II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

RAT

ENTSCHEIDUNG DES RATES

vom 14. November 1992

zur Festlegung von Analyse- und Testverfahren für wärmebehandelte Milch, die zum unmittelbaren Genuß durch Menschen bestimmt ist

(92/608/EWG)

DER RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 85/397/EWG des Rates vom 5. August 1985 zur Regelung gesundheitlicher und tierseuchenrechtlicher Fragen im innergemeinschaftlichen Handel mit wärmebehandelter Milch⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 11 Absatz 6,

auf Vorschlag der Kommission,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gemäß Artikel 11 Absatz 6 der Richtlinie 85/397/EWG legt der Rat insbesondere die Modalitäten der in Absatz 2 desselben Artikels genannten Kontrollen fest. Diese von den Betrieben unter Aufsicht und Verantwortung der amtlichen Behörde sowie unter regelmäßiger Kontrolle der amtlichen Behörde durchzuführenden Kontrollen zielen darauf ab, die Erfüllung der Anforderungen der Richtlinie 85/397/EWG, insbesondere der in Artikel 3 Abschnitt A Nummer 3 genannten, zu gewährleisten.

Bei der Festlegung der Kontrollmodalitäten sind auch die notwendigen Verfahren sowie die Art ihrer Durchführung festzulegen.

Für wärmebehandelte Milch, die zum unmittelbaren Genuß durch Menschen bestimmt ist, sind die Verfahren zur Bestimmung des Trockenmassegehalts, des Fettgehalts, des Gehalts an fettfreier Trockenmasse, des Gesamtstickstoffgehalts, des Eiweißgehalts und der relativen Dichte festzulegen.

(¹) ABl. Nr. L 226 vom 24. 8. 1985, S. 13. Richtlinie zuletzt geändert durch die Richtlinie 89/662/EWG (ABl. Nr. L 395 vom 30. 12. 1989, S. 13).

Aus technischen Gründen müssen zunächst die Analyse- und Test-Referenzverfahren erlassen werden, damit gewährleistet ist, daß die in Artikel 3 Abschnitt A Nummer 3 der Richtlinie 85/397/EWG genannten Anforderungen erfüllt werden. Insbesondere müssen noch die Durchführungsbedingungen für die routinemäßigen Analyse- und Testverfahren geprüft werden. Solange die Ergebnisse dieser Prüfung noch nicht vorliegen, ist es Aufgabe der zuständigen Behörden, darüber zu wachen, ob es mit den verwendeten Routineverfahren möglich ist, die Erfüllung der genannten Anforderungen sicherzustellen.

Bei der Festlegung von Referenzverfahren sind insbesondere die Analyseverfahren und die Zuverlässigkeitsbedingungen festzulegen, damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Wärmebehandelte Milch, die zum unmittelbaren Genuß durch Menschen bestimmt ist, wird mit Hilfe von Referenzverfahren auf folgende Kriterien untersucht und geprüft:

- Trockenmassegehalt,
- Fettgehalt,
- Gehalt an fettfreier Trockenmasse,
- Gesamtstickstoffgehalt,
- Eiweißgehalt,
- relative Dichte.

Artikel 2

Für die Durchführung der Analyse- und Test-Referenzverfahren, die Zuverlässigkeitsbedingungen und die Probenahme gelten die Vorschriften des Anhangs I.

Artikel 3

Anhang II enthält die Arbeitsvorschriften für die in Artikel 1 genannten Verfahren.

Artikel 4

Diese Entscheidung ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Geschehen zu Brüssel am 14. November 1992.

Im Namen des Rates

Der Präsident

J. GUMMER

ANHANG I

I. ALLGEMEINE BESTIMMUNGEN

1. EINLEITUNG

Dieser Teil enthält allgemeine Bestimmungen für Reagenzien, Laboreinrichtungen, die Darstellung der Ergebnisse, die Zuverlässigkeit und die Analyseberichte. Diese allgemeinen Bestimmungen sind von den zuständigen Behörden der Mitgliedstaaten und den mit der Milchprobenahme und -analyse betrauten Kontrollabors einzuhalten.

2. REAGENZIEN

2.1. Wasser

2.1.1. Sofern nicht ausdrücklich anders spezifiziert, handelt es sich bei dem zu verwendenden Wasser um destilliertes Wasser, entionisiertes Wasser oder entmineralisiertes Wasser von mindestens entsprechender Reinheit.

2.1.2. Sofern nicht näher bestimmt, handelt es sich bei den zu verwendenden „Lösungen“ oder „Verdünnungen“ um „wäßrige Lösungen“ bzw. „Verdünnungen in Wasser“.

2.2. Chemikalien

Sofern nicht anders spezifiziert, müssen sämtliche verwendeten Chemikalien von anerkannter analysenreiner Qualität sein.

3. LABOREINRICHTUNG

3.1. Angegebene Laboreinrichtung

Die für die einzelnen Referenzverfahren angegebene Laboreinrichtung umfaßt nur Spezialzubehör sowie Zubehör für eine besondere Verwendung.

3.2. Analysenwaage

Unter „Analysenwaage“ ist eine Waage mit einer Ablesemöglichkeit von 0,1 mg zu verstehen.

4. AUSWERTUNG

4.1. Ergebnisse

Sofern nicht näher bestimmt, ist in den Untersuchungsbericht das arithmetische Mittel zweier Analysen aufzunehmen, welche die für das betreffende Verfahren festgelegten Anforderungen an die Wiederholbarkeit (5.1.1) erfüllen. Sofern diese Wiederholbarkeitsbedingungen nicht erfüllt sind, muß die Analyse nach Möglichkeit wiederholt werden, anderenfalls ist das Ergebnis ungültig.

4.2. Angabe in Prozenten

Sofern nicht anders spezifiziert, ist das Ergebnis in Massenprozenten der Probe anzugeben.

5. ZUVERLÄSSIGKEITSBEDINGUNGEN: WIEDERHOLBARKEIT (r) UND VERGLEICHBARKEIT (R)

5.1. Nachfolgend werden die Zuverlässigkeitsbedingungen für die einzelnen Verfahren definiert:

5.1.1. *Die Wiederholbarkeit* gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die nach demselben Verfahren mit identischem Untersuchungsmaterial unter denselben Bedingungen (derselbe Untersucher, dieselben Geräte, dasselbe Labor) unmittelbar nacheinander durchgeführt werden, den jeweils festgesetzten Wert (r) nicht überschreitet.

5.1.2. *Die Vergleichbarkeit* gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die nach demselben Verfahren mit identischem Untersuchungsmaterial unter verschiedenen Bedingungen (verschiedene Untersucher, verschiedene Geräte, verschiedene Labors) und/oder zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden, den jeweils festgesetzten Wert (R) nicht überschreitet.

5.1.3. Sofern nicht anders bestimmt, entsprechen die Anforderungen an die Wiederholbarkeit (r) und die Vergleichbarkeit (R) dem 95%-Vertrauensbereich nach ISO 5725: Ausgabe 1986.

5.1.4. Die erforderlichen Ringversuche und Bestimmungen sind entsprechend den internationalen Leitlinien durchzuführen.

6. UNTERSUCHUNGSBERICHT

In dem Untersuchungsbericht sind das verwendete Verfahren sowie die erzielten Ergebnisse anzugeben. Darüber hinaus sind weitere, in der Verfahrensbeschreibung nicht genannte oder zur Wahl gestellte sowie sonstige Einzelheiten anzugeben, die das erzielte Ergebnis beeinflussen haben könnten. Der Untersuchungsbericht enthält sämtliche Angaben, die für eine eindeutige Identifizierung der Probe erforderlich sind.

II. ENTNAHME VON PROBEN WÄRMEBEHANDELTER MILCH

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren für die Probenahme, den Transport und die Aufbewahrung von Proben wärmebehandelter Milch.

2. ALLGEMEINES

Die Entnahme von Proben wärmebehandelter Milch aus Milchtanks usw. ist von sachkundigem Personal durchzuführen, das vor dem Einsatz eine geeignete Ausbildung erfahren hat.

Die zuständigen Behörden oder das Untersuchungslabor unterweisen das Probenahmepersonal in Fragen der Probenahmetechnik, damit eine repräsentative und der Charge entsprechende Probenahme gewährleistet ist.

Die zuständigen Behörden oder das Untersuchungslabor unterweisen erforderlichenfalls das Probenahmepersonal in Fragen der Kennzeichnung der Proben, damit eine identitätsgerechte Untersuchung jeder Probe gesichert ist.

