

1048

AANBEVELING

**van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie
inzake de toepassing van Benelux-referentiemethoden van
onderzoek, behorende bij de aanbeveling M (65) 6 inzake de
harmonisatie der wetgevingen betreffende
geëvaporeerde en gecondenseerde melk**

M (68) 50

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,
Gelet op de artikelen 3, 6 en 7 van het Unieverdrag,

Gelet op artikel 9 van de Overgangsovereenkomst,

Gelet op de Aanbeveling van het Comité van Ministers van
25 oktober 1965 inzake de harmonisatie der wetgevingen betref-
fende geëvaporeerde en gecondenseerde melk, M (65) 6,

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

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

Beveelt aan :

Enig artikel

De Regeringen der drie Beneluxlanden worden uitgenodigd
bijgaande analysemethoden betreffende geëvaporeerde en gecon-
denseerde melk vóór 1 juli 1969 in hun wetgeving op te nemen
als enig geldige referentiemethoden.

Gedaan te Brussel, op 11 december 1968.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

P. GREGOIRE

1049

**Methoden van onderzoek
behorende bij het reglement M (65) 6 inzake
geëvaporeerde en gecondenseerde melk**

M (68) 50, Bijlage

1. Voorbereiding van de monsters

1.1. Geëvaporeerde melk.

Schud de bus krachtig en open deze aan de wand van het deksel; schenk de inhoud langzaam over in een bekeerglas. Meng de componenten door herhaald heen en weer schenken. Melk of vet, dat aan de verpakking blijft vastzitten, moet in het monster worden opgenomen. Verwarm nu het afgedekte monster in het bekeerglas tot een temperatuur van 40° C en meng al roerend grondig. Laat afkoelen.

1.2. Gecondenseerde melk met suiker.

Schud de bus krachtig en open deze aan de wand van het deksel; meng grondig. Melk of vet, dat aan het deksel blijft vastzitten, moet in het monster worden opgenomen. Verwarm tot een temperatuur van 40° C, onder afschrappen van de wand, terwijl met een lepel van onder naar boven goed wordt geroerd. Laat afkoelen.

Voor verpakkingen in tubes: open deze en breng de inhoud over in een bekeerglas. Knip de tube open en schraapt wat aan het materiaal is blijven kleven af. Breng ook dit in het bekeerglas en homogeniseer.

2. Droge stof

Reagens:

Zand: met zoutzuur gewassen en gedroogd zand.

2.1. Breng ongeveer 25 gram zand en een glazen staafje in een weegdoosje, gemaakt van een niet-oxydeerbaar metaal met een diameter van 7,5 cm en een hoogte van 2,5 cm, voorzien van een platte bodem en goed sluitend deksel.

2.2. Droog het schaalpje met de inhoud en open deksel gedurende twee uur bij 98-100° C. Laat met gesloten deksel in een exsiccator tot kamertemperatuur afkoelen en weeg.

2.3. Schuif het zand naar één zijde van het schaalpje. Weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig snel ongeveer 3 g resp. 1,5 g van de volgens 1.1. resp. 1.2. voorbereide waar af in de open ruimte. Voeg toe 3 ml resp. 5 ml gedestilleerd water bij de afgewogen waar en meng. Meng vervolgens het geheel met behulp van het glazen staafje. Plaats het schaalpje gedurende 20 minuten onder nu en dan roeren op een waterbad.

1050

2.4. Droog het schaalte met open deksel gedurende 1 ½ uur bij 98 - 100° C. Laat met gesloten deksel in een exsiccator tot kamertemperatuur afkoelen en weeg.

2.5. Droog nogmaals gedurende 1 uur, koel af en weeg. Herhaal dit zolang totdat het verschil in twee opeenvolgende wegingen niet meer dan 0,5 mg is.

2.6. Het gehalte aan droge stof in % =

$$\frac{100 \times \text{gewicht na drogen}}{\text{gewicht voor drogen}}$$

gewicht voor drogen

3. Vet

Reagentia :

- Ammonia, 25 gew. %
- Ethanol, 96 vol. %
- Diëthylether, peroxide vrij
- Petroleumether, kookpunt 40 - 60° C

Apparatuur :

Extractiebuisen volgens Mojonnier : zie tekening blz. 1063.

3.1. Breng tot op 1 mg nauwkeurig afgewogen, 4 - 5 g van de volgens 1. voorbereide waar in de extractiebuis. Voeg 7,0 ml water toe en wervel, terwijl in een waterbad tot 40 - 50° C verwarmd wordt, rond totdat de waar volledig gedispergeerd is.

