

KOYULAŞTIRILMIŞ SÜT VE SÜTTOZUNUN ANALİZ METODLARI TEBLİĞİ
(TEBLİĞ NO:2002/16)

Amaç

Madde 1- Bu Tebliğin amacı, 29/12/.2001 tarihli ve 24625 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan “Koyulaştırılmış Süt ve Süttozu Tebliği”nde belirtilen insan tüketimine sunulan kısmen veya tamamen koyulaştırılmış sütlerin ve süttozlarının analiz metodlarını belirlemektir.

Kapsam

Madde 2- Bu Tebliğ, “Koyulaştırılmış Süt ve Süttozu Tebliği”nde belirtilen koyulaştırılmış yüksek yağlı süt, koyulaştırılmış tam yağlı süt, koyulaştırılmış yarım yağlı süt, koyulaştırılmış yağsız süt, şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız süt, yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunun kimyasal analiz metodlarını kapsar.

Hukuki dayanak

Madde 3- Bu Tebliğ, 16/11/1997 tarihli ve 23172 mükerrer sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’ne göre hazırlanmıştır.

Analiz metodları

Madde 4- Analiz metodları, genel ilkeler EK - I’e uygun olarak aşağıdaki şekilde uygulanır:

a)Koyulaştırılmış yüksek yağlı süt, koyulaştırılmış tam yağlı süt, koyulaştırılmış yarım yağlı süt, koyulaştırılmış yağsız süt, şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız sütte kuru madde tayini EK - II’deki 1 inci metoda göre yapılır.

b) Yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunda rutubet tayini EK - II’deki 2 nci metoda göre yapılır.

c)Koyulaştırılmış yüksek yağlı süt, koyulaştırılmış tam yağlı süt, koyulaştırılmış yarım yağlı süt, koyulaştırılmış yağsız süt, şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız sütte yağ tayini EK - II’deki 3 üncü metoda, yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunda yağ tayini EK - II’deki 4 üncü metoda göre yapılır.

d)Şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız sütte sakaroz tayini EK - II’deki 5 inci metoda göre yapılır.

e)Yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunda EK - II’deki 6 ncı metoda göre yapılır.

f)Yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunda fosfotaz aktivitesi tayini EK - II’deki 7 veya 8 inci metoda göre yapılır.

Avrupa Birliği’ne uyum

Madde 5- Bu Tebliğ, 79/1067/EEC sayılı “Koyulaştırılmış Sütlerin ve Süttozlarının Analiz Metodları” hakkında Komisyon Direktifi dikkate alınarak, Avrupa Birliği’ne uyum çerçevesinde hazırlanmıştır. Bu Tebliğ, laboratuvarların ilgili mevzuatına uygun denenmiş ve bilimsel geçerliliği olan metodları kullanmasını engellemez. Avrupa Birliği ile olan ilişkilerde zorunlu olarak uygulanır.

Geçici Madde 1- Halen faaliyet gösteren ve bu Tebliğ kapsamında yer alan analiz metodlarını kullanan laboratuvarlar, 1 yıl içerisinde bu Tebliğ hükümlerine uymak zorundadırlar.

Yürürlük

Madde 6- Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

Yürütme

Madde 7- Bu Tebliğ hükümlerini Sağlık Bakanı ile Tarım ile Köyışleri Bakanı yürütür.

EK - I

Genel İlkeler

1. Numunenin analize hazırlanması:

1.1. Koyulaştırılmış yüksek yağlı süt, koyulaştırılmış tam yağlı süt, koyulaştırılmış yarım yağlı süt, koyulaştırılmış yağsız sütler için;

Kapalı durumdaki kap çalkalanır ve alt üst edilir. Kap açılır ve kaptan kaba birkaç kez aktarılarak karıştırılır, yavaşça hermetik kapatılabilen ikinci bir kaba alınır. Kabin kenarlarına ve dibine yapışmış yağ ve süt kalıntıları ile numunenin iyice karışması sağlanır. Kap kapatılır. Eğer numune içeriği homojen değilse kap 40 °C 'lik su banyosuna alınır. Her 15 dakikada bir kuvvetlice çalkalanır. 2 saat sonunda su banyosundan alınır ve oda sıcaklığına soğutulur. Kapak açılır ve kabin içeriği bir kaşık veya spatula yardımı ile iyice karıştırılır. Eğer örneğin yağı ayrılıyorsa, o örnek analize alınmaz. Örnek serin bir yerde saklanır.

1.2. Şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız sütler için;

1.2.1. Metal kutular: kapalı kutu 30-40 °C'de su banyosunda yaklaşık 30 dakika bekletilir. Kutu açılır ve spatül veya kaşık yardımı ile üst ve alt kısımların tam karıştırılması için aşağı, yukarı ve dairesel hareketlerle iyice karıştırılır. Kutunun kenarlarında ve dibinde kalan sütün numuneye geçmesi sağlanır. Mümkün olduğunca içindekilerin tümü hava geçirmeyen kapağı olan bir kaba aktarılır. Kapak kapatılır ve serin bir yerde saklanır.

1.2.2. Tüpler: Tüpün dip kısmı kesilir ve içeriği hava geçirmeyen kapalı bir kaba boşaltılır. Sonra tüp uzunlamasına kesilir ve iç yüzeye yapışmış tüm materyaller kazınarak kaba aktarılır. Tüm içerik iyice karıştırılır ve kap serin bir yerde saklanır.

1.3. Yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozu için;

Numune, kendi hacminin iki katı kapasitede, temiz, kuru, hava geçirmez kapağı olan bir kaba aktarılır. Kapak hemen kapatılır, süttozu iyice sallanarak ve alt üst edilerek karıştırılır. Numunenin hazırlanması sırasında süttozunun rutubet almasını engellemek için hava ile temas etmemesine dikkat edilir.

2. Reaktifler

2.1. Su

2.1.1. Çözdürme, seyreltme veya yıkama amaçlı kullanılan sularda; distile su veya eşdeğer saflıkta demineralize su kullanılır.

2.1.2. Daha farklı bir nitelendirme yapılmamışsa, çözdürme, çözelti veya seyreltme ifadesinden suda çözünme, sulu çözelti veya suyla seyreltme anlaşılar.

2.2. Kimyasallar

Bütün kimyasallar eğer aksi belirtilmiyorsa analitik saflıkta olmalıdır.

3. Cihaz

3.1. Cihaz Listesi

Ekipman listesi sadece özel kullanımı olan ve belirli özellikleri olan aletleri içermektedir.

3.2. Analitik terazi, en az 0.1 mg hassasiyette olmalıdır.

4. Sonuçların Açıklanması:

4.1. Yüzde hesabı

Aksi belirtilmediği sürece, sonuçlar laboratuvarlara getirilen örneğin kütlece yüzdesi olarak hesaplanır.

4.2. Sonuçların hassasiyeti

Kullanılan analizin gerektirdiği hassasiyette olmalıdır.

5. Rapor

Raporda, elde edilen sonuçla birlikte kullanılan analiz metodu da belirtilmelidir. Ayrıca analiz metodunda belirtilmeyen veya isteğe bağlı olan her türlü detay ve aynı zamanda elde edilen sonuçları etkileyebilen her türlü koşul yer almalıdır. Rapor, numunenin tam olarak tanımlanmasını sağlayan her türlü bilgiyi içermelidir.

EK –II

Analiz Metodları

Metod 1 : Kuru Madde Miktarı Tayini (99 °C Etüv)

1. Uygulama alanı ve amacı

Bu metodla, koyulaştırılmış yüksek yağlı süt, koyulaştırılmış tam yağlı süt, koyulaştırılmış yarım yağlı süt, koyulaştırılmış yağsız süt, şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız sütte kuru madde içeriği saptanır.

2. Tanım

Koyulaştırılmış sütlerin kuru madde içeriği: Belirtilen metodla tayin edilen kuru madde içeriğidir.

3. Prensiptir

Örneğin bilinen bir miktarı su ile seyreltilir, kum ile karıştırılır ve 99 ± 1 °C sıcaklıktaki etüvde kurutulur. Kurutma işleminden sonraki kütle, kuru maddenin kütlesidir ve örneğin kütlesinde yüzde olarak hesaplanır.

4. Çözeltiler

4.1. Hidroklorik asit ile işlem görmüş kuvars veya deniz kumu; tane büyüklüğü 500 mikron elekten geçen ve 180 mikron elekten kalabilen 0.18 ile 0.5 mm arasındaki deniz kumuna aşağıdaki kontrol testi uygulanmalıdır.

Yaklaşık 25 g kum 6.1'den 6.3'e kadar olan maddelerde tarif edildiği gibi etüv (5.3) içinde 2 saat ısıtılır. 5 mL su eklenir daha sonra etüvde tekrar 2 saat ısıtılır, soğutulur ve yeniden tartılır. İki kütle arasındaki fark 0.5 mg'ı geçmemelidir.

Eğer gerekirse, kum % 25'lik hidroklorik asit çözeltisi ile 3 gün boyunca ara sıra karıştırılarak işleme tabi tutulur. Daha sonra asit reaksiyon göstermeyinceye veya yıkama suyunda klor kalmayınca kadar su ile yıkanır. 160 °C'de kurutulur ve yukarıdaki şekilde tekrar test edilir.