3. PROBENAHMEGERÄTE

3.1. Allgemeines

Probenahmegeräte müssen aus rostfreiem Stahl oder einem anderen geeigneten Werkstoff mit ausreichender Festigkeit gefertigt sein und eine zweckdienliche Bauweise (Mischen, Entnahme usw.) aufweisen. Rührstäbe und Rührwerke zum Mischen von Flüssigkeiten in Großbehältern sollen so ausgelegt sein, daß eine ausreichende Durchmischung des Erzeugnisses gewährleistet ist, jedoch keine Fettschädigung zu befürchten ist. Schöpflöffel müssen einen stabilen Handgriff ausreichender Länge aufweisen, damit aus jeder beliebigen Tiefe des Tanks eine Probe gezogen werden kann. Schöpflöffel müssen ein Nennvolumen von mindestens 50 ml aufweisen.

Probengefäße und -verschlüsse sollen aus Glas, geeignetem Metall oder Kunststoff gefertigt sein.

Die für die Fertigung von Probenahmegeräten (einschließlich Gefäße und Verschlüsse) verwendeten Werkstoffe dürfen keine Veränderung der Probe bewirken, die sich auf die Untersuchungsergebnisse auswirken könnte. Probenahmegeräte und Probenbehälter müssen saubere, trockene, glatte und rißfreie Oberflächen sowie abgerundete Ecken aufweisen.

4. PROBENAHMETECHNIK

4.1. Allgemeines

Ungeachtet der Art der anstehenden Untersuchungen ist die Milch vor der Probenahme entweder von Hand oder maschinell gründlich zu durchmischen.

Die Probe ist unmittelbar nach dem Durchmischen zu entnehmen, solange die Milch noch in Bewegung ist.

Das Probenvolumen muß für den Untersuchungszweck ausreichen. Der Nenninhalt der verwendeten Probengefäße ist so zu wählen, daß diese von der Probe nahezu gänzlich gefüllt werden, damit eine geeignete Durchmischung des Inhalts vor der Untersuchung möglich ist, ohne daß die Gefahr besteht, daß die Proben während des Transports anbuttern.

4.2. Probenahme

4.2.1. *Sammelproben*

Ist die zur Probenahme anstehende Milch auf mehrere Tanks aufgeteilt, wird aus jedem Tank eine repräsentative Menge entnommen und die Menge jeder einzelnen Probe protokolliert. Sofern die Proben aus jedem Tank nicht einzeln untersucht werden, sind diese repräsentativen Proben im Verhältnis zu ihrem Anteil am Nennvolumen des Tanks, aus dem sie entnommen wurden, miteinander zu vermischen. Nach dem Durchmischen wird davon eine Sammelmilchprobe entnommen.

4.2.2. *Probentnahme aus Großbehältern — Lagertanks, Tankwagen (Schiene und Straße)*

4.2.2.1. Vor der Probenahme wird die Milch nach einem geeigneten Verfahren durchmischt.

Bei Großbehältern, Lagertanks und Tankwagen sollte der Inhalt maschinell (4.2.2.2) durchgerührt werden.

Das Durchmischen der Milch soll der Standzeit entsprechend gründlich durchgeführt werden. Das verwendete Rührverfahren muß unter allen Umständen für die Zwecke der anstehenden Untersuchungen erprobt sein. Die gründliche Durchmischung ist eine wesentliche Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse von Proben aus verschiedenen Teillieferungen oder von Proben, die in bestimmten Abständen bei der Tankentladung aus dem Auslaufhahn gezogen wurden. Ein Verfahren zum Rühren von Milch gilt dann als effizient, wenn die Differenz des Fettgehalts von zwei unter denselben Bedingungen gezogenen Proben weniger als 0,1% beträgt.

Bei Großbehältern mit Bodenauslaufhahn kann es vorkommen, daß sich am Auslaß eine geringe Milchmenge befindet, die auch nach dem Durchmischen für die Gesamtlieferung nicht repräsentativ ist. In solchen Fällen werden Proben vorzugsweise durch ein Mannloch entnommen. Werden Proben am Auslaufhahn entnommen, so ist zunächst eine ausreichende Milchmenge abzulassen, damit gewährleistet ist, daß die Proben für die Gesamtlieferung repräsentativ sind.

4.2.2.2. Für das Durchmischen des Inhalts von Großbehältern oder von Lagertanks und Tankwagen können verwendet werden:

- Einbaurührwerke mit Elektromotor;
- Propeller- oder andere Rührwerke mit Elektromotor, die durch das Mannloch in die Milch eingeführt werden;
- im Fall von Tankwagen (Schiene oder Straße) durch Umwälzen der Milch mit Hilfe des in das Mannloch eingeführten und an die Förderpumpe des Tankwagens angeschlossenen Umpumpschlauchs;
- saubere gefilterte Druckluft; in diesem Fall soll beim Einblasen mit geringstmöglichem Luftdruck und -volumen gearbeitet werden, um ein Ranzigwerden zu vermeiden.

4.3. **Entnahme von Proben wärmebehandelter Milch für den unmittelbaren Genuß in Einzelhandelspackungen**

Als Proben wärmebehandelter Milch für den unmittelbaren Genuß in Einzelhandelspackungen werden die ganzen versiegelten Packungen herangezogen. Nach Möglichkeit sind die Proben unmittelbar nach der Verarbeitung aus der Verpackungsanlage bzw. dem Kühllager im Bearbeitungsbetrieb zu entnehmen, bei pasteurisierter Milch am Tag der Verarbeitung.

Es werden von jeder Kategorie wärmebehandelter Milch (pasteurisierte, ultrahocherhitzte und sterilisierte Milch) Proben in einem Umfang entnommen, der den durchzuführenden Untersuchungen sowie den vom Untersuchungslabor oder einer anderen zuständigen Behörde festgelegten Vorschriften entspricht.

5. **KENNZEICHNUNG DER PROBE**

Die Probe wird entsprechend den Vorschriften der zuständigen Behörde oder des Untersuchungslabors zur Gewährleistung der identitätsgerechten Untersuchung der Probe (vgl. 2) mit einer Kennzeichnungsnummer versehen, damit jede Verwechslung ausgeschlossen ist.

6. **HALTBARMACHUNG, TRANSPORT UND AUFBEWAHRUNG VON PROBEN**

Die Vorschriften für die Bedingungen der Haltbarmachung, Beförderung, Lagerung sowie den Zeitabstand zwischen Probenahme und Milchanalyse werden vom Prüflabor für die einzelnen Milcharten und zu verwendenden Analyseverfahren ausgearbeitet. Diese Vorschriften werden im Einvernehmen mit der zuständigen einzelstaatlichen Behörde festgelegt.

Diese Vorschriften sollen folgende Einzelheiten umfassen:

- Bei Transport und Lagerung sind Vorkehrungen gegen Fremdgeruch und direkte Sonnenbestrahlung zu treffen. Bei Verwendung eines durchsichtigen Probengefäßes ist dieses im Dunkeln aufzubewahren.

ANHANG II

I. BESTIMMUNG DES TROCKENMASSEGEHALTS**1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH**

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung des Trockenmassegehalts von Milch.

2. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Trockenmassegehalt: Darunter ist der Rückstand, ausgedrückt in Massenprozenten zu verstehen, der nach dem beschriebenen Trocknungsverfahren zurückbleibt.

3. KURZBESCHREIBUNG

Man entzieht der Probe das Wasser durch Verdampfen bei 102 ± 2 °C in einem Trockenschrank.

4. GERÄTE UND HILFSMITTEL

Übliche Laboreinrichtung, insbesondere:

4.1. Analysenwaage**4.2. Exsikkator, beschickt mit einem wirksamen Trocknungsmittel (z. B. frisch getrocknetes Silica-Gel mit Feuchtigkeitsindikator).****4.3. Trockenschrank, belüftet, einstellbar auf eine konstante Temperatur von 102 ± 2 °C.****4.4. Flache Schalen, 20 bis 25 mm Höhe, 50 bis 75 mm Durchmesser, aus geeignetem Werkstoff, mit dichtschießendem, leicht abnehmbarem Deckel.****4.5. Wasserbad****4.6. Homogenisiergerät****5. VORBEREITUNG DER PROBE FÜR DIE UNTERSUCHUNG**

Die Probe wird auf eine Temperatur von 20 bis 25 °C gebracht und gründlich durchmischt, damit eine homogene Verteilung des Fetts in der ganzen Probe gewährleistet ist. Dabei ist so vorsichtig zu schütteln, daß ein Schäumen oder Anbuttern der Probe vermieden wird. Ist das Untermischen der Rahmschicht nicht ohne weiteres möglich, wird die Probe langsam auf 35 bis 40 °C angewärmt und auch die der Gefäßwand anhaftende Rahmschicht durch vorsichtiges Mischen gleichmäßig verteilt. Anschließend wird die Probe rasch auf 20 bis 25 °C abgekühlt.

