

1057

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) 7 inzake de
harmonisatie der wetgevingen betreffende melkpoeder

M (68) 51

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
31 maart 1965 inzake de harmonisatie der wetgevingen betref-
fende melkpoeder, M (65) 7,

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 voedingsmiddeltoezicht 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 melkpoeder vóór 1 juli
1969 in hun wetgeving op te nemen als enig geldige referentie-
methoden.

Gedaan te Brussel, op 11 december 1968.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

P. GREGOIRE

1058

Analysemethode voor melkpoeder

M (68) 51, Bijlage

1. Voorbereiding van het monster

Ga uit van een goed gehomogeniseerd monster. Vermijd bij het homogeniseren zoveel mogelijk de opname of afgifte van vocht.

2. Vocht

2.1. Weeg snel ongeveer 2 g van de waar af tot op 1 mg nauwkeurig in een metalen schaal (van aluminium of nikkel) met een diameter van ca. 4 cm en voorzien van een goed sluitend deksel.

2.2. Droog in een voorgedroogde luchtstroom gedurende 2 uur bij $99 \pm 1^\circ \text{C}$.

2.3. Bedek het schaal met het deksel, laat in een exsiccator afkoelen tot kamertemperatuur en weeg.

2.4. Herhaal het drogen telkens gedurende 1 uur tot het gewichtsverlies tussen twee opeenvolgende wegingen niet meer bedraagt dan 2 mg.

2.5. Het gewichtsverlies, berekend op 100 g van de waar, is het vochtgehalte.

3. Vet

Reagentia :

- Ammonia, 25 gew. %
- Ethanol, 96 vol. %
- Diethylether, peroxidevrij
- Petroleumether, kookpunt $40 - 60^\circ \text{C}$.

Apparatuur

— Extractiebuisen volgens Mojonnier : zie tekening blz. 1063.

3.1. Breng ca. 1,0000 g van het monster in de extractiebuis en voeg toe 9 ml water. Verwarm zonodig in een waterbad van ca. 65°C totdat het monster, onder herhaald rondwervelen van de vloeistof, gelijkmatig is verdeeld.

3.2. Voeg 2 ml ammonia toe. Houd de extractiebuis vertikaal, verwarm gedurende 15 minuten in een waterbad van ca. 65°C en meng gedurende deze tijd de inhoud van de extractiebuis zorgvuldig. Koel daarna af tot ca. 20°C .

3.3. Voeg 10 ml ethanol toe en meng de vloeistoffen door de buis enige malen uit de verticale stand in een bijna horizontale stand te brengen.

3.4. Voeg 25 ml diethylether toe en sluit de buis met een met water bevochtigde kurk. Schud de extractiebuis krachtig gedurende 1 minuut en houd de buis daarbij zodanig horizontaal dat de vloeistof zich in het wijde gedeelte bevindt.

3.5. Open de buis en voeg 25 ml petroleumether toe. Sluit de buis en schud haar gedurende 30 sec. als boven, doch niet te krachtig.

3.6. Laat de extractiebuis met de sluiting naar boven zo lang staan (ten minste 30 min.) of centrifugeer haar zo lang bij 500/600 omwentelingen per minuut (ten minste 1 min.) tot de bovenlaag volkomen helder is geworden en zich volledig van de waterlaag heeft gescheiden.

3.7. Giet voorzichtig zoveel mogelijk van de etherlaag in een gedroogd en gewogen kolfje van 250 ml met platte bodem, waarin zich enige kooksteentjes bevinden. Spoel de kurk en de buitenzijde van de hals van de extractiebuis met enige ml petroleumether af en vang deze spoelvloeistof in hetzelfde kolfje op. Houd de extractiebuis vertikaal en spoel de binnenzijde van de hals met een weinig petroleumether af. Herhaal de extractie met telkens 25 ml diethylether en 25 ml petroleumether nog twee keer. Schenk de extractievloeistoffen en spoelvloeistoffen in hetzelfde kolfje, waarin zich de eerste extractievloeistof bevindt.

3.8. Spoel de binnenzijde van de hals van het kolfje met een weinig petroleumether af. Destilleer voorzichtig de vluchtige bestanddelen af.