5. Cihazlar ve malzemeler

5.1. Analitik terazi

5.2. Metal kaplar; tercihen nikel, alüminyum veya paslanmaz çelikten yapılmış ve bu kaplarla tam uyumlu gerektiğinde kolayca çıkarılabilen kapakları olan, 60-88 mm çapında ve yaklaşık 25 mm derinliğinde.

5.3. Atmosferik basınçlı etüv; iyi havalandırılabilen, sıcaklığı 99 ± 1 °C'ye termostatik olarak ayarlanabilen, sıcaklığı eşit dağıtan.

5.4. Desikatör; yeni aktive edilmiş silika jel veya dengi nem çekici bir madde ve nem belirleyici indikatör içeren.

5.5. Cam çubuklar; metal kaplar içerisine uyacak boyutta, bir ucu yassılaştırılmış.

5.6. Su banyosu, kaynatma özelliğinde

6. İşlem

6.1. Madde 5.2'de belirtilen kabın içine bir kısa cam çubuk (5.5) ve yaklaşık 25 g kum konur.

6.2. Kap ve içeriği kapak ile kapatılmaksızın etüve (5.3) kapak ile beraber konur ve 2 saat ısıtılır.

6.3. Kap, kapak ile kapatılıp, desikatöre (5.4) alınır. Oda sıcaklığına soğutulur ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır. (m_0)

6.4. Kap eğilerek kumun bir tarafa toplanması sağlanır. Temiz alan içine koyulaştırılmış süt örneğinden yaklaşık 3 g, şekerli koyulaştırılmış süt örneğinden yaklaşık 1.5 g alınır. Kapak kapatılır ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır. (m_1)

6.5. Kapak kaldırılıp, 5 mL su eklenir ve cam çubuk yardımı ile sıvılar ve kum karıştırılır. Çubuk karışımda bırakılır.

6.6. Su buharlaşana kadar kaplar, kaynar su banyosunda (5.6) bekletilir. Bu işlem genellikle 20 dakika kadar sürer. Kütle kuruyana kadar iyi havalandırarak çubukla ara sıra karıştırılmalıdır. Çubuk kabın içerisinde bırakılır.

6.7. Kap ve kapak etüvde 1.5 saat bırakılır.

6.8. Kapak kapatılarak, kap desikatöre (5.4) alınır. Oda sıcaklığına kadar soğutulur ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır.

6.9. Kap, kapak ile kapatılmadan kapak ile birlikte etüve konur ve 1 saat daha bırakılır.

6.10.Madde 6.8’de belirtilen işlemler tekrar edilir.

6.11.Son iki tartım arasındaki kütle farkı 0.5 mg’dan daha az veya kütlece artma olana kadar madde 6.9 ve 6.10’da tanımlanan işlemler tekrarlanır. Eğer kütlede artış meydana geliyorsa hesaplamada bulunan en düşük kütle kullanılır.

7. Sonuçların açıklanması

7.1. Formül ve hesaplama yöntemi

Kurumadde miktarı; aşağıdaki formülle örneğin kütleinde yüzde olarak hesaplanır:

$$\frac{(m_1 - m_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

m_0 = Kap, kapak ve kumun işlem 6.3’ten sonraki kütlesi, g

m_1 = Kap, kapak, kum ve örneğin kurutmadan önceki (6.4) kütlesi, g

m_2 = Kap, kapak, kum ve örneğin kurutmadan sonraki (6.11) kütlesi, g

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, her 100 g ürün için kuru maddesinde 0.2 gramı geçmemelidir.

8. Toplam süt kuru maddesi ve yağsız süt kuru maddesinin hesaplanması

8.1.Şekerli koyulaştırılmış sütlerin toplam süt kuru maddesi miktarı = Toplam kuru madde (EK-II, 1 nci metodla elde edilen)

– sakaroz miktarı (EK –II, 5 inci metodla elde edilen)

8.2. Şekerli koyulaştırılmış sütlerin yağsız süt kuru maddesi miktarı = Toplam kuru madde (EK –II, 1 nci metodla elde edilen) (sakaroz miktarı (EK –II, 5 inci metodla elde edilen) + yağ miktarı (EK –II, 3 üncü metodla elde edilen))

8.3.Şekersiz koyulaştırılmış sütlerin yağsız süt kuru maddesi miktarı = Toplam kuru madde (EK –II, 1 nci metodla elde edilen)

– yağ miktarı (EK -II, 3 üncü metodla elde edilen)

Metod 2: Nem Miktarının Tayini (102 °C Etüv)

1. Uygulama alanı ve amacı

Bu metodla,yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunun kurutulması sırasındaki kütle kaybı saptanır.

2. Tanım

Nem miktarı, belirtilen metodla kütle kaybının tayin edilmesidir.

3. Prensi

Analiz örneğinin atmosferik basınç altında 102 ± 1°C’lik etüvde sabit ağırlığa kadar kurutulduktan sonra, kalan kütlesi tayin edilir. Kütle kaybı, örneğin kütleinde yüzde olarak hesaplanır.

4. Cihaz ve malzemeler

4.1. Analitik terazi

4.2. Kaplar; tercihen nikel, alüminyum, paslanmaz çelik veya cam. Sıkıca kapanabilen kolayca açılan kapaklı, 60-80 mm çapında ve yaklaşık 25 mm derinliğinde.

4.3. Atmosferik basınçlı etüv; iyi havalandırılabilen, 102 ± 1°C’ye termostatik olarak ayarlanabilen, sıcaklığı eşit dağıtan.

4.4. Desikatör; yeni aktive edilmiş silika jel veya dengi nem çekici bir madde ve nem belirleyici indikatör içeren.

5. İşlem

5.1. Kap (4.2) ve kapağı açık olarak etüvde (4.3) yaklaşık bir saat tutulur.

5.2. Kap, kapak ile kapatılıp desikatöre (4.4) alınır. Oda sıcaklığına kadar soğutulur ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır. (m_0)

5.3. Yaklaşık 2 g deney örneği kaba alınır, kapağı kapatılır ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır. (m_1)

5.4. Kabın kapağı açılır ve kapağı ile birlikte etüvde 2 saat bırakılır.

5.5. Desikatöre alınırken kaplar kapak ile kapatılır, oda sıcaklığına soğutulur ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır.

5.6. Kaplar kapatılmadan, kapakları ile birlikte 1 saat kadar tekrar etüvde bırakılır.

5.7. Madde 5.5'deki işlem tekrarlanır.

5.8. Ardarda yapılan tartımlar da kütlede azalma 0.5 mg'ı geçmeyinceye kadar veya kütlede artış olana kadar madde 5.6 ve 5.5'deki işlemler tekrarlanır. Eğer kütlede artış meydana gelirse hesaplamada en düşük kütle dikkate alınır (6.1). Son tartım g olarak kaydedilir (m_2).

6. Sonuçların açıklanması

6.1. Formül ve hesaplama metodu

Nem miktarı; örneğin kütlede yüzde olarak hesaplanır:

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

m_0 = Kap ve kapağın işlem 5.2'den sonraki kütlesi, g

m_1 = Kap, kapak ve örneğin kurutmadan önceki (5.3) kütlesi, g

m_2 = Kap, kapak ve örneğin kurutmadan sonraki (5.5) kütlesi, g

6.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, her 100 g ürün için 0.2 g nem miktarını geçmemelidir.

Metod 3: Koyulaştırılmış Sütlerde Yağ Miktarı Tayini (Rose-Gottlieb Metodu)

1. Uygulama alanı ve amacı

Bu metoddla; koyulaştırılmış yüksek yağlı süt, koyulaştırılmış tam yağlı süt, koyulaştırılmış yarım yağlı süt, koyulaştırılmış yağsız süt, şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız sütün yağ miktarı saptanır.

2. Tanım

Koyulaştırılmış sütlerin yağ miktarı; bu metodla saptanan yağ miktarıdır.

3. Prensip

Yağ miktarı; örnekler amonyak ve etil alkol katılması sonucu elde edilen karışımdan, yağın dietil eter veya petrol eteri ile ekstraksiyonu, çözücülerin uçurulmasından sonra geriye kalan kısmın tartılarak Rose-Gottlieb ilkesine göre örneğin kütlede yüzde olarak hesaplanmasıdır.

4. Reaktifler

Bütün reaktifler, şahit denemede belirlenen tüm şartlara uygun olmalıdır (6.1). Eğer, çözücünün 100 ml'sinde yaklaşık 1g süt yağı tespit edilirse çözeltilerin tekrar distile edilmeleri gerekir.

4.1. Amonyak çözeltisi (NH_3); yaklaşık % 25 (kütle/kütle), yoğunluğu 20 °C'de yaklaşık 0.91 g/mL veya daha derişik konsantrasyonda.

4.2. Etanol, % 96 ± 2'lik (hacim/hacim) veya metanol, etil-metil keton veya petrol eteri ile denatüre edilmiş etanol.

4.3. Dietil eter; peroksitsiz.

Not 1 : Peroksitlerin bulunup bulunmadığını anlamak için ağzı cam kapakla kapatılabilen küçük bir mezür, eter ile çalkalandıktan sonra 10 mL eter ilave edilir. Yeni hazırlanmış % 10'luk potasyum iyodat çözeltisinden 1mL konur, çalkalanır ve 1 dakika bekletilir. Her iki tabakada da sarı renk görülmemelidir.