Wahlweise kann auch ein Homogenisiergerät für die Verteilung des Fetts eingesetzt werden.

Korrekte Ergebnisse sind nicht zu erwarten, wenn die Probe unverteilt flüssiges Fett oder mit dem bloßen Auge erkennbare unverteilte, unregelmäßig geformte weiße Teilchen enthält, die an den Gefäßwänden haften bleiben.

6. VERFAHREN**6.1. Vorbereitung der Schale**

Schale (4.4) und Deckel werden mindestens dreißig Minuten im Trockenschrank bei einer konstanten Temperatur von 102 ± 2 °C gehalten. Die Schale wird mit aufgelegtem Deckel sofort in den Exsikkator (4.2) verbracht, wo man sie auf Zimmertemperatur abkühlen läßt (d. h. mindestens 30 Minuten); anschließend wird auf 0,1 mg genau gewogen.

6.2. Probeneinwaage

3 bis 5 g der vorbereiteten Probe (vgl. 5) werden sofort in die vorbereitete Schale (6.1) auf 0,1 mg genau eingewogen.

6.3. Bestimmung**6.3.1. Die Schale wird 30 Minuten auf dem Wasserbad (4.5) vorgetrocknet.**

- 6.3.2. Schale und Deckel werden im Trockenschrank (4.3) bei konstanter Temperatur von 102 ± 2 °C zwei Stunden erwärmt. Deckel auf Schale aufsetzen und aus dem Ofen nehmen.
- 6.3.3. Im Exsikkator (4.2) (mindestens 30 Minuten) auf Zimmertemperatur abkühlen lassen, anschließend auf 0,1 mg genau wiegen.
- 6.3.4. Schale und Deckel werden erneut im Trockenschrank eine Stunde lang erwärmt. Die Schale wird mit dem Deckel verschlossen und aus dem Trockenschrank genommen. Schale etwa 30 Minuten im Exsikkator abkühlen lassen, anschließend auf 0,1 mg genau wiegen.
- 6.3.5. Das Verfahren nach 6.3.4 wird so lange wiederholt, bis die Massendifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wägungen 0,5 mg nicht überschreitet. Die niedrigste Masse wird angegeben.

7. AUSWERTUNG

7.1. Berechnung

Der Trockenmassegesamtgehalt in Prozenten wird nach folgender Formel berechnet:

$$W_T = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

W_T = Trockenmassegehalt in g pro 100 g,

m_0 = Masse von Schale und Deckel in Gramm (6.1),

m_1 = Masse von Schale, Deckel und Produkt in Gramm (6.2),

m_2 = Masse von Schale, Deckel und Produkt nach der Trocknung in Gramm (6.3.5).

Das erzielte Ergebnis ist auf 0,01 Massenprozent abzurunden.

7.2. Zuverlässigkeit

- 7.2.1. *Wiederholbarkeit (r)*: 0,10 g Trockenmasse pro 100 g Produkt.
- 7.2.2. *Vergleichbarkeit (R)*: 0,20 g Trockenmasse pro 100 g Produkt.

II. BESTIMMUNG DES FETTGEHALTS

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung des Fettgehalts von wärmebehandelter Vollmilch, teilentrahmter Milch und Magermilch.

2. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Fettgehalt: Darunter ist der mit dem beschriebenen Verfahren bestimmte Gesamtgehalt an Fett und fettähnlichen Stoffen, ausgedrückt in Gewichtsprozenten, zu verstehen.

3. KURZBESCHREIBUNG

Eine ammoniakalische ethanolische Lösung der Probe wird mit Diethylether und Petroleumbenzin extrahiert; anschließend werden die Lösungsmittel abdestilliert und die Masse der in Petroleumbenzin löslichen Substanzen bestimmt. Dieses Verfahren ist als Röse-Gottlieb-Verfahren allgemein bekannt.

4. REAGENZIEN

Sämtliche Reagenzien müssen von anerkannt analysenreiner Qualität sein und dürfen beim Blindversuch keinen nachweisbaren Rückstand hinterlassen.

Zur Qualitätskontrolle der Reagenzien ist ein Blindversuch gemäß 6.3 durchzuführen. Für die Einwaage ist ein leerer Kolben, Kochbecher oder eine leere Metallschale (5.8) zu verwenden, die gemäß 6.4 als Tara vorbereitet wird (damit eine Korrektur des Einflusses veränderter Umgebungsbedingungen auf das Wiegeergebnis möglich ist). Hat der um die scheinbare Änderung der Taramasse bereinigte Rückstand eine Masse von über 2,5 mg, so ist der Lösungsmittelrückstand durch Eindampfen von jeweils 100 ml Diethylether (4.4) und 100 ml Petroleumbenzin (4.5) einzeln zu bestimmen. Vor der Einwaage ist ebenfalls die Taramasse zu bestimmen. Hat der Rückstand eine Masse von über 2,5 mg, ist das Lösungsmittel durch Destillation zu reinigen oder durch ein anderes Lösungsmittel zu ersetzen.

- 4.1. **Ammoniaklösung** mit einem Massengehalt von etwa 25 % NH_3 . Es kann auch eine stärker konzentrierte Ammoniaklösung (6.5.1 und A.1.5.1) verwendet werden.

- 4.2. Ethanol mit mindestens 94 Volumen-%. Mit Methanol vergälltes Ethanol darf verwendet werden, sofern sichergestellt ist, daß die Ergebnisse der Bestimmung nicht beeinflußt werden.
- 4.3. **Kongorot- oder Kresolrotlösung**
1 g Kongorot oder Kresolrot wird in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.
Anmerkung: Zur deutlicheren Unterscheidung der Grenzfläche zwischen dem Lösungsmittel und der wäßrigen Phase können diese Lösungen wahlweise (vgl. 6.5.2) verwendet werden.
Es können auch andere wäßrige Farbstofflösungen verwendet werden, sofern sie das Untersuchungsergebnis nicht beeinflussen.
- 4.4. Diethylether, peroxidfrei, mit weniger als 2 mg/kg Antioxydantien, der den Anforderungen des Blindversuchs (6.3) genügen muß.
- 4.5. **Petroleumbenzin**, Siedebereich 30—60 °C.
- 4.6. **Lösungsmittelgemisch**, unmittelbar vor der Untersuchung durch Mischen gleicher Volumenteile Diethylether (4.4) und Petroleumbenzin (4.5) angesetzt.
5. **GERÄTE UND HILFSMITTEL**
Achtung: Da bei der Bestimmung flüchtige, entflammare Lösungsmittel verwendet werden, müssen eventuell verwendete elektrische Geräte den gesetzlichen Bestimmungen für den Umgang mit solchen Lösungsmitteln entsprechen.
Übliche Laboreinrichtung, insbesondere:
- 5.1. **Analysenwaage**
- 5.2. **Zentrifuge** zum Zentrifugieren der Extraktionsgefäße oder -rohre (5.6) bei 500—600 min⁻¹ zur Erzeugung einer Zentrifugalbeschleunigung von 80—90 g am äußeren Ende der Gefäße oder Rohre.
Anmerkung: Die Wahl der Zentrifuge ist freigestellt (6.5.5).
- 5.3. **Destillations- oder Eindampfanlage** zum Abdestillieren von Ethanol und Lösungsmitteln aus den Gefäßen bzw. zum Eindampfen in Bechergläsern und Schalen (vgl. 6.5.12 und 6.5.15) bei einer Temperatur von höchstens 100 °C.
- 5.4. **Trockenschrank**, elektrisch beheizt, versehen mit weit geöffneten Entlüftungsclappen und einem geeigneten Thermometer, einstellbar auf eine konstante Temperatur von 102 ± 2 °C.
- 5.5. **Wasserbad** zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur von 35—40 °C.
- 5.6. **Extraktionsgefäße (Mojonnier-Art)**
Anmerkung: Es dürfen auch Extraktionsgefäße mit Heber oder Waschflaschenarmatur benutzt werden; in diesem Fall ist allerdings ein anderes Verfahren zu verwenden, das in der Anlage beschrieben wird.
Die Extraktionsgefäße (bzw. -rohre) müssen mit eingeschliffenen Glasstopfen oder hochwertigen Korkstopfen oder anderen reagenzunempfindlichen Stopfen verschließbar sein. Korkstopfen müssen mit Diethylether (4.4) extrahiert und mindestens 15 Minuten bei 60 °C gewässert werden; anschließend müssen sie in Wasser abgekühlt werden, damit sie bei der Verwendung mit Wasser vollgesogen sind.
- 5.7. **Gestell** zur Aufnahme der Extraktionsgefäße (bzw. -rohre) (5.6).
- 5.8. **Waschflasche**, die sich für das verwendete Lösungsmittelgemisch (4.6) eignet. Waschflaschen auf Kunststoff sind ungeeignet.
- 5.9. **Fettsammelgefäße**, z. B. Bechergläser (mit flachem Boden), oder Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 125—250 ml oder Metallschalen. Die verwendeten Metallschalen müssen vorzugsweise aus rostfreiem Stahl gefertigt sein, einen flachen Boden und nach Möglichkeit einen flachen Ausguß, einen Durchmesser von 80—100 mm und eine Höhe von etwa 50 mm aufweisen.
- 5.10. **Siedesteinchen**, fettfrei, aus nicht porösem Porzellan oder Siliciumcarbid oder Glaskügelchen (bei Verwendung von Metallschalen wahlweise).
- 5.11. **Meßzylinder**, 5 und 25 ml Inhalt.
- 5.12. **Pipetten**, 10 ml Inhalt, mit Maßteilung.
- 5.13. **Zangen**, aus Metall, zum Halten der Gefäße, Kochbecher bzw. Schalen.