3.9. Droog het kolfje met inhoud gedurende 1 h bij $102 \pm 2^\circ \text{C}$, waarbij het kolfje horizontaal in de droogstoof moet liggen. Laat afkoelen tot kamertemperatuur en weeg.

3.10. Herhaal deze bewerking, waarbij telkens 30 minuten wordt gedroogd, totdat het gewicht van het kolfje niet meer afneemt. Het gewicht van het residu, berekend op 100 g van de waar, is het vetgehalte.

4. Melkzuur

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 %.

1060

— 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.

4.1. Weeg $\frac{870}{a - 8,7}$ g van het monster af tot op 0,1 g nauwkeurig,

(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 ± 1° C. Meng tijdens het opwarmen.

Voeg onder voortdurend schudden 5 ml kopersulfaat-oplossing II toe, plaats de kolven in een waterbad van 46 ± 1° 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 ± 1° 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-hydroxydifenyl-reagens toe en schud krachtig teneinde het reagens zeer fijn verdeeld in de vloeistof te brengen.

Plaats de buizen in een waterbad van 30 ± 2° 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. Neem hiervoor zo mogelijk poeder van hetzelfde type als het te onderzoeken monster.

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. 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 fosfatase reagens 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 primair butanol toe. Keer de buizen daarop achtmaal voorzichtig om, telkens wachtend totdat de vloeistof-lagen zich gescheiden hebben. Eventueel gevormde blauwe of blauw-groene kleurstof lost in de heldere bovenlaag op, waardoor de kleur-vergelijking 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 bedenken men dat speeksel fosfatase bevat.

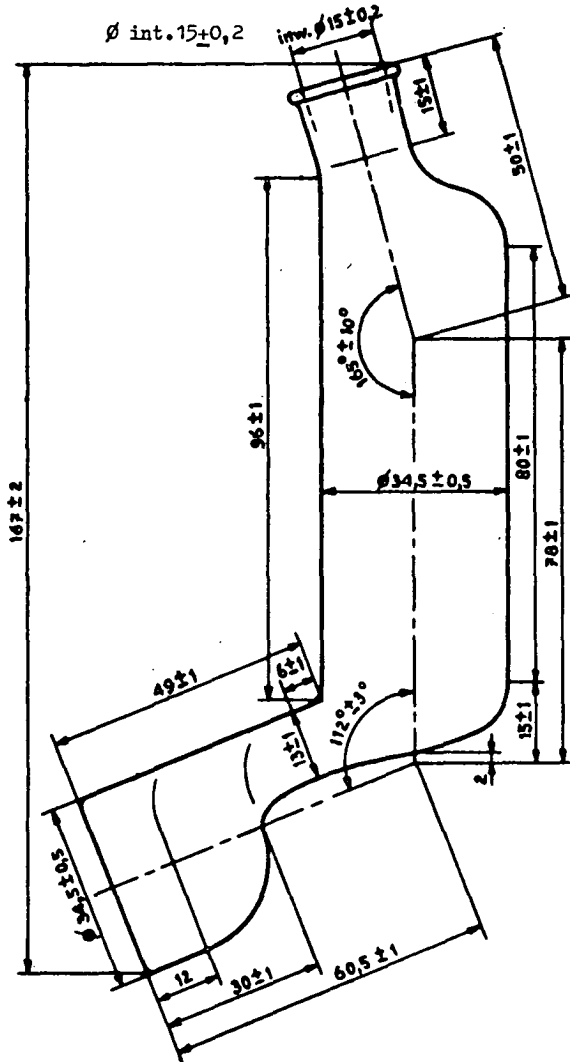
6. Microbiologisch onderzoek

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

Mesures en mm

Maten in mm

Tube à extraction suivant Mojonnier
 Extractiebuis volgens Mojonnier
 hals inw. conisch 1:10
 conicité intérieure du col 1:10



inhoud van het voetje $21,5 \pm 0,5$ ml
 glasdikte $1,25 \pm 0,25$ mm
 contenu du pied $21,5 \pm 0,5$ ml
 épaisseur du verre $1,25 \pm 0,25$ mm