Not 2: Dietil eter, daha önce seyreltik asitli bakır sülfat çözeltisi içinde 1 dakika tutulmuş ve su ile yıkanmış ıslak çinko tabaka kullanılarak peroksitlerden arıtılır ve bu şekilde muhafaza edilebilir. Eterin her litresi için 8000 mm² çinko tabaka kullanılmalıdır. Tabaka eter kabının en az yarısına erişebilecek boyutlarda şeritler halinde kesilmelidir.

4.4. Petrol eteri; kaynama noktası 30 ile 60 °C arasında olmalıdır.

4.5. Karışık çözücüler; eşit hacimde petrol eteri (4.4) ve dietil eter (4.3) karıştırılır. Karışım, kullanmadan hemen önce hazırlanmalıdır. Karışık çözücülerin kullanımının gösterildiği yerde dietil eter yada petrol eteri tek başına da kullanılabilir.

5. Cihazlar ve malzemeler

5.1. Analitik terazi

5.2. Uygun ekstraksiyon tüpleri veya balonları; traşlı cam kapaklar veya çözücülerden etkilenmeyecek diğer kapaklar.

5.3. Balonlar; ince cidarlı ve düz tabanlı, 150-250 mL kapasiteli.

5.4. Atmosferik basınçlı etüv; iyi havalandırılabilen ve termostatik olarak $102 \pm 1^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanabilen.

5.5. Sıçramayı önleyici malzeme; yağsız, gözeneksiz, kullanıldığında ufalanmayan, örneğin cam boncuklar veya silikon karpit parçaları. Bu materyalin kullanımı isteğe bağlıdır, madde 6.2.1'e bakınız.

5.6. Sifon; ekstraksiyon tüplerine uygun.

5.7. Santrifüj, isteğe bağlı.

6. İşlem

6.1. Şahit deney

Örneğin yağ miktarı tayini yapılırken, örnek yerine 10 mL damıtık su kullanılarak madde 6.2.2 hariç olmak üzere bundan sonra tanımlanan işlemlerin aynısının uygulanmasıyla bir şahit deney yapılır. Eğer şahit deneyin sonucu 0.5 mg'ı geçerse, çözeltiler kontrol edilir, saf olmayan çözelti veya çözeltiler saflaştırılır veya tekrar hazırlanır.

6.2. Deney

6.2.1. Balon (5.3) içerisine çözücünün uçurulması aşamasında yavaşça kaynamasını sağlamak ve sıçramasını önlemek amacıyla malzeme (5.5) ilave edilerek etüvde (5.4) yarım ile bir saat arasında tutularak kurutulur. Oda sıcaklığına soğuyana kadar bırakılır ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır (m_1).

6.2.2. Hazırlanan örnekler karıştırılıp, 1 mg hassasiyetle hemen tartılır. Şekersiz örneklerden 4-5 g veya şekerli örneklerden 2-2.5 g tartılarak ekstraksiyon balonuna (5.2) alınır. 10.5 mL'ye tamamlayacak kadar su ilave edilir. Ürün tamamen dağılana kadar dikkatlice karıştırılarak 40-50 °C'ye kadar ısıtılır. Örnek tamamen dağılmalı, aksi halde tayin tekrar edilmelidir.

6.2.3. 1.5 mL % 25'lik amonyak çözeltisi (4.1) veya daha konsantre bir çözeltinin eşdeğer hacmi ilave edilerek iyice karıştırılmalıdır.

6.2.4. 10 mL etanol (4.2) eklenir ve balon kapatılmadan sıvılar yavaşça karıştırılır.

6.2.5. 25 mL dietil eter eklenir (4.3), su altında soğutulur ve balon kapatılır. Kuvvetlice çalkalanır ve bir dakika süreyle devamlı olarak alt üst edilir.

6.2.6. Kapak dikkatlice açılıp, 25 mL petrol eteri (4.4) ilave edilir, ilk birkaç mL ile kapak ve balonun boyun kısmı yıkanır. Kapak yerine yerleştirilir, çalkalanır ve 30 saniye kadar devamlı alt üst edilir. Eğer santrifüj kullanılmıyorsa (6.2.7'deki) çok şiddetli çalkalamaktan kaçınılmalıdır.

6.2.7. Balon, alt ve üst tabaka birbirinden tamamen ayrılana kadar bekletilir. Bu ayırma işlemi uygun bir santrifüj (5.7) kullanılarak yapılabilir.

Not: Üç fazlı motorla çalışmayan bir santrifüj kullanıldığında kıvılcımlar oluşabilir ve örneğin; tüp kırıldığında gelen herhangi bir eter buharından alev veya bir patlama kaçınılmaz olabilir, bu yüzden dikkat edilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır.

6.2.8. Kapak açılır. Tıpa ve balonun boynunun iç kısmında kalanlar birkaç mL karışık çözücü ile (4.5) yıkanır ve yıkanan kısım balonun içine aktarılır. Üstteki tabaka dikkatlice mümkün olduğu kadar elle veya bir sifon (5.6) yardımı ile hazırlanan balonun (6.2.1) içine aktarılır.

Not: Eğer aktarırken sifon kullanılmıyorsa, iki tabaka arasındaki yüzeyi ayırmak için bir miktar su ilave etmek gerekli olabilir ve böylece bir kaptan diğerine aktarma gerçekleştirilebilir.

6.2.9. Balonun boynunun iç ve dış kısmı veya sifonun ucu ve daha alt kısmı yine birkaç mL karışık çözücü ile (4.5) balonun içine yıkanır. Cihazın dışından akanların balonun içine, balonun boynunun iç kısmından ve sifondan akanların ise ekstraksiyon balonuna akması sağlanır.

6.2.10. 15 mL petrol eteri ve 15 mL dietil eter kullanılarak 6.2.5 ve 6.2.9 arasındaki işlemleri kapsayan ikinci ekstraksiyon tekrarlanarak yapılır.

6.2.11. Madde 6.2.9'daki son yıkama atlanarak, 6.2.10'daki işlem tekrarlanarak üçüncü ekstraksiyon yapılır.

Not : Şekerli yağsız koyulaştırılmış süt ve şekersiz yağsız koyulaştırılmış süt örnekleri analizinde bu üçüncü ekstraksiyonu tamamlamak zorunlu değildir.

6.2.12. Mümkinse etenol dahil çözücüler mümkün olduğu kadar uçurulur veya damıtılır. Eğer balon küçük kapasiteli ise, her bir ekstraksiyondan sonra yukarıdaki gibi çözücünün bir kısmını uzaklaştırmak gerekli olacaktır.

6.2.13. Balonda hissedilebilir koku kalmadığı zaman etüvde bir saat kadar ısıtılır.

6.2.14. Balon etüvden alınır, oda sıcaklığına soğuyana kadar bırakılır ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır.

6.2.15. Birbirini izleyen iki ağırlığın kütle farkları 0.5 mg'dan daha az veya kütlede artma olana kadar madde 6.2.13 ve 6.2.14'teki 30 ve 60 dakikalık ısıtma işlemleri tekrarlanır. Eğer kütlede artma meydana gelirse hesaplamada (7.1) en düşük kütle değeri kullanılır. Son ağırlık g olarak kaydedilir (m_1).

6.2.16. Ekstrakte edilen materyalin tümünün çözünebilir olup olmadığını kontrol amacı ile sırasıyla 15 ve 25 mL petrol eteri eklenir. Hafifçe ısıtılır ve yağın tamamı çözününceye kadar döndürülerek karıştırılır.

6.2.16.1. Eğer ekstrakt madde petrol eteri içinde tamamen çözünüyorsa, ekstraktı ihtiva eden balonun (6.2.15) ağırlığından balonun darası (6.2.1) çıkarılarak yağın kütlesi bulunur.

6.2.16.2. Eğer ekstrakte edilen madde petrol eteri içinde tamamen çözünmüyorsa veya şüpheli bir durum olursa balondaki yağ ılık petrol eteri ile birkaç kez yıkanarak tekrar ekstrakte edilir. Her boşaltma işleminden çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Balonun boyun kısmının dışı üç defa yıkanır. Balon etüvde yatık bir şekilde bir saat bekletilir ve oda sıcaklığına soğutulur (6.2.1) ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır. (m_2) Elde edilen kütle ile madde 6.2.15'te elde edilen kütle ile bu son kütle arasındaki fark yağın kütlesidir.

7. Sonuçların açıklanması

7.1. Formül ve hesaplama metodu

Ekstrakte edilen yağın kütlesi g olarak;

$$(m_1 - m_2) - (B_1 - B_2)$$

Örneğin yağ miktarı yüzde olarak belirtilir:

$$\frac{(m_1 - m_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

m_1 = 6.2.15'teki işlemde sonra elde edilen yağ ile balonun kütlesi, g

m_2 = 6.2.1'deki veya 6.2.16.2'deki işlemde sonra elde edilen balonun kütlesi, g

B_1 = Şahit deneyde kullanılan balonun 6.2.15'deki işlemde sonraki kütlesi, g

B_2 = Şahit deneyde kullanılan balonun 6.2.1'deki veya 6.2.16.2'deki işlemde sonra elde edilen kütlesi, g

S = Örneğin kütlesi, g

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, her 100 g ürün için 0.05 g yağı geçmemelidir.