6. VERFAHREN

Anmerkung: Das alternative Verfahren unter Verwendung von Extraktionsrohren mit Heber bzw. Waschflaschenarmatur (vgl. Anmerkung zu 5.6) wird in der Anlage beschrieben.

6.1. Vorbereitung der Probe für die Untersuchung

Die Laborprobe ist 15 Minuten auf etwa 35–40 °C anzuwärmen, gegebenenfalls im Wasserbad. Die Probe wird durch wiederholtes Stürzen des Gefäßes gründlich, aber so vorsichtig durchmischt, daß Schäumen oder Anbuttern vermieden wird; anschließend wird sie rasch auf 20 °C abgekühlt.

6.2. Probeneinwaage

Die zu untersuchende Probe (6.1) wird durch drei- oder viermaliges Stürzen des Gefäßes durchmischt. 10 bis 11 g der Probe werden direkt oder durch Rückwägen in eines der Extraktionsgefäße (5.6) auf 1 mg genau eingewogen. Die Probeneinwaage ist so schnell wie möglich in die untere (kleinere) Blase des Extraktionsgefäßes zu überführen.

6.3. Blindversuch

Parallel zur Untersuchung wird ein Blindversuch durchgeführt; dabei sind die gleichen Reagenzien, jedoch anstelle der Probeneinwaage 10–11 ml Wasser zu verwenden.

Der scheinbare Massenverlust des Fettsammelgefäßes, berichtigt um den scheinbaren Massenverlust des Kontrollgefäßes, darf höchstens 2,5 mg betragen.

6.4. Vorbereitung des Fettsammelgefäßes

Ein (zur Erzielung eines leichten Siedens bei dem anschließenden Austreiben des Lösungsmittels) mit einigen Siedesteinchen (5.10) beschicktes Gefäß (5.9) wird im Trockenschrank (5.4) 1 Stunde lang getrocknet. Das Gefäß (nicht im Exsikkator, aber staubgeschützt) auf Raumtemperatur abkühlen lassen (Glasgefäße mindestens 1 Stunde, Metallschalen mindestens 1/2 Stunde). Auf konstante Temperatur achten, das Gefäß mit Zangen auf die Waage stellen und auf 0,1 mg genau wiegen.

6.5. Bestimmung

6.5.1. Die Probeneinwaage in der kleinen Blase des Gefäßes wird mit 2 ml Ammoniaklösung (4.1) oder einer entsprechenden Menge einer stärker konzentrierten Ammoniaklösung versetzt und gründlich vermischt. Sofort nach der Ammoniakzugabe wird die Bestimmung durchgeführt.

6.5.2. Die Probe mit 10 ml Ethanol (4.2) versetzt und durch vorsichtiges Schütteln gründlich vermischt, wobei der Gefäßinhalt zwischen den beiden Blasen hin und her fließen muß; dabei darf die Flüssigkeit den Flaschenhals nicht benetzen. Wahlweise 2 Tropfen Kongorot- oder Kresolrot-Lösung (4.3) zugeben.

6.5.3. Die Probe wird mit 25 ml Diethylether (4.4) versetzt. Anschließend wird das Gefäß mit einem wassergesättigten Korkstopfen oder einem befeuchteten Stopfen (5.6) verschlossen und eine Minute lang in horizontaler Lage und mit oberliegender Öffnung der kleinen Blase gründlich aber vorsichtig geschüttelt (damit sich keine bleibenden Emulsionen bilden). Dabei muß die Flüssigkeit mehrmals zwischen der großen und der kleinen Blase hin- und herfließen. Das Gefäß gegebenenfalls unter fließendem Wasser abkühlen lassen, anschließend den Korken bzw. Stopfen vorsichtig entfernen und diesen sowie den Gefäßrand mit ein wenig Lösungsmittelgemisch (4.6) unter Verwendung der Waschflasche (5.8) so spülen, daß die Spülflüssigkeit in das Gefäß fließt.

6.5.4. Die Proben werden mit 25 ml Petroleumbenzin (4.5) versetzt; anschließend wird das Gefäß mit dem erneut (durch Eintauchen in Wasser) befeuchteten Korken oder Stopfen verschlossen und, wie unter 6.5.3 beschrieben, 30 Sekunden lang vorsichtig geschüttelt.

6.5.5. Das geschlossene Gefäß sollte 1 bis 5 Minuten lang bei einer Drehzahl von 500–600 min⁻¹ (5.2) zentrifugiert werden. Steht keine Zentrifuge zur Verfügung (5.2), so ist das geschlossene Gefäß im Gestell (5.7) mindestens 30 Minuten lang stehen zu lassen, bis sich der Überstand geklärt und vollständig von der wässrigen Schicht getrennt hat. Das Gefäß ist erforderlichenfalls unter fließendem Wasser zu kühlen.

6.5.6. Der Korken oder Stopfen wird vorsichtig entfernt und ebenso wie die Innenseite des Gefäßhalses mit ein wenig Lösungsmittelgemisch (4.6) so abgespült, daß die Spülflüssigkeit in das Gefäß hineinfließt.

Sofern die Trennungslinie zwischen den beiden Schichten unterhalb des unteren Gefäßhalses liegt, wird sie durch vorsichtiges Eingießen von Wasser an der Gefäßwand entlang auf die vorgesehene Höhe eingestellt, damit das Lösungsmittel ohne weiteres abgossen werden kann.

6.5.7. Der Überstand wird möglichst vollständig in das mit Siedesteinchen (5.10) beschickte Fettsammelgefäß (6.4) dekantiert, wobei das Extraktionsgefäß an der kleinen Blase gehalten wird. Bei Verwendung von Gefäßen (alternativ zu Metallschalen) ist darauf zu achten, daß kein Wasser mit abgossen wird.

6.5.8. Der Hals des Extraktionsgefäßes wird am Außenende mit ein wenig Lösungsmittelgemisch gespült, wobei dieses im Fettsammelbehälter aufgefangen wird; dabei ist darauf zu achten, daß das Lösungsmittelgemisch (4.6) nicht aus dem Extraktionsgefäß überläuft.

Das Lösungsmittel kann ganz oder teilweise aus dem Gefäß entweder durch Destillation oder Verdampfen gemäß 6.5.12 ausgetrieben werden.

