

Põllumajandusministri 28.11.2014 määrus nr 113  
„Kondenspiimade ja piimapulbrite koostis- ja kvaliteedinõuded  
ning toidualase teabe esitamise nõuded,  
kondenspiimadest ja piimapulbriest proovide võtmise  
ja proovide analüüsimise meetodid”  
Lisa 11

## **PIIMAPULBRIEST FOSFATAASI AKTIIVSUSE MÄÄRAMISE MEETOD** (Sandersi ja Sageri modifitseeritud meetod)

### **1. Kasutusala**

Meetod võimaldab määrata fosfataasi aktiivsust koorepulbris, täispiimapulbris, väherasvases piimapulbris ja lõssipulbris.

### **2. Määratlus**

Fosfataasi aktiivsus selle lisa tähenduses on aktiivse aluselise fosfataasi sisaldus piimapulbris. See väljendatakse fenoolikogusena mikrogrammides ühe milliliitri piimapulbriest taastatud piima kohta selle meetodi kohaselt pulbri analüüsimise korral.

### **3. Põhimõte**

Pulbrilise piimatoote fosfataasi aktiivsus määratakse fosfataasi võime järgi vabastada dinaatriumfenüülfosfaadist fenooli. Ettenähtud tingimustel vabaneva fenooli hulk määratakse Gibbsireagendi toimel tekkiva värvi spektrofotomeetrilisel mõõtmisel.

### **4. Reagentid**

**4.1.** Baariumboraathüdroksiidi puhverlahus, mille pH on  $10,6 \pm 0,1$  temperatuuril  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (valmistamine: 25,0 g baariumhüdroksiidi  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$  lahustatakse vees ning lahuse maht viiakse 500 ml-ni. 11,0 g boorhapet  $\text{H}_3\text{BO}_3$  lahustatakse vees ning lahuse maht viiakse 500 ml-ni. Mõlemad lahused soojendatakse temperatuurini  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja segatakse kokku, segu loksutatakse ja jahutatakse toatemperatuurini. Seejärel reguleeritakse pH baariumhüdroksiidiga väärtuseni  $10,6 \pm 0,1$  ning filtreeritakse. Lahust säilitatakse tihedalt suletud mahutis. Enne kasutamist lahjendatakse puhverlahust veega vahekorras 1:1).

**4.2.** Värvilmutuspuhverlahus (valmistamine: vees lahustatakse 6,0 g naatriummetaboraati  $\text{NaBO}_2$  või 12,6 g naatriummetaboraattetraahüdraati  $\text{NaBO}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  ja 20,0 g naatriumkloriidi  $\text{NaCl}$  ning lahuse maht viiakse 1000 ml-ni).

**4.3.** Puhversubstraatlahus (valmistamine: 0,5 g dinaatriumfenüülfosfaattetraahüdraati  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{PO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$  lahustatakse 4,5 ml värvilmutuspuhverlahuses, lisatakse 2 tilka Gibbsireagenti ja jäetakse 30 minutiks seisma. Värvunud lahust ekstraheeritakse 2,5 ml butanooliga, vajaduse korral värviekstraktsiooni korraates. Pärast eraldamist jäetakse butanool kõrvale. Lahust võib säilitada külmikus mitu päeva. Enne lahuse kasutamist korratakse värvi ilmutamist ja butanooliga ekstraheerimist. 1 ml saadud lahust pipeteeritakse 100 ml mõõtekolbi ja kolb täidetakse baarium-boraathüdroksiidpuhverlahusega kuni kriipsuni. Puhversubstraatlahus valmistatakse vahetult enne kasutamist).

**4.4.** Sadesti (valmistamine: 3,0 g tsinksulfaatheptahüdraati  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ja 0,6 g vask(II)-sulfaatpentahüdraati  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  lahustatakse vees ning lahuse maht viiakse veega 100 ml-ni).

**4.5.** Gibbsireagent (valmistamine: 10 ml-s 96% etanoolis lahustatakse 0,040 g 2,6-dibromokinoon-1,4-kloroimiidi  $\text{O} \times \text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 \times \text{NCl}$ . Lahust säilitatakse külmikus tumedas klaaspudelil, värvuse muutumise korral asendatakse reagent uuega).

**4.6.** Värvilahjenduspuhverlahus (valmistamine: 10 ml värviilmutuspuhverlahust lahjendatakse mahuni 100 ml).

**4.7.** Vask(II)sulfaadilahus (valmistamine: 0,05 g vask(II)sulfaatpentahüdraati  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  lahustatakse vees ja lahuse maht viiakse veega 100 ml-ni).

**4.8.** Fenooli standardlahus, kontsentratsiooniga 0,2 g/l (valmistamine: 0,200±0,001 g puhast fenooli lahustatakse vees ja lahuse maht viiakse veega mõõtekolvis 100 ml-ni. Saadud lahust võib külmikus säilitada mitu kuud. Sellest lahusest võetakse 10 ml ning lahjendatakse veega 100 ml-ni).