Metod 4: Süttozunda Yağ Miktarı Tayini (Rose-Gottlieb Metodi)

1. Uygulama alanı ve amacı

Bu metodla; yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunun yağ miktarı saptanır.

2. Tanım

Süttozunda yağ miktarı; bu metodla saptanan yağ miktarıdır.

3. Prensipli

Yağ miktarı; örnekler amonyak ve etil alkol katılması sonucu elde edilen karışımdan, yağın dietil eter veya petrol eteri ile ekstraksiyonu, çözücülerin uçurulmasından sonra geriye kalan kısmın tartılarak Rose-Gottlieb ilkesine göre örneğin kütlesinde yüzde olarak hesaplanmasıdır.

4. Reaktifler

Bütün reaktifler, şahit denemede belirlenen tüm şartlara uygun olmalıdır (6.1). Eğer, çözücünün 100 mL'sinde yaklaşık 1g süt yağı tespit edilirse çözeltilerin tekrar distile edilmeleri gerekir.

4.1. Amonyak çözeltisi (NH₃); yaklaşık % 25 (kütle/kütle), yoğunluğu 20 °C'de yaklaşık 0.91 g/mL veya daha düşük konsantrasyonda.

4.2. Etanol, % 96 ± 2'lik (hacim/hacim) veya metanol, etil-metil keton veya petrol eteri ile denatüre edilmiş etanol.

4.3. Dietil eter; peroksitsiz.

Not 1: Peroksitlerin bulunup bulunmadığını anlamak için ağzı cam kapakla kapatılabilen küçük bir mezür, eter ile çalkalandıktan sonra 10 mL eter ilave edilir. Yeni hazırlanmış % 10'luk potasyum iyodat çözeltisinden 1 mL balona konur, çalkalanır ve 1 dakika bekletilir. Her iki tabakada da sarı renk görülmemelidir.

Not 2: Dietil eter, daha önce seyreltik asitli bakır sülfat çözeltisi içinde 1 dakika tutulmuş ve su ile yıkanmış ıslak çinko tabaka kullanılarak peroksitlerden arıtılır ve bu şekilde muhafaza edilebilir. Eterin her litresi için 8000 mm² çinko tabaka kullanılmalıdır. Tabaka eter kabının en az yarısına erişebilecek boyutlarda şeritler halinde kesilmelidir.

4.4. Petrol eteri; kaynama noktası 30 ile 60 °C arasında olmalı.

4.5. Karışık çözücüler; eşit hacimde petrol eteri (4.4) ve dietil eter (4.3) karıştırılır. Karışım, kullanmadan hemen önce hazırlanmalıdır. Karışık çözücülerin kullanımının gösterildiği yerde dietil eter ya da petrol eteri tek başına da kullanılabilir.

5.Cihazlar ve malzemeler

5.1. Analitik terazi

5.2. Uygun ekstraksiyon tüpleri veya balonları; tıraşlı cam kapaklar veya çözücülerden etkilenmeyecek diğer kapaklar.

5.3. Balonlar; ince cidarlı ve düz tabanlı, 150-250 mL kapasiteli.

5.4. Atmosferik basınçlı etüv; iyi havalandırılabilen ve termostatik olarak 102 ± 1°C'ye ayarlanabilen.

5.5. Sıçramayı önleyici malzeme; yağsız, gözeneksiz, kullanıldığında ufalanmayan, örneğin cam boncuklar veya silikon karpit parçaları. Bu materyalin kullanımı isteğe bağlıdır, madde 6.2.1'e bakınız.

5.6. Su banyosu; 60-70 °C'de.

5.7. Sifon; ekstraksiyon tüplerine uygun.

5.8. Santrifüj, isteğe bağlı.

6.İşlem

6.1. Şahit deney

Örneğin yağ miktarı tayini yapılırken, örnek yerine 10 mL damıtık su kullanılarak madde 6.2.2 hariç olmak üzere bundan sonra tanımlanan işlemlerin aynısının uygulanmasıyla bir şahit deney yapılır. Eğer şahit deneyin sonucu 0.5 mg'ı geçerse, çözeltiler kontrol edilir, saf olmayan çözelti veya çözeltiler saflaştırılır veya tekrar hazırlanır.

6.2. Deney

6.2.1. Balon (5.3) içerisine çözücünün uçurulması aşamasında yavaşça kaynamasını sağlamak ve sıçramasını önlemek amacıyla malzeme (5.5) ilave edilerek etüvde (5.4) yarım ile bir saat arasında tutularak kurutulur. Oda sıcaklığına soğuyana kadar bırakılır ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır.

6.2.2. Yağsız veya yarım yağlı süttozundan yaklaşık 1.5 g veya çok yağlı süttozundan yaklaşık 1 g ekstraksiyon balonuna (5.2) 1 mg hassasiyetle tartılır. 10 mL su ilave edilir ve tamamen çözünene kadar yavaşça karıştırılır, bazı örnekler için ısıtma gerekli olabilir.

6.2.3. 1.5 mL % 25'lik amonyak çözeltisi (4.1) veya daha konsantre bir çözeltinin eşdeğer hacmi ilave edilir ve 60-70 °C'lik su banyosunda 15 dakika ısıtılır, ara sıra çalkalanır ve akan su altında soğutulur.

6.2.4. 10 mL etanol (4.2) eklenir ve balon kapatılmadan sıvılar yavaşça karıştırılır.

6.2.5. 25 mL dietil eter eklenir (4.3), su altında soğutulur ve balon kapatılır. Kuvvetlice çalkalanır ve bir dakika süreyle devamlı olarak alt üst edilir.

6.2.6. Kapak dikkatlice açılıp, 25 mL petrol eteri (4.4) ilave edilir, ilk birkaç mL ile kapak ve balonun boyun kısmı yıkanır. Kapak yerine yerleştirilir, çalkalanır ve 30 saniye kadar devamlı alt üst edilir. Eğer santrifüj kullanılmıyorsa (6.2.7) çok şiddetli çalkalamaktan kaçınılmalıdır.

6.2.7. Balon, alt ve üst tabaka birbirinden tamamen ayrılana kadar bekletilir. Bu ayırma işlemi uygun bir santrifüj (5.8) kullanılarak yapılabilir.

Not: Üç fazlı motorla çalışmayan bir santrifüj kullanıldığında kıvılcımlar oluşabilir ve örneğin; tüp kırıldığında gelen herhangi bir eter buharından alev veya bir patlama kaçınılmaz olabilir, bu yüzden dikkat edilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır.

6.2.8. Kapak açılır. Tıpa ve balonun boynunun iç kısmında kalanlar birkaç mL karışık çözücü ile (4.5) yıkanır ve yıkanan kısım balonun içine aktarılır. Üstteki tabaka dikkatlice mümkün olduğu kadar elle veya bir sifon yardımı (5.6) ile hazırlanan balonun (6.2.1) içine aktarılır.

Not: Eğer aktarırken sifon kullanılmıyorsa, iki tabaka arasındaki yüzeyi ayırmak için bir miktar su ilave etmek gerekli olabilir ve böylece bir kaptan diğerine aktarma gerçekleştirilebilir.

6.2.9. Balonun boynunun iç ve dış kısmı veya sifonun ucu ve daha alt kısmı yine birkaç mL karışık çözücü ile (4.5) balonun içine yıkanır. Cihazın dışından akanların balonun içine, balonun boynunun iç kısmından ve sifondan akanların ise ekstraksiyon balonuna akması sağlanır.

6.2.10. 15 mL petrol eteri ve 15 mL dietil eter kullanılarak 6.2.5 ve 6.2.9 arasındaki işlemleri kapsayan ikinci ekstraksiyon tekrarlanarak yapılır.

>6.2.11. Madde 6.2.9'daki son yıkama atlanarak, 6.2.10'daki işlem tekrarlanarak üçüncü ekstraksiyon yapılır.

Not : Yağsız süttozu örnekleri analizinde bu üçüncü ekstraksiyonu tamamlamak zorunlu değildir.

6.2.12. Mümkünse etenol dahil çözücüler mümkün olduğu kadar uçurulur veya damıtılır. Eğer balon küçük kapasiteli ise, her bir ekstraksiyondan sonra yukarıdaki gibi çözücünün bir kısmını uzaklaştırmak gerekli olacaktır.

6.2.13. Balonda hissedilebilir koku kalmadığı zaman etüvde bir saat kadar ısıtılır.

6.2.14. Balon etüvden alınır, oda sıcaklığına soğuyana kadar bırakılır ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır.

6.2.15. Birbirini izleyen iki ağırlığın kütle farkları 0.5 mg'dan daha az veya kütlede artma olana kadar madde 6.2.13 ve 6.2.14'teki 30 ve 60 dakikalık ısıtma işlemleri tekrarlanır. Eğer kütlede artma meydana gelirse hesaplamada (7.1) en düşük kütle değeri kullanılır. Son ağırlık g olarak kaydedilir (m_1).

6.2.16. Ekstrakte edilen materyalin tümünün çözünebilir olup olmadığını kontrol amacı ile sırasıyla 15 ve 25 mL petrol eteri eklenir. Hafifçe ısıtılır ve yağın tamamı çözününceye kadar döndürülerek karıştırılır.

