31979L1067

PIRMOJI KOMISIJOS DIREKTYVA

1979 m. lapkričio 13 d.

nustatanti tam tikro žmonėms vartoti skirto iš dalies arba visiškai dehidratuoto pieno Bendrijos analizės metodus

(79/1067/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1975 m. gruodžio 18 d. Tarybos direktyvą 76/118/EEB dėl valstybių narių įstatymų, susijusių su iš dalies arba visiškai dehidratuotu konservuotu pienu, skirtu vartoti žmonėms ([1]), ypač į jos 11 straipsnį,

kadangi Direktyvos 76/118/EEB 11 straipsnyje reikalaujama, kad iš dalies arba visiškai dehidratuoto konservuoto pieno sudėtis būtų tikrinama Bendrijos analizės metodais;

kadangi pageidautina patvirtinti pirmąją metodų seriją, kurių tyrimai jau yra baigti;

kadangi šioje direktyvoje numatytos priemonės atitinka Maisto produktų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės turi imtis visų būtinų priemonių, užtikrinant, kad I priede išvardytų kriterijų patikrinimui reikalinga analizė būtų atliekama pagal II priede aprašytus metodus.

2 straipsnis

Kai nurodomi alternatyvūs vieno nustatymo metodai, bandinys gali būti analizuojamas pagal bet kurį metodą. Bandymo ataskaitoje turi būti pažymėta, kuris iš II priede nurodytų bandymo metodų buvo naudotas.

3 straipsnis

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję per 18 nuo šios direktyvos paskelbimo, įgyvendina šią direktyvą.

4 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1979 m. lapkričio 13 d.

Komisijos vardu

Étienne DAVIGNON

Komisijos narys

([1]) OL L 24, 1976 1 30, p. 49.

I PRIEDAS

PIRMOSIOS TAM TIKRO ŽMONĖMS VARTOTI SKIRTO IŠ DALIES ARBA VISIŠKAI DEHIDRATUOTO PIENO BENDRIJOS ANALIZĖS METODŲ DIREKTYVOS TAIKYMO SRITIS

I. **Bendrosios nuostatos**

II. **Sausųjų medžiagų kiekio nustatymas:**

— labai riebaus sutirštinto nesaldinto pieno (naudojant 1 metodą, II priedas),

— sutirštinto nesaldinto pieno (naudojant 1 metodą, II priedas),

— sutirštinto iš dalies nugriebto nesaldinto pieno (naudojant 1 metodą, II priedas),

— sutirštinto lieso nesaldinto pieno (naudojant 1 metodą, II priedas),

— sutirštinto saldinto pieno (naudojant 1 metodą, II priedas),

— sutirštinto iš dalies nugriebto saldinto pieno (naudojant 1 metodą, II priedas),

— sutirštinto lieso saldinto pieno (naudojant 1 metodą, II priedas).

III. **Drėgmės nustatymas:**

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių (naudojant 2 metodą, II priedas),

— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių (naudojant 2 metodą, II priedas),

— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių (naudojant 2 metodą, II priedas),

— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių (naudojant 2 metodą, II priedas).

IV. **Riebalų kiekio nustatymas:**

— sutirštinto labai riebaus nesaldinto pieno (naudojant 3 metodą, II priedas),

— sutirštinto nesaldinto pieno (naudojant 3 metodą, II priedas),

— sutirštinto iš dalies nugriebto nesaldinto pieno (naudojant 3 metodą, II priedas),

— sutirštinto lieso nesaldinto pieno (naudojant 3 metodą, II priedas),

— sutirštinto saldinto pieno (naudojant 3 metodą, II priedas),

— sutirštinto iš dalies nugriebto saldinto pieno (naudojant 3 metodą, II priedas),

— sutirštinto lieso saldinto pieno (naudojant 3 metodą, II priedas),

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių (naudojant 4 metodą, II priedas),

— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių (naudojant 4 metodą, II priedas),

— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių (naudojant 4 metodą, II priedas),

— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių (naudojant 4 metodą, II priedas).