3.2. Voeg 1,5 ml ammonia toe en schud goed.

3.3. Voeg 10 ml ethanol toe en schud rustig, maar grondig, om.

3.4. Voeg 25 ml diëthylether toe, sluit de buis en schud krachtig gedurende 1 minuut. Koel, indien nodig, in stromend water.

3.5. Verwijder de stop voorzichtig, voeg 25 ml petroleumether toe en gebruik de eerste milliliters om de stop en de hals van de extractiebuis af te spoelen. Sluit de extractiebuis en schud gedurende 30 seconden, niet te krachtig om.

3.6. Laat de extractiebuis met de stop naar boven staan totdat de bovenlaag helder is geworden en goed gescheiden van de waterlaag. De scheiding kan ook verkregen worden door centrifugeren in een daarvoor geschikte centrifuge (vonkvrij).

3.7. Verwijder de stop en spoel deze en de hals van de extractiebuis af met een mengsel van gelijke delen diëthylether en petroleumether af. Giet voorzichtig zoveel mogelijk van de bovenstaande vloeistof in een gedroogd en gewogen kolfje van 250 ml met platte bodems, waarin zich enige kooksteentjes bevinden.

3.8. Spoel de buitenkant en de binnenkant van de hals van de extractiebuis met een mengsel van gelijke delen diëthylether en petroleumether af. Vang de spoelvloeistof van de buitenkant op in het kolfje van 250 ml.

3.9. Herhaal de bewerkingen van 3.4. tot en met 3.8 tweemaal. Gebruik echter slechts 15 ml diëthylether en 15 ml petroleumether en voeg bij de eerste herhaling bovendien 5 ml ethanol toe

3.10 Damp voorzichtig het oplosmiddel in het kolfje zo goed mogelijk af.

3.11. Droog het kolfje met het residu gedurende 1 uur bij $102 \pm 2^\circ \text{C}$, waarbij het kolfje op zijn kant in de stoof moet liggen. Laat tot kamertemperatuur afkoelen en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig.

3.12. Herhaal deze bewerking, waarbij telkens 30 minuten wordt gedroogd, totdat het gewicht van het kolfje niet meer afneemt.

3.13. Het gewicht van het residu, berekend op 100 g van de waar, is het vetgehalte.

4. Melkzuur (alleen toepasbaar op ongesuikerde produkten)

Reagentia :

— Kopersulfaat-oplossing I : los 5 g kopersulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) op in gedestilleerd water en verdun tot 100 ml.

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

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

— Zwavelzuur, 95,5 - 97 %.

— Zwavelzuur-kopersulfaat-oplossing : voeg 0,5 ml kopersulfaat-oplossing I toe aan 60 ml zwavelzuur en meng.

— p-hydroxydifenyl-reagens : los 1,5 g p-hydroxydifenyl op in 10 ml 5 % NaOH-oplossing door verwarmen en roeren. Vul aan tot 100 ml met gedestilleerd water. Bewaar deze oplossing in een fles van bruin glas in het donker. Het reagens is niet langer dan 4 weken houdbaar.

— Standaard-melkzuur-oplossing : los onmiddellijk voor het gebruik 0,1067 g lithiumlactaat op in gedestilleerd water en verdun tot 1.000 ml. Deze oplossing bevat 0,1 mg melkzuur per ml.

870

4.1. Weeg ——— g van het monster af tot op 0,1 g nauwkeurig,
a — 8,7

(waarbij a = het gehalte aan vetvrije droge stof in het monster).
Los deze hoeveelheid op in 100 ml water.

4.2. Pipetteer van de aldus verkregen oplossing 5 ml in een maatkolf van 50 ml en verdun met gedestilleerd water tot ongeveer 35 ml. Breng ten behoeve van een blanco bepaling in een tweede maatkolf van 50 ml ongeveer 35 ml water. Behandel beide kolven als omschreven in 4.3.

4.3. Voeg 0,5 ml kopersulfaat-oplossing I toe, meng en verwarm de inhoud van de kolven in een waterbad van ongeveer 90°C tot $46 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Meng tijdens het opwarmen.

Voeg onder voortdurend schudden 5 ml kopersulfaat-oplossing II toe, plaats de kolven in een waterbad van $46 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en laat ze hierin gedurende 10 minuten staan.