6.2.16.1. Eğer ekstrakt madde petrol eteri içinde tamamen çözünüyorsa, ekstraktı içeren balonun (6.2.15'deki) ağırlığından balonun darası (6.2.1) çıkarılarak yağın kütlesi bulunur.

6.2.16.2. Eğer ekstrakte edilen madde petrol eteri içinde tamamen çözünmüyorsa veya şüpheli bir durum olursa balondaki yağ ılık petrol eteri ile birkaç kez yıkanarak tekrar ekstrakte edilir. Her boşaltma işleminden çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Balonun boyun kısmının dışı üç defa yıkanır. Balon etüvde yatık bir şekilde bir saat bekletilir ve oda sıcaklığına soğutulur (6.2.1) ve 0.1 mg hassasiyetle tartılır. (m_2) Elde edilen kütle ile madde 6.2.15'te elde edilen kütle ile bu son kütle arasındaki fark yağın kitlesidir.

7. Sonuçların açıklanması

7.1. Formül ve hesaplama metodu

Ekstrakte edilen yağın kütlesi g olarak;

$$(m_1 - m_2) - (B_1 - B_2)$$

Örneğin yağ miktarı yüzde olarak belirtilir:

$$\frac{(m_1 - m_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

S

m_1 = 6.2.15'teki işlemden sonra elde edilen yağ ile balonun kütlesi, g
 m_2 = 6.2.1'deki veya 6.2.16.2'deki işlemden sonra elde edilen balonun kütlesi, g
 B_1 = Şahit deneyde kullanılan balonun 6.2.15'deki işlemden sonraki kütlesi, g
 B_2 = Şahit deneyde kullanılan balonun 6.2.1'deki veya 6.2.16.2'deki işlemden sonra elde edilen kütlesi, g

S = Örneğin kütlesi, g

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, her 100 g üründe 0.2 g yağı, yağsız süttozunda ise 100 g üründe 0.1 g yağı geçmemelidir.

Metod 5: Sakaroz Miktarı Tayini (Polarimetrik Metod)

1. Uygulama alanı ve amacı

Şekerli koyulaştırılmış süt, şekerli koyulaştırılmış yarım yağlı süt, şekerli koyulaştırılmış yağsız sütte sakaroz miktarının saptanmasında bu metod kullanılır. Bu metodun uygulandığı örneklerin invert şeker içermemesi gerekmektedir.

2. Tanım

Şekerli koyulaştırılmış sütlerin sakaroz miktarı; bu metotta belirtildiği gibi saptanır.

3. Prensip

Bu metod prensibi Clerget inversiyonu prensibine dayanır. Örneğin asit ile hafif muamelesi sonucunda sakarozun tamamen hidrolizi sağlanır, ancak laktoz veya diğer şekerler bu işlemde etkilenmezler. Sakaroz miktarı, çözeltinin açılal derecesinin saptanmasından elde edilir.

Örneğin berrak filtratı, laktoz tarafından değişime uğratılmadan amonyak ile muamele edilerek ve bunu takiben nötralizasyon ve sırasıyla çinko asetat ve potasyum heksasiyanoferrat (II) çözeltileri ile durultma işlemine tabi tutularak elde edilir. Süzütünün bir bölümündeki sakaroz özel bir yolla hidrolize edilir.

Süzütünün inversiyondan önceki ve sonraki rotasyon değerinden sakaroz miktarı hesaplanmaktadır.

4. Reaktifler

4.1. Çinko asetat çözeltisi, 1 M: 21.9 g kristalize çinko asetat dihidrat $Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$ ve 3 mL glasiyal asetik asit bir miktar suda çözülüp, 100 mL'ye su ile tamamlanır.

4.2. Potasyum heksasiyanoferrat-II çözeltisi, 0.25 M: 10.6 g kristalize potasyum heksasiyanoferrat-II-trihidrat $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ bir miktar suda çözülüp, 100 mL'ye su ile tamamlanır.

4.3. Hidroklorik asit çözeltisi, 6.35 ± 0.2 M (% 20-22) veya 5.0 ± 0.2 M (% 16-18)

4.4. Amonyak çözeltisi, 2 ± 0.2 M (% 3.5)

4.5. Asetik asit çözeltisi, 2 ± 0.2 M (% 12)

4.6. Bromtimol mavisi indikatörü, %1 (kütle/hacim) etanol içindeki çözeltisi

5. Cihaz ve malzemeler

5.1. Analitik terazi , 10 mg hassasiyette.

5.2. Polarimetre tüpü , tam olarak 2 dm kalibre edilmiş uzunlukta.

5.3. Polarimetre veya sakarimetre:

(a) Polarimetre, sodyum ışığı veya civa yeşili ışığı olan, en az 0.05 açılal derece hassasiyetle okunabilen, (prizmalı civa buharlı lamba veya özel Wratten Screen No 77 A)

(b) Sakarimetre, uluslararası şeker skalalı, 15 mm derinlikteki % 6'lık potasyum bikromat çözeltisi süzgecinden geçen beyaz ışık veya sodyum ışığı ile çalıştırılan, en az 0.1 uluslararası şeker skala derecesi hassasiyetle okunabilen.

5.4. Su banyosu, 60 ± 1 °C'ye ayarlanabilen.

6. İşlem

6.1. Şahit deney

İşlemin, reaktiflerin, alet ve cihazların kontrolü için 100 g süt veya 110 g yağsız süt ve 18 g saf sakaroz karışımı üzerinde aşağıda verilen kontrol deneyi iki paralel halinde yapılır. Bu karışım % 45 sakaroz içeren 40.00 g koyulaştırılmış süte karşılık gelmektedir. Şeker miktarı madde 7'de verilen

formülle hesaplanır. 1 nci formülde m tartılan süt miktarını, F sütün yağ miktarını, P sütün protein miktarını ifade eder. 2 nci formülde ise m için 40.00 değeri yazılır. Bulunan değerlerin ortalaması % 45 ± 0.2 sınırları içinde olmalıdır.

6.2.Deney

6.2.1. İyice karışmış örnekten yaklaşık 40 g 10 mg hassasiyetle 100 mL'lik cam beher içine tartılır. 50 mL sıcak su (80-90 °C) eklenir ve iyice karıştırılır.

6.2.2. Karışım 60 °C'lik suyla birkaç defa toplam hacim 120 mL ile 150 mL arasında oluncaya kadar beher yıkanır ve 200 mL'lik ölçülü balona kantitatif olarak aktarılır. Karıştırılır ve oda sıcaklığına soğutulur.

6.2.3. Seyreltik amonyak çözeltisinden (4.4) 5 mL eklenir, tekrar karıştırılır ve 15 dakika kadar bekletilir.

6.2.4. Seyreltik asetik asit (4.5) çözeltisi ilave edilerek amonyak nötralize edilir. İndikatör olarak bromtimol mavisi (4.6) kullanılarak amonyak çözeltisinin titrasyon ile nötralizasyonunda kullanılan seyreltik asetik asit miktarının kesin mL'si belirlenir.

6.2.5.Çalkalanan balon hafifçe çevrilerek karıştırılmak suretiyle çinko asetat çözeltisinden (4.1) 12.5 mL ilave edilir.

6.2.6.Çinko asetat çözeltisinin ilave dildiği biçimde potasyum hekzasiyanoferrat-II çözeltisinden (4.2) 12.5 mL ilave edilir.

6.2.7. Balon içeriği sıcaklığı 20°C'ye getirilir ve 200 mL işaretine kadar 20 °C'deki su ile tamamlanır.

Not: Bu aşamaya kadar bütün su ve reaktif ilaveleri hava kabarcıkları oluşmayacak şekilde yapılmalıdır. Bütün karıştırma işlemleri balonu çalkalamak şeklinde değil dairesel hareketlerle çevrilmek şeklinde yapılmalıdır. Eğer hava kabarcıkları bulunuyorsa, hacim 200 mL'ye tamamlanmadan önce, bunlar balonun bir vakum pompasına geçici olarak bağlanması ve balonun dairesel hareketlerle çevrilmesi yoluyla giderilebilir.

6.2.8. Balon kuru bir kapak ile kapatılır ve kuvvetli olarak çalkalanarak tamamen karıştırılır.

6.2.9. Birkaç dakika bekletilir ve kuru bir süzgeç kağıdıyla süzülür, süzüntünün ilk 25 mL'si atılır.

6.2.10. Direk polarizasyon: Süzüntünün optik sapması 20 ± 1 °C'de tayin edilir.

6.2.11. İnversiyon: 50 mL'lik ölçülü balonjoje içine elde edilen süzüntünün 40 mL'si alınır. 6 mL 6.35 M hidroklorik asit veya 7.5 mL 5 M hidroklorik asit (4.3) eklenir. Balon 60 °C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilir, balonun içindekilerin tamamının suya daldırılması sağlanmalıdır. İlk beş dakika içinde dönme hareketi ile karıştırılır. Bu zamanda balonun içindekiler su banyonun sıcaklığına ulaştıktan sonra 20 °C'ye soğutulur, 20 °C'lik su ile hacmi tamamlanır, karıştırılır ve bu sıcaklıkta 1 saat bekletilir.