- 6.5.9. Der Inhalt des Extraktionsgefäßes wird mit 5 ml Ethanol (4.2) versetzt; dabei wird zunächst der Gefäßhals an der Innenseite mit Ethanol abgespült und dieses anschließend gemäß 6.5.2 untergemischt.
- 6.5.10. Es wird eine zweite Extraktion unter Wiederholung der Arbeitsgänge 6.5.3 bis 6.5.8 durchgeführt, dabei jedoch nur 15 ml Diethylether (4.4) und 15 ml Petroleumbenzin (4.5) verwendet; die Innenseite des Extraktionsgefäßhalses wird dabei mit Ether abgespült. Wenn notwendig, wird die Trennungslinie zwischen den beiden Schichten bis zur Mitte des Gefäßhalses eingestellt, damit das Lösungsmittel möglichst vollständig abgossen werden kann.
- 6.5.11. Es wird eine dritte Extraktion unter erneuter Wiederholung der Arbeitsgänge 6.5.3 bis 6.5.8 durchgeführt, wobei jedoch nur 15 ml Diethylether (4.4) und 15 ml Petroleumbenzin (4.5) verwendet werden; die Innenseite des Extraktionsgefäßhalses wird dabei mit Ether abgespült. Wenn notwendig, wird die Grenzfläche zwischen den beiden Phasen bis zur Mitte des Gefäßhalses eingestellt, damit das Lösungsmittel möglichst vollständig abgossen werden kann.
- Bei Magermilch kann auf die dritte Extraktion verzichtet werden.
- 6.5.12. Die Lösungsmittel (einschließlich Ethanol) werden aus dem Gefäß möglichst restlos abdestilliert bzw. aus dem Kochbecher oder der Schale durch Verdampfen (5.3) ausgetrieben, wobei vor der Destillation die Innenseite des Gefäßhalses mit ein wenig Lösungsmittelgemisch (4.6) abgespült wird.
- 6.5.13. Das Fettsammelgefäß wird (in Seitenlage zwecks leichterer Abführung der Lösungsmittelreste) im Trockenschrank (5.4) eine Stunde auf einer konstanten Temperatur gehalten. Anschließend wird es aus dem Trockenschrank genommen und in dem Raum, in dem die Wägung erfolgt (nicht in einem Exsikkator, jedoch vor Staub geschützt), auf Raumtemperatur abkühlen gelassen (bei Glasgefäßen mindestens 1 Stunde, bei Metallschalen mindestens 1/2 Stunde); anschließend wird auf 0,1 mg genau gewogen.
- Das Gefäß darf unmittelbar vor der Wägung nicht abgewischt werden. Das Gefäß wird mit Hilfe von Zangen auf die Waage gestellt; dabei ist auf gleichbleibende Temperatur zu achten.
- 6.5.14. Der Arbeitsgang 6.5.13 wird so lange wiederholt, bis das Gewicht des Fettsammelgefäßes um höchstens 0,5 mg zurückgeht oder zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wägungen ansteigt. Als Gewicht des Fettsammelgefäßes mit dem Extrakt wird der niedrigste Meßwert herangezogen.
- 6.5.15. Dem Fettsammelgefäß werden 25 ml Petroleumbenzin zugegeben, um zu prüfen, ob der Extrakt restlos löslich ist. Das Gefäß wird vorsichtig unter Schwenken erwärmt, bis alles Fett gelöst ist.
- Ist der Extrakt in Petroleumbenzin restlos löslich, so wird als Masse des Fetts die Differenz zwischen der Anfangs- (6.4) und der Endmasse des Gefäßes mit dem Extrakt (6.5.14) herangezogen.
- 6.5.16. Ist der Extrakt in Petroleumbenzin nicht restlos löslich oder bestehen darüber Zweifel, wird das Fett durch mehrmaliges Spülen mit warmem Petroleumbenzin restlos aus dem Gefäß ausgezogen.
- Unlösliche Stoffe vollständig absetzen lassen und das Petroleumbenzin vorsichtig ohne Mitreißen der unlöslichen Stoffe abkippen. Dieser Arbeitsgang wird dreimal wiederholt, wobei die Innenseite des Gefäßhalses mit Petroleumbenzin abgespült wird.
- Zum Schluß wird das obere Ende des Gefäßes außen mit Lösungsmittelgemisch abgespült, wobei kein Lösungsmittel über die Außenwand des Gefäßes fließen darf. Das Petroleumbenzin wird aus dem Gefäß durch einstündiges Verdampfen im Trockenschrank ausgetrieben. Anschließend wird abkühlen gelassen und gemäß 6.5.13 und 6.5.14 gewogen.
- Als Masse des Fetts wird die Differenz zwischen der nach 6.5.14 bestimmten Masse und dieser endgültigen Masse angesehen.

7. AUSWERTUNG

7.1. Berechnung

Der Fettgehalt in Prozenten wird nach folgender Formel berechnet:

$$F = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100$$

Hierin bedeuten:

F = Fettgehalt,

m_0 = Probeneinwaage (6.2) in Gramm,

m_1 = Masse des Fettsammelgefäßes mit Extrakt, bestimmt nach 6.5.14, in Gramm,

m_2 = Masse des vorbereiteten Fettsammelgefäßes oder, bei Auftreten unlöslicher Stoffe, Masse des Fettsammelgefäßes mit unlöslichem Rückstand, bestimmt nach 6.5.16, in Gramm,

m_3 = Blindwert des Fettsammelgefäßes (6.3) mit Extrakt, bestimmt nach 6.5.14, in Gramm,

m_4 = Blindwert (6.3) des vorbereiteten Fettsammelgefäßes (6.4) oder, bei Auftreten unlöslicher Stoffe, Masse des Fettsammelgefäßes mit unlöslichem Rückstand, bestimmt nach 6.5.16, in Gramm.

Das Ergebnis wird auf 0,01 % genau protokolliert.

7.2. Zuverlässigkeit**7.2.1. Wiederholbarkeit (r)**

- bei Vollmilch und teilentrahmter Milch: 0,02 g Fett pro 100 g Produkt,
- bei Magermilch: 0,01 g Fett pro 100 g Produkt.

7.2.2. Vergleichbarkeit (R)

- bei Vollmilch: 0,04 g Fett pro 100 g Produkt,
- bei teilentrahmter Milch: 0,03 g Fett pro 100 g Produkt,
- bei Magermilch: 0,025 g Fett pro 100 g Produkt.

III. BESTIMMUNG DES GESAMTGEHALTS AN FETTFREIER TROCKENMASSE**1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH**

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts wärmebehandelter Milch an fettfreier Trockenmasse.

2. BEGRIFFSBESTIMMUNG UND BERECHNUNG

Der Gesamtgehalt an fettfreier Trockenmasse wird als Massenanteil in Prozenten angegeben. Der Gehalt an fettfreier Trockenmasse ist definiert als: Trockenmassegehalt (vgl. Abschnitt I) minus Fettgehalt (vgl. Abschnitt II).

IV. BESTIMMUNG DES GESAMTSTICKSTOFFGEHALTS DER MILCH**1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH**

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts von wärmebehandelter Vollmilch, teilentrahmter Milch und Magermilch.

2. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Gesamtstickstoffgehalt: Darunter ist der mit der beschriebenen Methode nach Kjeldahl bestimmte Stickstoffgehalt, ausgedrückt in Massenprozent, zu verstehen.

3. KURZBESCHREIBUNG

Eine Milchprobeneinwaage wird mit konzentrierter Schwefelsäure, Kaliumsulfat und in Gegenwart von Kupfer-(II)-Sulfat als Katalysator aufgeschlossen. Dabei wird der Aminostickstoff des Eiweißes in Ammoniumsulfat übergeführt. Durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung wird Ammoniak freigesetzt, der durch Destillation in eine Borsäurevorlage übergetrieben wird. Diese wird mit einer Säurelösung titriert.

4. REAGENZIIEN**4.1. Kaliumsulfat (K_2SO_4)****4.2. Kupfersulfatlösung.** Es werden 5,0 g Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) in Wasser gelöst und in einem Meßkolben auf 100 ml (bei 20 °C) aufgefüllt.**4.3. Schwefelsäure (H_2SO_4),** Massenanteil mindestens 98 %.**4.4. Natriumhydroxidlösung,** Massenanteil 47 %, 704 g NaOH/l (20 °C).

Anmerkung: Es kann auch eine weniger stark konzentrierte Natriumhydroxidlösung verwendet werden, z. B. Massenanteil 40 %, 572 g/l, 20 °C oder Massenanteil 30 %, 399 g/l, 20 °C.

4.5. Borsäurevorlage. 40 g Borsäure (H_3BO_3) werden in 1 l heißem Wasser gelöst, abkühlen gelassen und in einer Borsilikatglasflasche aufbewahrt.**4.6. Indikatorlösung.** 0,01 g Methylrot, 0,02 g Bromothymolblau und 0,06 g Bromokresolgrün werden in 100 ml Ethanol gelöst. Die Lösung ist in einer verschlossenen braunen Flasche im Dunkeln und kühl aufzubewahren.**4.7. Titrierstandardlösung**

c ($1/2 H_2SO_4$) oder c (HCl) = 0,1 mol/l, auf 0,0001 mol/l genau eingestellt.