V. **Sacharozės kiekio nustatymas:**

— sutirštinto saldinto pieno (naudojant 5 metodą, II priedas),

— sutirštinto iš dalies nugriebto saldinto pieno (naudojant 5 metodą, II priedas),

— sutirštinto lieso saldinto pieno (naudojant 5 metodą, II priedas).

VI. **Pieno rūgšties ir laktatų nustatymas:**

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių (naudojant 6 metodą, II priedas),

— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių (naudojant 6 metodą, II priedas),

— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių (naudojant 6 metodą, II priedas),

— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių (naudojant 6 metodą, II priedas).

VII. **Fosfatazės aktyvumo nustatymas:**

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių (naudojant 7 arba 8 metodą, II priedas),

— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių (naudojant 7 arba 8 metodą, II priedas),

— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių (naudojant 7 arba 8 metodą, II priedas),

— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių (naudojant 7 arba 8 metodą, II priedas).

II PRIEDAS

TAM TIKRO ŽMONĖMS VARTOTI SKIRTO IŠ DALIES ARBA VISIŠKAI DEHIDRATUOTO KONSERVUOTO PIENO SUDĖTIES ANALIZĖS METODAI

BENDROSIOS NUOSTATOS

1. MĖGINIO PARUOŠIMAS CHEMINEI ANALIZEI

1.1. **Labai riebus nesaldintas sutirštintas pienas**
Nesaldintas sutirštintas pienas
Nesaldintas sutirštintas iš dalies nugriebtas pienas
Nesaldintas sutirštintas liesas pienas

Uždaryta skardinė supurtoma ir pavartoma. Skardinė atidaroma ir pienas lėtai perpilamas į kitą hermetiškai uždaromą indą, pakartotino perpylimo metu sumaišant. Įsitikinama, kad visi prie skardinės sienelių ir dugno prikibę riebalų ir pieno likučiai įmaišyti į mėginį. Indas uždaromas. Jeigu turinys nevienalytis, indas pašildomas 40 °C temperatūros vandens vonioje. Kas 15 minučių energingai supurtoma. Po dviejų valandų indas ištraukiamas iš vandens vonios ir jam leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros. Nuimamas dangtelis ir indelio turinys gerai sumaišomas šaukštu arba mentele (jeigu atsiskyrė riebalai, bandinys neturėtų būti tiriamas). Indas laikomas šaltai.

1.2. **Saldintas sutirštintas pienas**
Saldintas sutirštintas iš dalies nugriebtas pienas
Saldintas sutirštintas liesas pienas

Skardinės: Uždaryta skardinė šildoma 30–40 °C temperatūros vandens vonioje apie 30 minučių. Skardinė atidaroma ir turinys gerai sumaišomas mentele arba šaukštu, darant judesius aukštyn, žemyn ir ratu, kad būtų gautas vienodas viršutinių ir apatinių sluoksnių mišinys. Įsitikinama, kad prie skardinės sienelių ir dugno prilipę pieno likučiai įmaišyti į bandinį. Turinys perpilamas į kitą indą (su sandariu dangteliu). Indas uždaromas ir laikomas šaltai.

Tūbelės: Galas nukerpamas ir turinys supilamas į indą su sandariu dangteliu. Po to tūbelė perkerpama išilgai. Produktas, prilipęs prie vidinės pusės, nugramdomas ir rūpestingai sumaišomas su visu turiniu. Indas laikomas šaltai.

1.3. **Sausasis labai riebus pienas arba labai riebaus pieno milteliai**
Sausasis nenugriebtas pienas arba nenugriebto pieno milteliai
Sausasis iš dalies nugriebtas pienas arba iš dalies nugriebto pieno milteliai
Sausasis liesas pienas arba lieso pieno milteliai

Pieno milteliai perpilami į švarų, sausą indą (su sandariu dangteliu), kurio tūris du kartus didesnis už miltelių užimamą tūrį. Indas tuoj pat uždaromas ir pieno milteliai gerai išmaišomi, keletą kartų purtant ir vartant indą. Kad drėgmės absorbcija būtų kuo mažesnė, ruošiant bandinį nereikėtų palikti pieno miltelių atvirame ore.