Voeg vervolgens op dezelfde wijze 5 ml calciumhydroxide-suspensie toe, plaats de kolven wederom in het waterbad van $46 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en laat ze hierin nog eens 10 minuten staan.

Koel af tot kamertemperatuur, vul aan met gedestilleerd water tot 50 ml, schud krachtig tot de inhoud van de kolven homogeen is en filtreer.

4.4. Pipetteer in een glazen buis 1 ml van het onder 4.3. verkregen filtraat en in een andere gelijke buis 1 ml van het filtraat verkregen door behandeling van het gedestilleerd water met de klaringsvloei-stoffen.

Behandel beide buizen als volgt: voeg 6,0 ml zwavelzuur-kopersulfaat-oplossing toe en meng. Verwarm de buizen, los afgedekt met rubberstoppen, gedurende 5 minuten in een kokend waterbad en koel af tot kamertemperatuur. Voeg 2 druppels p-hydroxidifenyl-reagens toe en schud krachtig teneinde het reagens zeer fijn verdeeld in de vloeistof te brengen.

Plaats de buizen in een waterbad van $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, laat ze gedurende 15 minuten er in staan en schud van tijd tot tijd.

Verhit de inhoud van de buizen, waarbij deze wederom los worden afgedekt met rubberstoppen, gedurende 90 sec. in een kokend waterbad en koel vervolgens snel af tot 20°C in koud water. Meet het verschil in extinctie tussen beide vloeistoffen bij een golflengte van 570 nm.

Bepaal met behulp van de ijklijn, verkregen als beschreven onder 4.5, het percentage melkzuur in de gereconstitueerde melk verkregen op de in 4.1. beschreven wijze.

Herhaal het onderzoek, indien het percentage melkzuur in de gereconstitueerde melk groter dan 0,010 % blijkt te zijn, met een passende verdunning van het filtraat, verkregen onder 4.3.

4.5. Bepaal de ijklijn als volgt:

pipetteer in een viertal maatkolven van 50 ml telkens 5 ml gereconstitueerde melk bereid uit melkpoeder op de wijze als aangegeven onder 4.1. Dit melkpoeder dient deugdelijk te zijn en bereid uit melk die geen verzuringsmelkzuur bevat.

1053

Breng in deze kolven resp. 0, 1, 2 en 4 ml van de standaard-melkzuuroplossing en vul aan met gedestilleerd water tot ongeveer 35 ml. Handel verder als beschreven onder 4.3. en 4.4. en meet het verschil in extinctie met de blanco bepaling als bedoeld in 4.2.

Zet de verschillen in extinctie, die de reeksleden vertonen ten opzichte van de blanco, af als functie van het percentage toegevoegd melkzuur. Trek door de punten een lijn en verplaats deze evenwijdig aan zichzelf naar de oorsprong. De ijklijn behoort een rechte te zijn.

4.6. Melkzuur wordt geacht slechts in sporen aanwezig te zijn indien het gehalte verkregen volgens 4.4. niet meer dan 0,02 % bedraagt.

5. Fosfatase

Reagentia :

— Natriumhydroxide-oplossing 0,5 n.

— Fosfatase-reagens A.

Los 0,11 g dinatriumfenylfosfaat op in 80 à 90 ml water, voeg hierbij 3 ml 0,25 molair natriumcarbonaat-oplossing (2,65 g watervrij natriumcarbonaat per 100 ml) en vul aan tot 100 ml.

Bereid deze oplossing voor elk onderzoek vers.

— Fosfatase-reagens B.

Los 23 mg 2,6-dibroomchinonchloorimide op in 5 ml ethanol 96 vol. %. Bewaar de oplossing koel en in het donker en niet langer dan 4 weken.

5.1. Maak van het melkpoeder met water, zonder verwarming een zodanige oplossing dat de concentratie aan vetvrije droge melkbestanddelen ongeveer overeenkomt met die van ondermelk.

Neutraliseer, zo nodig, met een natriumhydroxide-oplossing 0,5 n ten opzichte van lakmoespapier.

5.2. Pipetteer in twee reageerbuizen elk 0,5 ml van de te onderzoeken waar zonder de wanden te bevochtigen. Plaats een der beide buizen gedurende 5 min. in een waterbad van 85° C en koel daarna af tot kamertemperatuur.

5.3. Voeg aan beide reageerbuizen met een meetpipet 5 ml fosfatase-reagens A toe; sluit de buizen met een rubberstop en bewaar deze bij een temperatuur tussen 30 en 35° C.