- 4.8. **Stickstofffreie Saccharose**
- 4.9. **Ammoniumsalz**, rein, z. B. Ammoniumoxalat $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ oder Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 4.10. **Tryptophan** ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), **Phenacetin** ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{CH}_2\text{CONH}_2$) oder Lysinmono- oder -di-hydrochlorid ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ oder $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$).
- Anmerkung:* Die unter 4.9 und 4.10 aufgeführten Reagenzien sollen reiner als analysenrein vorliegen. Es sollte nach Möglichkeit zertifiziertes Ammoniumsalz (4.9) verwendet werden.

5. GERÄTE UND HILFSMITTEL

Übliche Laborausrüstung, insbesondere:

- 5.1. **Kjeldahl-Kolben**, 500 ml Nenninhalt.
- 5.2. **Geeignete Siedesteinchen**, z. B. Glaskügelchen mit etwa 5 mm Durchmesser, Hengargranulat, Bimsstein.
- 5.3. **Bürette oder automatische Pipette**, zum Abmessen von 1,0 ml.
- 5.4. **Meßbecher mit Teilstrichen**, aus Glas, Nenninhalt 50, 100 und 250 ml.
- 5.5. **Aufschlußapparat** (Schräglage etwa 45°), mit Elektroheizung oder Gasbrennern, bei denen eine Erhitzung der Kolben über den Flüssigkeitsspiegel hinaus ausgeschlossen ist, mit Rauchabzug.
- 5.6. **Destillierapparat**, aus Borsilikatglas, geeignet für Kjeldahl-Kolben (5.1), bestehend aus einem wirksamen Destillierkopf, angeschlossen an einem wirksamen Kühler mit geradem Innenrohr und Auslaßrohr am unteren Ende; Verbindungsschlauch und Stopfen (s) müssen dicht schließen und vorzugsweise aus Neoprengummi gefertigt sein.
- 5.7. **Pipette oder automatische Pipette**, zum Abmessen von 0,10 ml.
- 5.8. **Erlenmeyerkolben**, 500 ml Inhalt, mit Graduierung bei 200 ml.
- 5.9. **Bürette**, 50 ml Inhalt, 0,1-ml-Graduierung, maximaler Fehler $\pm 0,05$ ml.
- 5.10. **Lupe**, zum Ablesen der Bürette (5.9).
- 5.11. **pH-Meßgerät**
- 5.12. **Automatische Bürette**

6. VERFAHREN

- 6.1. Der Kjeldahl-Kolben (5.1) wird mit Siedesteinchen (5.2) (oder z. B. 3 Glaskügelchen), 15 g Kaliumsulfat (4.1), 1,0 ml Kupfersulfatlösung (4.2), etwa 5 g der Milchprobe (auf 0,001 g genau eingewogen) und 25 ml Schwefelsäure (4.3) beschickt. Mit der Säure werden Reste von Kupfersulfatlösung, Kaliumsulfat oder Milch vom Kolbenhals abgespült; anschließend wird der Kolbeninhalt vorsichtig vermischt.

Anmerkung: Da die organischen Verbindungen beim Kochen Schwefelsäure verbrauchen, sind bei Milch mit einem Massenanteil von über 5% Fett 30 ml H_2SO_4 (4.3) anstatt 25 ml für den Aufschluß zu verwenden. Gleiches gilt für den Blindversuch.

- 6.2. Jeder Kjeldahl-Kolben wird mit dem Destillierapparat (5.5) erwärmt, und zwar zunächst ganz vorsichtig, damit der ganze schwarze Schaum in der Blase zurückbleibt. Nachdem das anfängliche Schäumen aufgehört und sich reichlich weißer Dampf gebildet hat, wird hochgekocht (der Säuredampf kondensiert auf halber Höhe des Kolbenhalses), bis keine schwarzen Partikel mehr zurückbleiben und der Aufschluß eine klare blaßgelbe Farbe angenommen hat. Anschließend eineinhalb Stunden lang leicht siedelassen. Folgende Voraussetzungen sind einzuhalten:
- a) Es darf höchstens eine Stunde vergehen, bis der Aufschluß eine klare Farbe angenommen hat. Der Aufschluß darf insgesamt höchstens 2,5 Stunden dauern. Wenn mehr als eine Stunde vergeht, bis der Aufschluß klar ist, muß die gesamte Aufschlußzeit entsprechend verlängert werden.
 - b) Das zugegebene Kaliumsulfat fördert den Aufschluß durch Erhöhung der Siedetemperatur des Gemisches. Beträgt der H_2SO_4 -Rest nach Ablauf der Aufschlußzeit weniger als etwa 15 ml, so ist eventuell mit einem Stickstoffverlust infolge einer lokalen Überhitzung zu rechnen. Bei Verwendung eines Gasbrenners ist der Kolben auf einer Platte aus wärmeisolierendem Material mit kreisförmiger Öffnung zu erhitzen, wobei der Durchmesser dieser Öffnung gerade so groß sein soll, daß die offene Flamme nur den Teil des Kolbens, über dem die Flüssigkeit steht (5.5), berührt.

- c) Gelangen schwarze Partikel in den Kolbenhals und werden nicht gleich zu Beginn des Hochkochens von dem Säurerückfluß in die Blase zurückgespült (was durch Schwenken des Kolbens unterstützt werden kann), so ist der Kolben lange genug abkühlen zu lassen und mit ein wenig Wasser sorgfältig zu spülen. Anschließend wird der Aufschluß wie vorstehend beschrieben fortgesetzt.
- 6.3. Nach dem Abkühlen wird jedem Kjeldahl-Kolben 300 ml Wasser (vgl. Anmerkung) zugesetzt und damit der Kolbenhals sorgfältig gespült; anschließend wird der Inhalt gründlich vermischt, bis die ausgefallenen Kristalle gelöst sind. Einige Siedesteinchen (5.2) werden zugegeben, damit ein gleichmäßiges Sieden gewährleistet ist. Schließlich wird die Probe mit 70 ml Natriumhydroxidlösung (4.4) (vgl. Anmerkung) versetzt, wobei die Lösung vorsichtig über den geneigten Kolbenhals einzugießen ist, so daß sie am Grunde der Blase eine Schicht bildet; das obere Ende des Halses darf von der Natriumhydroxidlösung nicht benetzt werden.
- Anmerkung:* Wasser und Natriumhydroxidlösung müssen insgesamt ein Volumen von 370 ml ergeben, damit etwa 150 ml Destillat anfällt, bevor das unregelmäßige Sieden (Stoßen) einsetzt (6.4).
- Daher muß bei Verwendung einer größeren Menge Natriumhydroxidlösung mit einem Massenanteil von weniger als 47% die zugesetzte Wassermenge entsprechend verringert werden. So muß bei Verwendung von 85 ml 40%iger oder 125 ml 30%iger Natriumhydroxidlösung die zugesetzte Wassermenge 285 ml bzw. 245 ml betragen.
- 6.4. Jeder Kjeldahl-Kolben wird sofort an einem Destillationsapparat (5.6) angeschlossen. Es muß gewährleistet sein, daß der Kühllvorstoß in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml Borsäurelösung (4.5) und 0,20 ml (5 bis 6 Tropfen) Indikatorlösung (4.6) eintaucht. Der Inhalt jedes Kjeldahl-Kolbens wird gründlich durchmischt und allmählich zum Sieden gebracht, um ein Übersäumen zu vermeiden. Nach Austreiben von 100 bis 125 ml Destillat werden die einzelnen Erlenmeyerkolben etwas abgesenkt, damit der Kühllvorstoß etwa 40 mm über der 200-ml-Marke steht. Die Destillation wird so lange fortgesetzt, bis das unregelmäßige Sieden (Stoßen) einsetzt und dann sofort abgebrochen. Kjeldahl-Kolben abnehmen und Kühllvorstoß mit etwas Wasser spülen, wobei der Spülablauf im Erlenmeyerkolben aufgefangen wird. Dabei sind folgende Anforderungen zu erfüllen:
- a) Der Destillationsverlauf ist so zu wählen, daß bei Einsetzen des unregelmäßigen Kochens (Stoßens) etwa 150 ml Destillat ausgetrieben sind und in jedem Erlenmeyerkolben noch etwa 200 ml verbleiben.
 - b) Der Wirkungsgrad der Kühler ist so zu wählen, daß die Temperatur des Erlenmeyerkolben-Inhalts während der Destillation höchstens 25 °C beträgt.
- 6.5. Jedes Destillat wird mit Standardlösung (4.7) unter Verwendung eines pH-Meßgeräts und einer automatischen Bürette auf einen pH-Wert von $4,6 \pm 0,1$ eingestellt. Durch Zusatz eines Indikators kann geprüft werden, ob Korrektur titriert wird. Mit der Bürette wird auf 0,01 ml genau titriert. Dazu wird ein Vergrößerungsglas (5.10) verwendet; Parallaxenfehler sind zu vermeiden.
- Die Titration kann mit Hilfe eines einzigen Indikators durchgeführt werden. Sie erfolgt, bis die Farbe des Destillats der einer Lösung entspricht, die kurz vorher aus 150 ml Wasser mit 50 ml der Borsäurelösung und 0,2 ml des im Erlenmeyerkolben (5.8) enthaltenen Indikators aufbereitet wurde.
- 6.6. Es wird ein Blindversuch gemäß den Arbeitsvorschriften 6.1 bis 6.5 einschließlich durchgeführt, wobei bei diesem Verfahren anstelle der Milchprobe 5 ml destilliertes Wasser mit etwa 0,1 g Saccharose (4.8) zu verwenden ist.
- Anmerkung:* Zur Titration des Blinddestillats ist nur eine ganz geringe Menge Titrierlösung (4.7) erforderlich.
- 6.7. Die Richtigkeit der Durchführung ist mit Hilfe zweier Wiederfindungsversuche gemäß den Arbeitsvorschriften 6.1 bis 6.5 einschließlich zu prüfen.
- 6.7.1. Das Verfahren wird mit einer Einwaage von 0,15 g Ammoniumoxalat oder -sulfat (4.9) auf 0,001 g genau sowie 0,1 g Saccharose (4.8) auf etwaige Stickstoffverluste infolge lokaler Überhitzung oder Leckverlusten während der Destillation geprüft.
- Der Anteil des wiedergefundenen Stickstoffs muß 99 bis 100% betragen.
- Niedrigere oder höhere Ergebnisse weisen auf methodische Fehler und/oder auf ungeeignete Konzentration der Standardlösung (4.7) hin.
- 6.7.2. Das Aufschlußverfahren wird durch Verwendung einer Einwaage von 0,20 g reinem Tryptophan, 0,35 g Phenacetin oder 0,20 g Lysinhydrochlorid (4.10) daraufhin geprüft, ob der gesamte Eiweißstickstoff freigesetzt wird. Die Einwaage ist jeweils auf 0,001 g genau vorzunehmen. Die Stickstoffauswaage muß mindestens 98 bis 99% betragen.