2. REAGENTAI

2.1. **Vanduo**

2.1.1. Tirpinimo, skiedimo arba plovimo tikslams turi būti naudojamas tik distiliuotas arba bent ekvivalentiško grynumo demineralizuotas vanduo.

2.1.2. Sąvokos „ištirpinimas“, „tirpinimas“ arba „atskiedimas“ be kitų nuorodų suprantamos kaip „ištirpinimas vandenyje“, „tirpinimas vandenyje“ ir „atskiedimas vandeniu“.

2.2. **Chemikalai**

Visi naudojami chemikalai turi analiziškai gryni reagentai, išskyrus tuos atvejus, kai nurodoma kitaip.

3. ĮRANGA

3.1. **Įrangos sąrašai**

Įrangos sąrašuose nurodoma tik specialios paskirties įranga.

3.2. **Analizinės svarstyklės**

Tai – svarstyklės, galinčios sverti 0,1 mg tikslumu.

4. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

4.1. **Procentų apskaičiavimas**

Išskyrus tuos atvejus, kai nurodyta kitaip, rezultatai turi būti apskaičiuojami laboratorinio bandinio masės procentais.

4.2. **Reikšminių skaitmenų skaičius**

Rezultate reikšminių skaitmenų turi būti ne daugiau, nei leidžia taikomo analizės metodo tikslumas.

5. BANDYMO PROTOKOLAS

Bandymo protokole turi būti nurodytas taikomas analizės metodas ir gauti rezultatai. Be to, jame turi būti paminėtos visos (ir neprivalomos) metodikos, analizės metode nenurodytos sąlygos, taip pat visos aplinkybės, kurios galėjo daryti poveikį gautam rezultatui.

Bandymo protokole turi būti visa informacija, reikalinga bandiniui identifikuoti.

1 METODAS: SAUSŲJŲ MEDŽIAGŲ KIEKIO NUSTATYMAS

(džiovinimo spintoje esant 99 °C temperatūrai)

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatomas sausųjų medžiagų kiekis:

— nesaldinto sutirštinto labai riebaus pieno,
— nesaldinto sutirštinto pieno,
— nesaldinto sutirštinto iš dalies nugriebto pieno,
— nesaldinto sutirštinto lieso pieno,
— saldinto sutirštinto pieno,
— saldinto sutirštinto iš dalies nugriebto pieno,
— saldinto sutirštinto lieso pieno.

2. APIBRĖŽIMAS

Sutirštinto pieno sausųjų medžiagų kiekis: sausųjų medžiagų kiekis nustatytas apibūdintu metodu.

3. METODO ESMĖ

Žinomas bandinio kiekis skiedžiamas vandeniu, sumaišomas su smėliu ir džiovinamas 99 °C ± 1 °C temperatūroje. Po džiovinimo likusi masė yra sausųjų medžiagų masė ir apskaičiuojama bandinio masės procentais.

4. REAGENTAI

Kvarcinis smėlis arba jūros smėlis, apdorotas druskos rūgštimi (dalelių dydis: 0,18–0,5 mm, kurios pereina per 500 mikronų sietą ir sulaikomos 180 mikronų sietu). Jis turi atitikti šį kontrolinį bandymą:

25 g smėlio 2 valandas kaitinama džiovinimo spintoje (5.3), kaip aprašyta 6.1–6.3 punktuose. Įpilama 5 ml vandens, vėl kaitinama džiovinimo spintoje 2 valandas, atšaldoma ir vėl pasveriama. Dviejų svėrimų metu nustatytų masių skirtumas turi neviršyti 0,5 mg.