6.2.12.İnvert Polarizasyon: İnvert çözeltinin optik sapması 20 ± 0.2 °C'de saptanır. Polarizasyon tüpündeki sıvının sıcaklığı 0.2 °C'den fazla değişirse madde 7.2'de belirtilen sıcaklık düzeltmesi kullanılmalıdır.

7. Sonuçların açıklanması

7.1. Formül ve hesaplama metodu

Sakaroze miktarı kütlece yüzde olarak aşağıdaki formüllerle hesaplanır:

$$(1) \quad v = \frac{m}{100} (1.08 F + 1.55 P)$$

$$(2) \quad S = \frac{D - 1.25 I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times m}$$

S = Sakaroze miktarı

m = Örnek kütlesi, g

F = Örnekteki yağ miktarı

P = Örnekteki protein miktarı (N x 6.38)

V = Süzme işleminden önce örneğin tamamlandığı hacim, mL

v = Berraklaştırma sırasında oluşan çözelti hacmi için düzeltme, mL

D = İnversiyondan önceki polarimetre okuması

I = İnversiyondan sonraki polarimetre okuması

L = Polarimetre tüpünün uzunluğu, dm

Q = İnversiyon faktörü, aşağıda verilen değerler

(a) Tam 40.00 g koyulaştırılmış süt tartıldığında ve sodyum ışıklı açısal dereceli 2 dm'lik polarimetre tüplü polarimetre 20.0 ± 0.1 °C'ta kullanıldığında, normal koyulaştırılmış sütün (C=9) sakaroz miktarı şu formülden hesaplanabilir.

$$S = (D - 1.25 I) \times (2.833 - 0.00612 F - 0.00878 P)$$

(b) İntert polarizasyon 20 °C'den farklı bir sıcaklıkta ölçüldüyse (T) I'nın değeri

$$1 + 0.0037 (T - 20)$$

ile çarpılmalıdır.

7.2. İnversiyon Faktörü Q 'nın değerleri;

Farklı ışık kaynakları için gerektiğinde sıcaklık ve konsantrasyon düzeltmeleri ile kesin Q değerlerini aşağıdaki formüller verir.

Sodyum ışığı ve açısal dereceli polarimetre:

$$Q = 0.8825 + 0.0006 (C - 9) - 0.0033 (T - 20)$$

Civa yeşili ışığı ve açısal dereceli polarimetre:

$$Q = 1.0392 + 0.0007 (C - 9) - 0.0039 (T - 20)$$

Dikromat süzgeçli beyaz ışık ve uluslararası şeker skalası dereceli sakarimetre:

$$Q = 2.549 + 0.0017 (C - 9) - 0.0095 (T - 20)$$

Yukarıdaki formüllerde:

C = Polarize edilmiş invert çözeltideki toplam şekerin yüzdesi

T = Polarimetrik okumada invert çözeltinin sıcaklığı.

Not 1: İntert şeker çözeltisindeki toplam şeker konsantrasyonu (C) yüzdesi doğrudan okuma ile ve alışımlı metotta inversiyondaki değişimden hesaplanabilir. Bu hesaplamada da sakaroz, laktoz ve invert şekerin spesifik sapma değerleri kullanılır.

0.0006 (C - 9) düzeltmesi C yaklaşık 9 olduğu zaman doğrudur; normal koyulaştırılmış süt için bu düzeltme C, 9'a yakın ise ihmal edilebilir.

Not 2: Doğrudan okumada 20 °C'lik sıcaklıktan 1 °C'lik sapmalar küçük farklılıklar meydana getirir. Fakat invert okumada 0.2 °C'nin üstündeki sapmalar bir düzeltmeyi gerektirir. Düzeltme faktörü - 0.0033 (T - 20) v.s. sadece 18 - 22 °C arasında doğrudur.

7.3. Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, her 100 g örnek için 0.3 g sakarozu geçmemelidir.

Metod 6: Laktik Asit ve Laktatların Miktar Tayini

1. Uygulama alanı ve amacı

Bu metod, şekerli koyulaştırılmış yağsız süt, yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunda laktik asit ve laktatların miktarının saptanmasında kullanılır.

2. Tanım

Süttozlarında laktik asit ve laktatların miktarı; belirtilen metodla saptanan laktik asit olarak belirlenen laktik asit ve laktatların miktarıdır.

3. Prensiptir

Örneğe bakır sülfat ve kalsiyum hidroksit ilave edilir. Daha sonra süzülerek çözeltiden, yağ, protein ve laktoz aynı anda uzaklaştırılır. Süzüntüdeki laktik asit ve laktatlar, bakır (II) sülfatın varlığında konsantre sülfürik asit ile asetaldehit formuna dönüştürülür. Laktik asit miktarı, p-hidroksidifenil kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilir.

Laktik asit ve laktatların miktarı, 100 g yağsız kurumaddede laktik asitin mg olarak miktarıdır.

4. Reaktifler

4.1. Bakır (II) sülfat çözeltisi: 250 g bakır (II) sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) bir miktar suda çözülür ve 1000 mL'ye tamamlanır.

4.2. Kalsiyum hidroksit süspansiyonu

4.2.1. Toplam 900 mL su kullanılarak 300 g kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) havan içinde su ile ezilerek, taze olarak hazırlanmalıdır.

4.2.2. Toplam 1400 mL su kullanarak 300 g kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) havan içinde su ile ezilerek, taze olarak hazırlanmalıdır.

4.3. Sülfürik asit – bakır (II) sülfat çözeltisi: 300 ml % 95.9 – 97.0'lık (m/m) sülfürik asite (H_2SO_4) 0.5 mL bakır (II) sülfat çözeltisi (4.1) ilave edilir.

4.4. p-Hidroksidifenil ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) çözeltisi: 0.75 g p-hidroksidifenil 100 mL'sinde 5 g sodyum hidroksit (NaOH) içeren sulu bir sodyum hidroksit çözeltinin 5 mL'sinde hafifçe ısıtılır ve karıştırarak çözülür. Ölçülü balon içinde su ile 50 mL'ye seyreltilir. Koyu renkli cam şişede, karanlık ve serin yerde saklanır. Renk değişimi veya bulanıklılık oluşursa kullanılmaz. Hazırlanan çözelti 72 saat dayanıklıdır.

4.5. Standart laktik asit çözeltisi: 0.1067 g lityum laktat ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$) bir miktar suda çözülüp 1 L'ye su ile tamamlanır ve kullanmadan hemen önce hazırlanır. Bu çözeltinin 1 mL'si 0.1 mg laktik asit içerir.

4.6. Standart rekonstitüe süt: Birkaç yüksek kaliteli süttozu analiz edilip, kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için en düşük laktik asit içeriğini sağlayan örnek seçilir. Bu örnek 100 g yağsız kurumaddede en fazla 30 mg laktik asit içermelidir. Aşağıdaki madde 6.2.1. ve 6.2.2'de tanımlanan işlemler takip edilir

5. Cihazlar ve malzemeler

5.1. Analitik teraz

5.2. Spektrofotometre; 570 nm dalga boyunda okuma yapabilen

5.3. Su banyosu; $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanabilen

5.4. Havan ve havan eli

5.5. Filtre kağıdı; Schleicher ve Schull 595, Whatman 1 veya eşdeğer

5.6. Deney tüpleri; pyrex veya eşdeğer, 25x150 mm ölçülerde

Not: Tüm malzemeler iyice temizlenmeli ve yalnızca bu tayinde kullanılmalıdır. Kalıntı içeren cam malzemeler yıkanmadan önce konsantre HCl ile iyice çalkalanmalıdır.

6. İşlem

6.1. Şahit Deney

50 ml'lik tüp içine 30 ml su koyup 6.2.4. ile 6.2.11. arasındaki işlemler yapılır ve şahit deney tamamlanır. Eğer tanığın suya karşı ölçümünde elde edilen değer, 100 g yağsız kuru maddede 20 mg eşdeğer laktik asit miktarını geçerse, çözeltiler kontrol edilir ve saf olmayan çözeltiler değiştirilir. Şahit deney, örneğin analizi ile aynı anda tamamlanmalıdır.

6.2. Deney

Not: Özellikle ter ve tükrük ile kirlilik bulaşmasından kaçınılmalıdır.

6.2.1. 100'den metod 2 ile bulunan nem içeriği ve metod 4 ile bulunan yağ içeriği çıkarılarak, örneğin yağsız kuru madde içeriği gram olarak bulunur. (a)

6.2.2. Örnek, $1000 / (a-10)$ g 0.1 g hassasiyetle tartılır ve bu miktar 100 mL suya eklenerek, karıştırılır.

6.2.3. 50 mL'lik dereceli tüp içine elde edilen çözeltinin 5 mL'si alınır ve 30 mL'ye su ile seyreltilir.

6.2.4. 5 mL bakır (II) sülfat çözeltisi (4.1) çalkalanarak yavaşça eklenir ve 10 dakika bekletilir.

6.2.5. 5 mL kalsiyum hidroksit süspansiyonu (4.2.1) veya 10 mL kalsiyum hidroksit süspansiyonu (4.2.2) tüp çalkalanırken yavaşça eklenir.

6.2.6. 50 mL'ye su ile seyreltilir ve kuvvetlice çalkalanır. 10 dakika bekletilir, sonra süzülür. Süzüntünün ilk kısmı atılır.