**4.9.** Keedetud destilleeritud vesi.

**4.10.** Butanool.

## **5. Seadmed ja vahendid**

**5.1.** Analüütilised kaalud.

**5.2.** Veevann, mis on reguleeritud temperatuurile  $37 \pm 1$  °C.

**5.3.** Spektrofotomeeter, mis sobib mõõtmiseks lainepikkusel 610 nm.

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

**5.5.** Veevann, mis võimaldab hoida temperatuuri 100 °C.

**5.6.** Alumiiniumfoolium.

## **6. Töö käik**

**6.1.** Ettevaatusabinõuna tuleb analüüsi tegemisel vältida otsest päikesevalgust. Kasutatavad klaasnõud, korgid ja teised abivahendid, näiteks ainete eemaldamisvahendid, peavad olema väga puhtad. Soovitav on neid veega loputada ja keeta või auruga töödelda. Võimaliku fenoolisisalduse tõttu tuleb vältida plastmassist korkide ja muude esemete kasutamist. Sülje fosfaatasisisalduse tõttu tuleb hoolikalt hoiduda süljega saastamisest.

**6.2.** Pulbrist piima taastamiseks kaalutakse 10 g uuritavat proovi täpsusega 0,1 g ja lahustatakse 90 ml vees. Proovi lahustamisel ei tohi temperatuur ületada 35 °C.

**6.3.** 1 ml taastatud piima viiakse katseklaasi, lisatakse 10 ml puhversubstraatlahust, segatakse ja asetatakse katseklaas temperatuuril  $37 \pm 1$  °C olevale veevannile ning lastakse aeg-ajalt segades veevannil 60 minutit inkubeeruda. Seejärel viiakse katseklaas kohe keevale veevannile, ühtlase kuumutamise tagamiseks kaetakse katseklaas ja veevann alumiiniumfooliumiga, kuumutatakse kaks minutit ning jahutatakse külmas vees toatemperatuurini.

**6.4.** Lisatakse 1 ml sadetit, segatakse ja filtreeritakse läbi kuiva filterpaberi, jättes kõrvale esimese läbijooksu, kuni selge filtraadi saamiseni. Filtraadist viiakse 5 ml katseklaasi, lisatakse 5 ml värviilmutuspuhverlahust ja 0,1 ml Gibbsireagenti ning segatakse. Lahus jäetakse värvuse tekkimiseks 30 minutiks toatemperatuurile seisma, vältides otsest päikesevalgust.

**6.5.** Saadud lahuse optiline tihedus mõõdetakse lainepikkusel 610 nm alapunktis 6.6 kirjeldatud võrdluslahuse suhtes. Kui optiline tihedus ületab kõrgeimat punkti kalibreerimiskõveral, korratakse katset, lahjendades alapunkti 6.2 järgi taastatud piima alapunkti 6.6 järgi kuumutatud taastatud piimaga.

**6.6.** Optilise tiheduse mõõtmisel kasutatav võrdluslahus valmistatakse ühel ajal proovilahusega. Võrdluslahus valmistatakse sarnaselt proovilahuse valmistamisele, kuid alapunktis

6.3 nimetatud taastatud piim asendatakse fosfataasi inaktiveerimiseks kuumutatud taastatud piimaga. Selleks võetakse katseklaasi 1 ml alapunkti 6.2 järgi taastatud piima ning asetatakse see fosfataasi inaktiveerimiseks kohe keevale veevannile, kuumutades seda järgnevalt kahe minuti vältel. Katseklaasi ühtlase kuumutamise tagamiseks kaetakse katseklaas ja veevann alumiiniumfooliumiga. Pärast kuumutamist jahutatakse katseklaas külmas vees toatemperatuurini ning toimitakse alapunktides 6.3 ja 6.4 kirjeldatud viisil.

7. Kalibreerimisgraafiku koostamiseks valmistatakse kalibreerimislahused. Nelja 100 ml-sse mõõtekolbi pipeteeritakse vastavalt 1, 3, 5 ja 10 ml fenooli standardlahust ning lisatakse vett mahuni 100 ml, saadud lahused sisaldavad vastavalt 2, 6, 10 ja 20 µg fenooli ühes milliliitris. Võetakse 5 katseklaasi, millest ühte pipeteeritakse 1 ml vett ning ülejäänud nelja vastavalt 1 ml igast saadud lahusest, saades seeria katseklaasidest, mis sisaldavad 0, 2, 6, 10 ja 20 µg fenooli. Seejärel lisatakse igasse katseklaasi 1 ml vask(II)sulfaadilahust, 5 ml värvilahjenduspuhverlahust, 3 ml vett ja 0,1 ml Gibbsireagenti ning segatakse. Lahused jäetakse värvuse tekkimiseks 30 minutiks toatemperatuurile seisma, vältides otsest päikesevalgust. Fenooli sisaldavate lahuste optiline tihedus mõõdetakse fenoolita lahuse suhtes. Koostatakse graafik, mille abstsisssteljele kantakse fenoolikogused mikrogrammides ning ordinaatteljele neile vastavad optilise tiheduse väärtused.

## 8. Tulemuste esitamine

8.1. Proovilahuse fenoolisisaldus mikrogrammides leitakse kalibreerimisgraafiku abil vastavalt proovilahuse optilisele tihedusele. Fosfataasi aktiivsus väljendatuna fenooli kogusena mikrogrammides 1 ml alapunkti 6.2 järgi taastatud piima kohta arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\text{fosfataasi aktiivsus} = 2,4 \times P,$$

kus  $P$  on kalibreerimisgraafikult leitud proovilahuse fenoolikogus mikrogrammides.

Kui proovilahust lahjendati, korrutatakse saadud tulemus lahjendusteguriga.

8.2. Kahe üheaegse või järjestikuse sama proovi määramise tulemuste erinevus võib olla kuni 2 µg vabanenud fenooli 1 ml alapunkti 6.2 järgi taastatud piima kohta samades tingimustes sama analüüsitegija määratuna.