Prireikus smėlis 3 dienas apdorojamas 25 % druskos rūgšties tirpalu, retkarčiais pamaišant druskos rūgšties tirpalu užpiltą smėlį. Plaunama vandeniu tol, kol pranyksta rūgštinė reakcija arba nelieka chloro jonų. Išdžiovinama 160 °C temperatūroje ir vėl patikrinama, kaip aprašyta pirmiau.

5. ĮRANGA

5.1. Analizinės svarstyklės

5.2. Metaliniai biuksai, geriau iš nikelio, aliuminio arba nerūdijančio plieno. Biuksai turi turėti labai gerai priglundančius dangtelius, kuriuos galima lengvai nuimti. Tinkami matmenys yra šie: skersmuo 60–80 mm ir aukštis apie 25 mm.

5.3. Gerai ventiliuojama, termostatiškai reguliuojama, atmosferinio slėgio džiovinimo spinta, kurioje nustatoma (99 ± 1)°C temperatūra. Temperatūra turėtų būti vienoda visoje džiovinimo spintoje.

5.4. Eksikatorius, pripildytas naujai aktyvuotu silicio geliu su vandens kiekio indikatoriumi arba ekvivalentiško desikanto.

5.5. Stiklinės lazdelės, suplotu vienu galu ir tokio ilgio, kad tilptų metalinių biuksų (5.2) viduje.

5.6. Vandens vonia, virinimui.

6. PROCEDŪRA

6.1. Į biuksą (5.2) pasveriama apie 25 g smėlio (4) ir įdedama trumpa stiklinė lazdelė (5.5).

6.2. Neuždengtas biuksas su turiniu bei dangtelis įdedami į džiovinimo spintą (5.3) ir kaitinami dvi valandas.

6.3. Biuksas vėl uždengiamas dangteliu ir perdedamas į eksikatorių (5.4). Leidžiama jam atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama 0,1 mg tikslumu (M_0).

6.4. Smėlis sustumiamas į vieną biukso pusę. Į tuščią vietą įdedama apie 1,5 g saldinto sutirštinto pieno ir 3,0 g nesaldinto sutirštinto pieno bandinio. Biuksas vėl uždengiamas ir pasveriamas 0,1 mg tikslumu (M_1).

6.5. Dangtelis nuimamas, įpilama 5 ml vandens ir stikline lazdele sumaišomi skysčiai, po to, smėlis ir skystoji dalis. Lazdelė paliekama biukse.

6.6. Biuksas įstatomas į verdančio vandens vonią (5.6) ir paliekamas joje, kol išgaruoja vanduo; tai paprastai trunka 20 minučių. Retkarčiais mišinys pamaišomas lazdele, kad masė gerai vėstų ir džiūdama nesustingtų į gabalą. Lazdelė paliekama biukse.

6.7. Biuksas ir dangtelis įdedami į džiovinimo spintą ir laikomi pusantros valandos.

6.8. Biuksas vėl uždengiamas dangteliu ir perdedamas į eksikatorių (5.4), jam leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.9. Biuksas ir dangtelis dedami atgal į džiovinimo spintą, biuksas atidengiamas ir kaitinamas kartu su dangteliu dar valandą.

6.10. Pakartojama 6.8 aprašyta procedūra.

6.11. 6.9 ir 6.10 aprašyta procedūra kartojama tol, kol dviejų vienas po kito atliekamų svėrimų rezultatų skirtumas bus mažesnis kaip 0,5 mg arba kol masė padidės. Jeigu masė padidėja, skaičiavimui (7.1) naudojama mažiausia masė. Paskutinė užfiksuota masė žymima M_2, g.

7. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

7.1. **Apskaičiavimo metodas**

Sausųjų medžiagų kiekis, paskaičiuojamas bandinio masės procentais, pagal formulę:

$$\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

kur:

M_0 = biukso, dangtelio ir smėlio masė, g, atlikus 6.3 aprašytą procedūrą;

M_1 = biukso, dangtelio, smėlio ir bandinio masė, g, atlikus 6.4 aprašytą procedūrą;

M_2 = biukso, dangtelio, smėlio ir išdžiovinto bandinio masė, g, atlikus 6.11 aprašytą procedūrą.