7. UNFALLVERHÜTUNGSVORSCHRIFTEN

Beim Umgang mit konzentrierter Schwefelsäure und Natriumhydroxid sowie mit Kjeldahl-Kolben sind immer Laborkittel, Sicherheitsschutzbrille und säurefeste Handschuhe zu tragen.

Während der Destillation dürfen die Kjeldahl-Kolben niemals unbeaufsichtigt bleiben. Bei zu heftigem Stoßen in den Kolben ist die Destillation aus Sicherheitsgründen sofort abbrechen. Fällt der Strom für über 2 bis 3 Minuten aus, so ist das Sammelgefäß tiefer zu stellen, so daß der Destilliervorstoß nicht mehr in die Flüssigkeit eintaucht.

8. AUSWERTUNG

8.1. Berechnung

Der Stickstoffgehalt (W_N) in Gramm Stickstoff je 100 g Produkt wird nach folgender Formel berechnet:

$$W_N = \frac{1,40 (V - V_0) c}{m}$$

Hier bedeuten:

W_N = Stickstoffgehalt,

V = Volumen der bei der Bestimmung verwendeten Standardtitrierlösung in ml,

V_0 = Volumen der beim Blindversuch verwendeten Standardtitrierlösung in ml,

c = Konzentration der Standardtitrierlösung (4.7) in mol/l,

m = Gewicht der Probeneinwaage in g.

Das Ergebnis ist auf 0,001 g je 100 g zu runden.

8.2. Zuverlässigkeit

8.2.1. *Wiederholbarkeit* (r): 0,007 g je 100 g.

8.2.2. *Vergleichbarkeit* (R): 0,015 g je 100 g.

9. MODIFIZIERTE VERFAHREN

9.1. Anstelle des Aufschlußgeräts und der Kjeldahl-Kolben gemäß 5.5 und 5.1 wird eine Aufschlußapparatur mit zylindrischen Gefäßen verwendet. In diesem Fall muß zur Bestimmung potentieller Fehlerquellen jeder Platz einzeln geprüft werden (6.7).

9.2. Wasserdampfdestillation anstelle der direkten Erwärmung der Kolben (6.4). Läßt das Gerät die Verwendung von destilliertem Wasser nicht zu, so ist dafür Sorge zu tragen, daß das Wasser keine Säure oder flüchtigen alkalischen Bestandteile enthält.

9.3. Anstelle einer Einwaage von 5 g (6.1) kann eine Probe von 1 g Milch (Semimakromethode nach Kjeldahl) verwendet werden, sofern

- die Anteile der zur Mineralisierung (6.1) verwendeten Reagenzien H_2SO_4 , $CUSO_4 \cdot 5 H_2O$, K_2SO_4 entsprechend ($1/5$) verringert werden;
- die Gesamtaufschlußzeit (6.2) auf 75 Minuten gesenkt wird;
- der Anteil von Natriumhydroxidlösung (6.3) im gleichen Verhältnis ($1/5$) gesenkt wird;
- eine Standardsäurelösung (4.7) geringerer Konzentration (0,02—0,03 mol/l) verwendet werden muß.

Anmerkung: Die Verwendung eines oder mehrerer dieser wahlfreien Verfahren ist zulässig, sofern die gemäß dieser Arbeitsvorschrift festgesetzten Wiederholbarkeitsanforderungen (8.2.1) sowie die Anforderungen an die Richtigkeit in 2 Kontrolluntersuchungen (6.7) erfüllt sind.

V. BESTIMMUNG DES EIWEISSGEGHALTS

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung des Eiweißgehalts wärmebehandelter Milch (Artikel 3 Buchstabe A Nummer 3 der Richtlinie 85/397/EWG).

2. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Eiweißgehalt: Darunter ist der durch Multiplikation des Stickstoffgehalts (ausgedrückt in Massenprozenten und bestimmt nach den unter IV beschriebenen Verfahren) mit einem geeigneten Faktor (vgl. 3) erzielte Wert zu verstehen.

3. BERECHNUNG

Eiweißgehalt der Milch in Massenprozenten = $6,38 \times$ Gesamtstickstoffgehalt der Milch in Prozent.

VI. BESTIMMUNG DER DICHTEN**1. UMFANG UND ANWENDUNGSBEREICH**

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das amtliche Verfahren zur Bestimmung der Dichte von wärmebehandelter Vollmilch, teilentrahmter Milch und Magermilch bei 20 °C.

2. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Die Dichte von Milch ist der Quotient aus der Masse eines bestimmten Volumens Milch bei 20 °C und der Masse des gleichen Volumens Wasser bei 20 °C.

3. KURZBESCHREIBUNG

Die Dichte von Milch bei 20 °C wird mit einem Thermoaräometer gemessen.

4. GERÄTE UND HILFSMITTEL

Übliche Laborausrüstung, insbesondere:

4.1. Thermoaräometer

Das Thermoaräometer zur Bestimmung der Dichte besteht aus einem Glasschwimmer, der am unteren Ende breit und schwer ist. An seinem oberen Ende sitzt ein koaxial angeordneter Glasstengel, der oben geschlossen ist.

Der Glasschwimmer enthält das zur Einjustierung der Thermoaräometermasse notwendige Gewicht (Blei, Quecksilber usw.). Der Stengel verfügt über eine Meßskala von 1,025 bis 1,035 g/ml.

Das Thermoaräometer muß pyknometrisch geprüft werden; dafür ist ein Pyknometer mit etwa 100 ml Inhalt und ein Präzisionsthermometer zu verwenden.

4.2. Standzylinder (Glas oder rostfreier Stahl).

Mindestabmessungen wie folgt:

- Innendurchmesser ca. 35 mm,
- Innenhöhe ca. 225 mm.

4.3. Wasserbad, einstellbar auf $20 \pm 0,1$ °C.**4.4. Wasserbad, einstellbar auf 40 ± 2 °C.****4.5. Thermometer, Teilung 0,5 °C.****5. VERFAHREN**

5.1. Zur guten Verteilung des Fetts wird die Probe durch Stürzen gründlich durchmischt, ins Wasserbad (4.4) übergeführt, auf 40 °C erwärmt und 5 Minuten auf dieser Temperatur gehalten. Anschließend wird die Probe durch vorsichtiges Stürzen erneut gründlich durchmischt, damit sich das Fett gleichmäßig verteilt. Danach im zweiten Wasserbad (4.3) auf 20 °C abkühlen.

