 µg vabanenud fenooli 1 ml kontsentraadist segatud piima kohta.

8. MEETOD: FOSFATAASI AKTIIVSUSE MÄÄRAMINE (ASCHAFFENBURGI JA MÜLLENI MEETOD)

1. **REGULEERIMISALA**

Käesolev meetod võimaldab määrata fosfataasi aktiivsuse:

— kõrge rasvasisaldusega piimapulbris,

— täispiimapulbris,

— osaliselt kooritud piima pulbris,

— kooritud piima pulbris.

2. MÄÄRATLUS

Fosfataasi aktiivsus pulbrilistes piimatoodetes on aktiivse aluselise fosfataasi sisalduse mõõt. See väljendatakse mikrogrammides p-nitrofenoolis, mis kirjeldatud tingimustel vabaneb kontsentraadist lahjendatud proovis.

3. PÕHIMÕTE

Kontsentraadist lahjendatud proovi lahjendatakse puhversubstraadiga pH-ga 10,2 ja inkubeeritakse 2 tundi temperatuuril 37 °C. Neil tingimustel vabastab kogu proovis olev aluseline fosfataas lisatavast p-nitrofenüülfosfaadist p-nitrofenooli. Vabanenud p-nitrofenooli kogus määratakse otsesel võrdlemisel standardvärviklaasidega lihtsas komparaatoris, kasutades peegeldunud valgust.

4. REAKTIIVID

4.1. Naatriumkarbonaat-vesinikkarbonaatpuhverlahus

3,5 g veevaba naatriumkarbonaati ja 1,5 g naatriumvesinikkarbonaati lahustatakse vees ja lahjendatakse mõõtkolvis veega 1000 milliliitrini.

4.2. Puhversubstraat.

1,5 g dinaatrium-p-nitrofenüülfosfaati lahustatakse naatriumkarbonaat-vesinikkarbonaatpuhvris (4.1) ja lahuse ruumala viiakse mõõtkolvis puhvriga (4.1) 1 000 milliliitrini. Kõnealune lahus säilib püsivana külmikus (4 °C) kuni üks kuu, kuid tuleb teha selliselt säilitatud lahuse värvustest (vt ettevaatusabinõud punkt 3).

4.3. Selituslahused

4.3.1. Tsinksulfaadilahus

30,0 g tsinksulfaati ($ZnSO_4$) lahustatakse vees ja lahuse ruumala viiakse mõõtkolvis veega 100 milliliitrini.

4.3.2. Kaaliumheksatsüanoferraat(II)lahus

17,2 g kaaliumheksatsüanoferraat(II)trihüdraati $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ lahustatakse vees ja lahuse ruumala viiakse mõõtkolvis veega 1 000 milliliitrini.

5. SEADMED

5.1. Analüütilised kaalud.

5.2. Vesivann, mis on reguleeritud temperatuurile 37 °C ± 1 °C.

5.3. Komparaator, spetsiaalse standardvärvi klaasidega kettaga, kalibreeritud mikrogrammide p-nitrofenooli järgi milliliitri piima kohta, kahe 25 mm mõõterakuga

6. TÖÖ KÄIK

Ettevaatusabinõud:

1. Peale kasutamist tuleb katseklaasid tühjendada, veega loputada, pesta kuuma leeliselist detergenti sisaldava veega ja seejärel puhta kuuma kraaniveega põhjalikult loputada. Seejärel tuleb nad veega loputada ja enne kasutamist kuivatada.

   Pipetid tuleb kohe peale kasutamist põhjalikult külma kraaniveega üle loputada, seejärel veega loputada ja enne kasutamist kuivatada.

2. Katseklaasi korgid tuleb kohe peale kasutamist põhjalikult kuuma kraaniveega üle loputada, seejärel 2 minutit vee sees keeta.

3. Puhversubstraatlahus peaks külmikus 4 °C või madalama temperatuuri juures säilima stabiilsena vähemalt 1 kuu. Vähemgi ebastabiilsus on märgatav kollase värvuse tekkest. Ehkki määramine viiakse läbi alati keedetud võrdlussaaduse suhtes, mis sisaldab sama puhversubstraatlahust, on soovitatav mitte kasutada lahust, mis annab komparaatoris 25 mm mõõterakus 25 mm destilleeritud veega mõõteraku suhtes mõõtmisel suurema tulemuse kui 10 µg.

4. Iga proovi jaoks tarvitatakse eraldi pipetti ja hoidutakse sülje sattumisest pipetti.

5. Katsematerjalid ei tohi kokku puutuda otsese päikesevalgusega.

6.1. **Proovi ettevalmistamine**

10 g pulbrit lahustatakse 90 ml vees. Pulbri lahustamisel kasutatav temperatuur ei tohi ületada 35 °C.

6.2. **Määramine**

6.2.1. 15 ml puhversubstraati (4.2) pipeteeritakse puhtasse kuiva katseklaasi, lisades 2 ml uuritavat kontsentraadist lahjendatud proovi (6.1). Katseklaas suletakse, segatakse kummulipööramistega läbi ja pannakse temperatuuril 37 °C olevale vesivannile (5.2).

6.2.2. Samaaegselt pannakse vesivannile kontrollkatseklaas, mis sisaldab 15 ml puhversubstraati ja 2 ml uuritavale proovile sarnast keedetud taastatud proovi.

6.2.3. 2 tunni pärast võetakse mõlemad katseklaasid vesivannilt, lisatakse 0,5 ml tsinksulfaatsadestajat (4.3.1), suletakse katseklaas, loksutatakse tugevalt ja lastakse 3 minutit seista. Lisatakse 0,5 ml kaaliumheksatsüanoferraat(II)lahust (4.3.2), segatakse põhjalikult ja filtreeritakse läbi volditud filterpaberi (5.4), kogudes selge filtraadi puhtasse katseklaasi.

6.2.4. Filtraat viiakse 25 mm mõõterakku ja võrreldakse pimekatset filtraadiga kasutades spetsiaalset ketast (5.3).

7. TULEMUSTE ESITAMINE

7.1. **Arvutused**

p-nitrofenoolisisalduseks mikrogrammides milliliitri proovi või milliliitri kontsentraadist segatud proovi kohta võetakse punktis 6.2.4 saadud otsene lugem.

7.2. **Korratavus**

Tulemuste erinevus kahel üheaegsel või vahetult üksteisele järgneval määramisel samast proovist, samadel tingimustel ja sama analüüsija poolt ei tohi ületada 2 µg vabanenud p-nitrofenooli 1 ml kontsentraadist segatud piima kohta.