5.4. Voeg na 1 h 6 druppels van fosfatasereagens B toe en meng. Vergelijk na 5 min. de kleuren der beide buizen.

5.5. Indien de inhoud van de buis met de verhitte melk zwakker blauw is dan de inhoud van de andere buis, wordt fosfatase in het onderzochte monster geacht aanwezig te zijn.

5.6. Verhoogde gevoeligheid van de reactie. Voeg in twijfelgevallen aan beide buizen 2 ml normaal butanol toe. Keer de buizen daarop achtmaal voorzichtig om, telkens wachtend totdat de vloeistoflagen zich gescheiden hebben. Eventueel gevormde blauwe of blauwgroene kleurstof lost in de heldere bovenlaag op, waardoor de kleurvergelijking aanzienlijk wordt verscherpt.

5.7. Opmerking :

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

6. Stabilisatoren

Deze methode zal worden behandeld in een aanvulling bij deze aanbeveling.

7. Saccharose

Reagentia :

— Zinkacetaat-oplossing : los 21,9 g $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 3 ml ijsazijn op in gedestilleerd water en verdun tot 100 ml.

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

— Zoutzuur $6,35 \pm 0,20$ n (20 — 22 %).

— Azijnzuur $2,0 \pm 0,2$ n (12 %).

— Ammonia $2,0 \pm 0,2$ n (3,5 %).

Instrumenten

Polarimeter met natriumdampamp.

Polarimeterbuizen met een lengte van exact 2 dm.

7.1. Weeg 40 g van de volgens 1. voorbereide waar op 10 mg nauwkeurig af in een bekersglas van 100 ml. Voeg 50 ml warm gedestilleerd water toe (80 - 90° C) en meng goed. Breng de inhoud van het bekersglas kwantitatief over in een maatkolf van 200 ml. Spoel het bekersglas na met in totaal 100 ml gedestilleerd water van 60° C en breng ook deze wasvloeistof over in de maatkolf. Koel af tot kamertemperatuur.

7.2. Voeg 5 ml van de verdunde ammonia toe. Wervel goed rond en laat de maatkolf gedurende 15 minuten staan.

7.3. Neutraliseer de ammonia door een equivalente hoeveelheid van het verdunde azijnzuur toe te voegen. (Bepaal vooraf het juiste aantal ml door de ammonia te titreren met broomthymolblauw als indicator). Meng door omwervelen.

1055

7.4. Voeg, onder mengen door ronddraaien van de maatkolf, 12,5 ml zinkacetaat-oplossing toe.

7.5. Voeg, onder mengen door ronddraaien van de maatkolf, 12,5 ml kaliumhexacyanoferraat (II)-oplossing toe.

7.6. Breng de inhoud van de maatkolf op 20° C en vul met gedestilleerd water van 20° C aan tot de maatstreep. Sluit de maatkolf met een droge stop en meng de inhoud door krachtig schudden.

7.7. Laat enige minuten staan. Filtreer vervolgens door een droog vouwfilter, waarbij de eerste 25 ml van het filtraat verworpen worden.

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

7.9. Pipetteer 40 ml van de onder 7.7. verkregen oplossing in een maatkolf van 50 ml. Voeg 6 ml 6,35 n zoutzuur toe. Plaats de maatkolf gedurende 15 minuten in een waterbad van 60° C. Meng gedurende de eerste 5 minuten door ronddraaien van de maatkolf (gedurende deze tijd moet de inhoud de temperatuur van het bad hebben bereikt). Koel af tot 20° C en vul met gedestilleerd water van 20° C aan tot de maatstreep. Meng door krachtig schudden en laat de maatkolf 1 uur staan.

7.10. Bepaal de draaiing van de geïnverteerde oplossing bij $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ in dezelfde buis als gebruikt bij 7.8.

7.11. Bereken het saccharosegehalte als volgt :

$$S = (D - 5/4 I) (2,833 - 0,00612F - 0,00878P) \\ [1 + 0,0037 (t - 20)]$$

waarin :

S = saccharosegehalte

D = aflezing polarimeter voor inversie

I = aflezing polarimeter na inversie

F = vetgehalte van de waar

P = eiwitgehalte van de waar ($N \times 6,38$)

t = temperatuur van de oplossing tot 0,2° C nauwkeurig.

8. Microbiologisch onderzoek

Deze methode zal worden beschreven in een aanvulling bij deze aanbeveling.