5.2. Die Probe wird durch vorsichtiges Stürzen ohne Schaum- oder Blasenbildung gründlich durchmischt. Die Milch wird in einen Standzylinder (4.2) gegossen, der dabei schräg zu halten ist, um eine Schaum- oder Blasenbildung zu vermeiden. Es ist so viel von der Milchprobe einzugießen, daß beim Aufsetzen des Thermoaräometers (4.1) etwas davon aus dem Standzylinder überfließt. Das Thermoaräometer wird vorsichtig in die Milch eingeführt und nach Einstellen der Gleichgewichtslage frei schwimmen gelassen. Dabei muß der Standzylinder senkrecht stehen. Das Thermoaräometer muß sich in der Mitte der Flüssigkeitssäule befinden und darf die Zylinderwandung nicht berühren.

5.3. Nach Einstellen der Gleichgewichtslage sind die Spindelgrade am oberen Wulstrand abzulesen.

5.4. Sofort nach dem Ablesen des Thermoaräometers ist das Thermometer einzuführen und die Temperatur auf 0,5 °C genau abzulesen. Die Temperaturabweichung von 20 °C darf nicht mehr als ± 2 °C betragen.

6. TEMPERATURKORREKTUR

6.1. Beträgt die Temperatur der Milchprobe bei der Bestimmung der Dichte nicht exakt 20 °C, so muß das Ergebnis in der Weise korrigiert werden, daß zu der bestimmten Dichte für jedes Grad Celsius über 20 °C 0,0002 addiert bzw. davon für jedes Grad Celsius unter 20 °C 0,0002 subtrahiert werden. Diese Korrektur gilt nur für den Fall, daß die Temperatur um höchstens 5 °C von der Solltemperatur von 20 °C abweicht.

7. ERGEBNISBERECHNUNG

Die Dichte der Probe wird in g/ml entrahmter Milch bei 20 °C entsprechend der nachfolgenden Formel ausgedrückt:

$$\frac{1\,000 \cdot mv - MG \cdot mv}{1\,000 - \frac{MG \cdot mv}{0,92}} = \frac{0,92 \, mv (1\,000 - MG)}{920 - MG \cdot mv}$$

Dabei bedeuten:

mv = die Dichte der Probe, abgelesen auf dem Thermoaräometer (5.4) in g/l,

MG = Fettgehalt der Probe in g/l,

0,92 = Dichte von Fett.

8. ZUVERLÄSSIGKEIT

8.1. **Wiederholbarkeit (r):** 0,0003 g/ml.

8.2. **Vergleichbarkeit (R):** 0,0015 g/ml.

Anlage

zu Anhang II

ALTERNATIVVERFAHREN UNTER VERWENDUNG VON EXTRAKTIONSROHREN MIT HEBER ODER WASHFLASCHENEINSATZ**A.1. VERFAHREN****A.1.1. Vorbereitung der Probe für die Untersuchung**

Vgl. 6.1.

A.1.2. Probeneinwaage

Arbeitsgang wie 6.2, jedoch unter Verwendung von Extraktionsrohren nach 5.6. Die Probeneinwaage muß möglichst vollständig auf den Boden des Extraktionsrohres gelangen.

A.1.3. Blindversuch

Vgl. 6.3.

A.1.4. Vorbereitung des Fettsammelgefäßes

Vgl. 6.4.

A.1.5. Bestimmung

A.1.5.1. Die vorbehandelte Probeneinwaage am Boden des Gefäßes wird mit 2 ml Ammoniaklösung (4.1) oder einer entsprechenden Menge einer stärker konzentrierten Ammoniaklösung versetzt und damit gründlich vermischt. Sofort nach der Ammoniakzugabe wird die Bestimmung durchgeführt.

A.1.5.2. Die Probe wird mit 10 ml Ethanol (4.2) versetzt und am unteren Ende des Rohres durch vorsichtiges Schütteln gründlich vermischt. Wahlweise zwei Tropfen Kongorot- oder Kresolrot-Lösung (4.3) zugeben.

A.1.5.3. Die Probe wird mit 25 ml Diethylether (4.4) versetzt. Anschließend wird das Extraktionsrohr mit einem wassergesättigten Korkstopfen oder einem befeuchteten Stopfen (5.6) verschlossen und eine Minute lang unter mehrmaligem Stürzen gründlich, aber vorsichtig geschüttelt (damit sich keine bleibenden Emulsionen bilden). Das Rohr wird gegebenenfalls unter fließendem Wasser abkühlen gelassen, anschließend der Korken bzw. Stopfen vorsichtig entfernt und dieser sowie der Hals des Rohres mit ein wenig Lösungsmittelgemisch (4.6) unter Verwendung der Waschflasche (5.8) abgespült, so daß das Spülmittel in das Rohr hineinfließt.

A.1.5.4. Die Probe wird mit 25 ml Petroleumbenzin (4.5) versetzt. Anschließend wird das Rohr mit dem erneut (durch Eintauchen in Wasser) befeuchteten Korken oder Stopfen verschlossen und 30 Sekunden lang vorsichtig gemäß A.1.5.3 geschüttelt.

A.1.5.5. Das geschlossene Rohr wird 1 bis 5 Minuten lang bei einer Drehzahl von 500 bis 600 min^{-1} (5.2) zentrifugiert. Steht keine Zentrifuge zur Verfügung (vgl. Anmerkung zu 5.2), das geschlossene Rohr im Gestell (5.7) mindestens 30 Minuten lang stehen lassen, bis sich der Überstand geklärt und vollständig von der wäßrigen Schicht getrennt hat. Wenn notwendig, wird das Rohr unter fließendem Wasser gekühlt.

A.1.5.6. Der Korken oder Stopfen wird vorsichtig entfernt und ebenso wie der Hals des Rohres mit ein wenig Lösungsmittelgemisch so gespült, daß das Spülmittel in das Rohr hineinfließt.

A.1.5.7. Einen Heber oder einen Waschflascheneinsatz in das Rohr einsetzen und den Vorstoß des Einsatzes soweit einführen, bis die Öffnung etwa 3 mm über der Grenzschicht zwischen den beiden Schichten steht. Der Vorstoß soll parallel zur Achse des Extraktionsrohres zu liegen kommen.

Der Überstand wird vorsichtig in das vorbereitete, mit Siedesteinchen (5.10) beschickte Fettsammelgefäß (6.4) abgehebert. Bei Verwendung von Kolben (alternativ zu Metallschalen) ist darauf zu achten, daß kein Wasser mitgerissen wird. Das Austrittsrohr des Einsatzes wird mit ein wenig Lösungsmittelgemisch gespült und dieses im Fettsammelgefäß aufgefangen.

A.1.5.8. Der Einsatz wird vom Hals des Extraktionsrohres gelöst, etwas herausgenommen und der untere Teil des Vorstoßes mit ein wenig Lösungsmittelgemisch abgespült. Die Armatur wird wieder eingesetzt und das Spülmittel in das Fettsammelgefäß abgehebert.

Das Austrittsrohr des Einsatzes wird mit ein wenig Lösungsmittelgemisch abgespült und dieses im Gefäß aufgefangen. Das Lösungsmittel kann ganz oder teilweise aus dem Fettsammelgefäß entweder durch Destillation oder Verdampfen gemäß 6.5.12 ausgetrieben werden.

- A.1.5.9. Der Einsatz wird nochmals am Hals gelöst, etwas herausgenommen und der Rohrinhalt mit 5 ml Ethanol versetzt; dabei wird zunächst der Einsatz mit Ethanol abgespült; der Inhalt wird wie in A.1.5.2 beschrieben vermischt.
- A.1.5.10. Es wird eine zweite Extraktion unter Wiederholung der Arbeitsgänge A.1.5.3 bis A.1.5.8 durchgeführt, dabei jedoch nur 15 ml Diethylether (4.4) und 15 ml Petroleumbenzin (4.5) verwendet. Der Ether wird im Anschluß an die vorangegangene Extraktion zum Spülen des Vorstoßes der vom Rohr gelösten Armatur verwendet.
- A.1.5.11. Es wird eine dritte Extraktion unter erneuter Wiederholung der Arbeitsgänge A.1.5.3 bis A.1.5.8 durchgeführt, wobei jedoch nur 15 ml Diethylether und 15 ml Petroleumbenzin verwendet werden und der Vorstoß wie in A.1.5.10 beschrieben abgespült wird.
- Bei Magermilch kann auf die dritte Extraktion verzichtet werden.
- A.1.5.12. Für das weitere Verfahren gelten die Arbeitsvorschriften 6.5.12 bis 6.5.16.
-