6.2.7. Madde 5.6'daki deney tüpüne süzüntünün 1 mL'si alınır.

6.2.8. Tüpe 6 mL sülfürik asit – bakır (II) sülfat çözeltisi (4.3) bir büret yada pipetle eklenir ve karıştırılır.

6.2.9. 5 dakika kaynar su banyosunda ısıtılır ve su altında oda sıcaklığına kadar soğutulur.

6.2.10.2 damla p-hidroksidifenil çözeltisi (4.4) eklenir ve homojen dağılım sağlanana kadar kuvvetlice çalkalanır. Tüp 30 ± 2 °C'lik su banyosuna yerleştirilir, ara sıra çalkalayarak 15 dakika bekletilir.

6.2.11.Tüp, 90 saniye kaynar su banyosunda bırakılır. Akan su altında oda sıcaklığına soğutulur.

6.2.12.Madde 5.2'de belirtilen dalga boyunda üç saat içinde tanığa karşı optik yoğunluk ölçülür.

6.2.13.Eğer optik yoğunluk standart eğrideki en yüksek noktayı geçerse, madde 6.2.6'da elde edilen süzütünün uygun bir şekilde seyreltilmesiyle deneme tekrarlanır.

6.3.Standartların hazırlanması

6.3.1.50 mL'lik dereceli 5 tüpe, rekonstitüe sütün 5'er mL alınır. Bu tüplere standart çözeltiden (4.5) 0, 1, 2, 3 ve 4 mL eklenir. Böylece süttozunun 100 g yağsız kuru maddesine sırasıyla 0, 20, 40, 60, 80 mg laktik asit ilavesi sağlanır.

6.3.2. 30 mL'ye su ile seyreltilir ve madde 6.2.4 ile 6.2.11 arasındaki tanımlanan işlemler uygulanır.

6.3.3.Madde 5.2'de belirtilen spesifik dalga boyunda şahit denemeye (6.1) karşı standartların (6.3.1) optik dansiteleri ölçülür. 100 g yağsız kuru maddede madde 6.3.1'de verilen laktik asit miktarları yani 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg ve 80 mg'a karşılık okunan optik dansiteler grafikte işaretlenir. Noktalar içinden en uygun doğru çizilir ve bu doğru kendine paralel olarak kaydırılarak orijinden geçmesi sağlanır.

7. Sonuçların açıklanması

7.1.Formül ve hesaplama metodu

Standart eğri yardımı ile örneklerde 100 g yağsız kuru maddenin laktik asit miktarları madde 6.2.12. veya 6.2.13.'te belirtilen optik dansite ölçümlerinden mg olarak bulunur. Bu sonuçlar madde 6.2.13'e göre seyreltilen süzütünün seyreltme faktörü ile çarpılır.

7.2.Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, 80 mg içeren en yüksek değer için, 100 g yağsız kuru maddede laktik asit 8 mg'ı geçmemelidir. Daha yüksek değerler için bu fark, en düşük değer için % 10'unu geçmemelidir.

Metod 7: Fosfataz Aktivitesi Tayini (Modifiye Sanders ve Sager İşlemi)

1. Uygulama alanı ve amacı

Yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunda fosfataz aktivitesi saptanmasında bu metod kullanılır.

2. Tanım

Kurutulmuş sütlerde fosfataz aktivitesi, üründe bulunan aktif alkali fosfatazın miktarının ölçümüdür. Aşağıda anlatılan işleme göre, 1 mL rekonstitüe sütte serbest kalan fenolün mikrogram miktarı olarak ifade edilir.

3. Prensip

Kurutulmuş sütlerde fosfataz aktivitesi, fosfatazın disodyum fenil fosfattan fenolü açığa çıkarma yeteneğine dayanır. Gibb's çözeltisi ile renk gelişiminin spektrofotometrik ölçülmesi ile serbest kalan fenolün miktarının tayin edilmesi ilkesine dayanır.

4. Çözeltiler

4.1. A Çözeltisi:

Baryum borat hidroksit tamponu: pH 10.6 $\pm$ 0.1, 20 °C'de: 25 g baryum hidroksit ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) bir miktar suda çözülüp, 500 mL'ye tamamlanır. 11 g borik asit (H_3BO_3) suda çözülüp, 500 mL'ye tamamlanır. Her iki çözelti 50 °C'ye ısıtılır ve karıştırılır. Çalkalanır ve karışım oda sıcaklığına soğutulur. Baryum hidroksit çözeltisi ile pH 10.6 $\pm$ 0.1'e ayarlanır ve süzülür. Çözelti sıkıca kapatılabilen bir şişede saklanır. Kullanmadan önce tampon çözelti eşit miktarda su ile seyreltilir.

4.2. B Çözeltisi

Renk geliştirici tampon çözeltisi: 6 g sodyum metaborat (NaBO_2) (veya 12.6 g $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve 20 g sodyum klorür suda çözülüp, su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

4.3. C Çözeltisi

Tampon substrat çözeltisi:

4.3.1. 0.5 g disodyum fenil fosfat ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 4.5 mL B çözeltisi (4.2) içinde çözülür. 2 damla E çözeltisi (4.5) eklenir ve 30 dakika bekletilir. 2.5 mL bütanol (4.10) ile ekstrakte edilir. Eğer gerekirse ekstraksiyon işlemi tekrarlanır. Sonra ayırma işlemi yapılır, bütanol atılır. Bu çözelti buzdolabında birkaç gün saklanabilir. Çözeltide renk gelişimi olursa, kullanmadan önce bütanol ile ekstrakte edilir.

4.3.2. 100 mL balonjoje içine bu çözeltinin 1 mL'si alınır ve çözelti A ile çizgisine tamamlanır. Tampon çözelti taze olarak hazırlanır.

4.4. D Çözeltisi:

Çöktürücü: 3 g çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ve 0.6 g bakır (II) sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) suda çözülür ve su ile 100 mL'ye tamamlanır.

4.5. E Çözeltisi

Gibb's çözeltisi: 0.040 g 2.6-dibromokinon 1.4 kloramid ($\text{O.C}_6\text{H}_2\text{Br}_2.\text{NC}_1$) 10 mL % 96 etanolde çözülür. Çözelti koyu renkli şişede buzdolabında saklanır. Renksiz hale geldiği zaman çözelti atılır.

4.6. Seyreltik renk tamponu: 10 mL B çözeltisi (4.2) 100 mL'ye suyla seyreltilir.

4.7. Bakır sülfat çözeltisi: 0.05 g bakır (II) sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) suda çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

4.8. Standart fenol çözeltisi: 0.200 g 0.001 g saf fenol suda çözülür ve bir ölçülü balon içerisinde suyla 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti buzdolabında birkaç ay saklanabilir. Bu çözeltinin 10 mL'si 100 mL'ye suyla seyreltilir. Bu seyreltik çözeltinin 1 mL'si 200 µg fenol içerir ve bu çözelti daha seyreltik çözeltilerin hazırlanmasında da kullanılabilir.

4.9. Kaynar distile su

4.10. n- bütanol

5. Cihazlar ve Malzemeler

5.1. Analitik terazi

5.2. Su banyosu; $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanabilen.

5.3. Spektrofotometre; 610 nm dalga boyunda okuma yapabilen

5.4. Filtre kağıdı; Schleicher ve Schull 597, Whatman 42 veya eşdeğer filtre kağıdı.

5.5. Kaynar su banyosu

5.6. Alüminyum folyo

6. İşlem

Notlar:

a) Direkt güneş ışığından kaçınılmalıdır.

b) Bütün cam malzemeler, taşıyıcı malzemeler ve tıplar çok temiz olmalıdır. Suyla durulanmaları ve kaynatılmaları veya buhar ile işlem görmeleri önerilir.

c) Fenol içerebilecekleri için plastik materyal, örneğin kapaklar kullanılmamalıdır.

d) Tükrük fosfataz içerdiğinden, az miktarda dahi olsa tükrük kontaminasyonundan kaçınılmalıdır.

6.1.Örneğin hazırlanması

6.1.1.0.1 g ile 10 g arasında örnek tartılıp, 90 mL su içinde çözülür. Süttozunun erimesi için sıcaklık hiçbir zaman 35°C 'yi geçmemelidir.

6.2. Deney

6.2.1.Madde 6.1.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan rekonstitüe süt iki test tüpünün her birine 1'er mL alınır.

6.2.2. Tüplerden biri, içindeki çözeltinin tamamı su banyosunda olacak şekilde kaynar su banyosunda iki dakika kadar ısıtılır. Soğuk su ile oda sıcaklığına soğutulur. Bu tüp şahit deney için kullanılır. Daha sonraki işlemler iki tüpe de aynı şekilde uygulanır.

6.2.3. 10 mL C çözeltisi (4.3.2) eklenir, karıştırılır ve tüp 37°C 'lik (5.2) su banyosuna yerleştirilir.

6.2.4. Periyodik olarak çalkalayarak su banyosunda 60 dakika inkübasyona bırakılır.

6.2.5. Tüpler hemen kaynar su banyosuna aktarılıp, 2 dakika ısıtılır, soğuk su ile oda sıcaklığına soğutulur.

6.2.6. 1 mL D çözeltisi (4.4) eklenir, karıştırılır ve kuru bir filtre kağıdından süzülür, temiz sıvı elde edene kadar ilk süzüntüler atılır.

6.2.7. Test tüpleri içine her bir süzüntüden 5 mL konur, 5 mL B çözeltisi (4.2) ve 0.1 mL E çözeltisi (4.5) eklenir, karıştırılır.

6.2.8. Direk güneş ışığından uzakta oda sıcaklığında 30 dakika renk gelişmeye bırakılır.

6.2.9. Spektrofotometrede 610 nm dalga boyunda örnek çözeltinin optik yoğunluğu ölçülür.

6.2.10. Eğer çözeltinin optik dansitesi madde 7'deki 20 µg fenol içeren standart çözeltinin üstünde ise işlem tekrarlanır. Eğer bu limit aşılsa, 6.1.1'e göre hazırlanan rekonstitüe süt mevcut fosfatı inaktif hale getirmek için 6.2.2'de belirtildiği gibi dikkatlice kaynatılmış süt ile uygun hacime seyreltilir.

7. Standart eğrinin hazırlanması

7.1. 4 adet 100 mL'lik ölçülü balonlara madde 4.8'e göre seyreltilmiş standart çözeltiden 1, 3, 5 ve 10 mL pipetle konulur ve su ile hacmine tamamlanır; bu çözeltiler sırasıyla mL'de 2, 6, 10 ve 20 µg fenol içerir.

7.2. 0, 2, 6, 10 ve 20 µg fenol içeren örnek serilerini elde etmek amacıyla tüplere pipetle 1 mL su ve 1'er mL her bir standart çözeltiden (7.1) konulur. 1 mL su konulan tüp, şahit değeridir.

7.3. Her bir test tüpüne 1 mL bakır (II) sülfat (4.7), 5 mL seyreltik renk tampon çözeltisi (4.6), 3 mL su ve 0.1 mL E çözeltisi (4.5) eklenir ve karıştırılır.

7.4. Tüpler direk güneş ışığından korunarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.

7.5. Spektrofotometrede 610 nm dalga boyunda tanığa karşı her bir tüpündeki çözeltinin absorpsansı ölçülür.

7.6. Madde 7.2 'de belirtilen fenol miktarlarına karşılık gelen µg absorpsan değerleri ile standart eğri oluşturulur.

8. Sonuçların açıklanması

8.1. Formül ve hesaplama metodu

8.1.1. Madde 6.2.9 'da yapılan işlem sonucunda elde edilen değer standart eğri yardımıyla bulunur.

8.1.2. Aşağıdaki formül kullanılarak 1 mL rekonstitüe sütün µg fenol miktarı fosfataz aktivitesi olarak hesaplanır.

$$\text{Fosfataz aktivitesi} = 2.4 \times P$$

P = Madde 8.1.1'e göre bulunan fenol miktarının µg değeridir.

8.1.3. Madde 6.2.10 'da belirtilen seyreltme işlemi yapıldıysa 8.1.2'deki sonuç seyreltme faktörü ile çarpılır.

8.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, rekonstitüe sütün 1 mL'sine serbest kalan fenol 2 µg'ı geçmemelidir.

Metod 8 : Fosfataz Aktivitesi Tayini (Aschaffenburg ve Mullen İşlemi)

1. Uygulama alanı amacı

Bu metod, şekerli koyulaştırılmış yağsız süt, yüksek yağlı süttozu, tam yağlı süttozu, yarım yağlı süttozu, yağsız süttozunda fosfataz aktivitesi saptanmasında kullanılır.

2. Tanım

Süttozunda fosfataz aktivitesi, ürünlerdeki var olan aktif alkali fosfatazın miktarının ölçümüdür. Tanımlanan şartlar altında 1 mL rekonstitüe sütte serbest kalan p-nitrofenolün, µg olarak miktarını ifade eder.

3. Prensiptir

Rekonstitüe süt örneği, pH 10.2'lik substrat tampon ile seyreltilir ve 37 °C'da 2 saat inkübasyona bırakılır. Örnekte her hangi bir alkali fosfataz bulunuyorsa, bu şartlar altında eklenen disodyum p-nitrofenilfosfattan p-nitrofenol serbest kalır. Serbest kalan p-nitrofenolün, yansıyan ışık kullanılarak basit bir komparatör ile standart renkli camlarla karşılaştırılarak belirlenir.

4. Çözeltiler

4.1. Sodyum karbonat- bikarbonat tampon çözeltisi: 3.5 g susuz sodyum karbonat ve 1.5 g sodyum bikarbonat suda çözülür, bir ölçülü balon içerisinde 1000 mL'ye su ile seyreltilir.

4.2. Tampon substrat: 1.5 g disodyum p-nitrofenil fosfat, sodyum karbonat-bikarbonat tampon çözelti (4.1) içinde çözülüp, 1000 mL'ye tampon çözelti (4.1) ile seyreltilir. Bu çözelti buzdolabında (+4°C) saklanırsa bir ay kadar stabildir. Fakat depolanan çözeltide renk kontrol testi yapılmalıdır. Madde 6'daki uyarılar dikkate alınmalıdır.

4.3. Durultma çözeltileri

4.3.1. Çinko sülfat çözeltisi: 30 g çinko sülfat ($ZnSO_4$) suda çözülüp, 100 mL'ye su ile seyreltilir.

4.3.2. Potasyum hekzasiyanoferrat-II çözeltisi: 17.2 g potasyum hekzasiyanoferrat-II trihidrat ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) suda çözülür ve 100 mL'ye su ile seyreltilir.

5. Cihazlar

5.1. Analitik terazi

5.2. Su banyosu, $37 \pm 1^\circ C$ 'a ayarlanabilen

5.3. Komparatör, 2'ye 25 mm hücreleri ve 1 mL sütteki μg p-nitrofenol'e karşılık gelecek şekilde kalibre edilmiş standart renkli camlara sahip özel diski bulunan.

6. İşlem

Notlar:

a) Kullandıktan sonra deney tüpleri boşaltılmalı, su ile çalkalanmalı, alkali bir deterjan içeren sıcak su ile yıkanmalı, ardından temiz sıcak musluk suyu ile tamamen durulanmalıdır. Son olarak kullanmadan önce su ile durulanıp, kurutulmalıdır.

Pipetler kullandıktan sonra temiz soğuk musluk suyu ile hemen durulanmalı ve kullanmadan önce su ile durulanıp, kurutulmalıdır.

b) Deney tüpü kapakları kullandıktan sonra hemen sıcak musluk suyu ile durulanmalı, su içinde iki dakika kaynatılmalıdır.

c) Tampon substrat çözeltisi (4.2) eğer buzdolabında $4^\circ C$ veya daha düşük sıcaklıkta tutulursa en az bir ay bozulmadan kalmalıdır. Sarı renk oluşumu görülürse bozulduğu anlaşılır. Tampon substrat çözeltisini kontrol için; kaynamış süte karşı distile su kullanılarak, 25 mm hücrede okuma yapıldığı zaman, eğer renk okuması $10 \mu g$ 'ı geçerse çözelti kullanılmamalıdır.

d) Her örnek için ayrı bir pipet kullanılır ve pipete tükürük bulaşmasından kaçınılır.

e) Deney hiçbir zaman direk güneş ışığına maruz kalmamalıdır.

6.1. Örneğin hazırlanması

10 g süttozu 90 mL su içerisinde çözülür. Süttozunu çözmek için sıcaklık $35^\circ C$ 'yi geçmemelidir.

6.2. Deney

6.2.1. 15 mL tampon substrat çözelti (4.2) temiz kuru bir deney tüpüne pipetle alınır. Sonra test edilecek rekonstitüe süt örneğinden (6.1) 2 mL alınır. Tüp kapak ile kapatılıp, karıştırılır, $37^\circ C$ 'deki su banyosuna (5.2) yerleştirilir.

6.2.2. Aynı zamanda, benzer şartlar altında 15 mL tampon substrat çözeltisi ve 2 mL kaynamış rekonstitüe süt örneği içeren kontrol tüpü su banyosuna yerleştirilir.

6.2.3. 2 saat sonra her iki tüp su banyosundan alınır. Çöktürücü olarak 0.5 mL çinko sülfat çözeltisi (4.3.1) eklenir, kapak ile kapatılır, kuvvetlice çalkalanır ve 3 dakika kadar bırakılır. Çöktürücü olarak 0.5 mL potasyum hekzasiyanoferrat-II çözeltisi (4.3.2) eklenir, karıştırılır ve katlanmış süzgeç kağıdından (5.4) süzülür ve temiz bir deney tüpü içine temiz süzüntü toplanır.

6.2.4. Süzüntü 25 mm'lik hücreye aktarılır ve komparatördeki özel disk (5.3) kullanılarak kaynamış kontrol örneği süzüntüsü ile karşılaştırılır.

7. Sonuçların açıklanması

7.1. Formül ve hesaplama metodu

Madde 6.2.4'te okunan değer, direk rekonstitüe süt örneğinin veya örneğin mL'sinde μg p-nitrofenol olarak kaydedilir.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda, aynı analizci tarafından, aynı anda veya hızlı şekilde birbiri ardına aynı örnek için yapılan iki analiz sonucu arasındaki fark, rekonstitüe sütün 1 mL'sinde serbest kalan p-nitrofenol $2 \mu g$ 'ı geçmemelidir.