7.2. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, kurias tuo pat metu arba vieną po kitos tomis pačiomis sąlygomis atlieka tas pats analitikas, rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,2 g sausųjų medžiagų 100 g produkto.

8. PIENO BENDROJO SAUSŲJŲ MEDŽIAGŲ KIEKIO IR NERIEBALINIŲ PIENO SAUSŲJŲ MEDŽIAGŲ KIEKIO APSKAIČIAVIMAS

8.1. Saldinto sutirštinto pieno bendrasis pieno sausųjų medžiagų kiekis yra:

Sausosios medžiagos kiekis (gautas pagal 1 metodą, II priedas) atėmus sacharozės kiekį (gautą pagal 5 metodą, II priedas).

8.2. Saldinto sutirštinto pieno neriebalinių pieno sausųjų medžiagų kiekis yra:

Sausosios medžiagos kiekis (gautas pagal 1 metodą, II priedas) atėmus sacharozės kiekį (gautą pagal 5 metodą, II priedas) ir riebalų kiekį (gautą pagal 3 metodą, II priedas).

8.3. Nesaldinto sutirštinto pieno neriebalinių pieno sausųjų medžiagų kiekis yra:

Sausosios medžiagos kiekis (gautas pagal 1 metodą, II priedas) atėmus riebalų kiekį (gautą pagal 3 metodą, II priedas).

2 METODAS: DRĖGMĖS NUSTATYMAS

(džiovinimo spintoje, esant 102 °C temperatūrai)

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatomas masės nuostolis išdžiovinus:

— sausąjį labai riebų pieną arba labai riebaus pieno miltelius,
— sausąjį nenugriebtą pieną arba nenugriebto pieno miltelius,
— sausąjį iš dalies nugriebtą pieną arba iš dalies nugriebto pieno miltelius,
— sausąjį liesą pieną arba lieso pieno miltelius.

2. APIBRĖŽIMAS

Drėgmės kiekis: masės nuostolis, gautas džiovinant apibūdintu metodu.

3. METODO ESMĖ

Bandinio tiriamosios dalies liekamoji masė nustatoma išdžiovinus ją atmosferos slėgyje iki pastovios masės, džiovinimo spintoje esant 102 °C ± 1 °C temperatūrai. Masės nuostolis apskaičiuojamas bandinio masės procentais.

4. ĮRANGA

4.1. Analizinės svarstyklės

4.2. Biuksai, geriau iš nikelio, aliuminio, nerūdijančio plieno arba stiklo. Biuksai turi turėti labai gerai priglundančius dangtelius, kuriuos galima lengvai nuimti. Tinkami matmenys yra šie: skersmuo 60–80 mm ir aukštis apie 25 mm.

4.3. Gerai ventiliuojama, termostatiškai reguliuojama, atmosferinio slėgio džiovinimo spinta, kurioje nustatoma 102 ± 1 °C temperatūra. Temperatūra turėtų būti vienoda visoje džiovinimo spintoje.

4.4. Eksikatorius, pripildytas naujai aktyvuotu silicio geliu su vandens kiekio indikatoriumi arba ekvivalentiško desikanto.

5. PROCEDŪRA

5.1. Biuksas (4.2) atidengiamas, kartu su dangteliu įdedamas į džiovinimo spintą (4.3) ir kaitinamas apie valandą.

5.2. Biuksas vėl uždengiamas ir perdedamas į eksikatorių (4.4). Leidžiama jam atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama 0,1 mg tikslumu (M_0).

5.3. Į biuksą įdedama apytiksliai 2 g sausojo pieno bandinio, biuksas uždengiamas dangteliu ir kuo greičiau tiksliai pasveriamas 0,1 mg tikslumu (M_1).

5.4. Biuksas atidengiamas ir kartu su dangteliu įdedamas dviem valandom į džiovinimo spintą.

5.5. Biuksas vėl uždengiamas ir perkeliamas į eksikatorių, jam leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir kuo greičiau tiksliai pasveriama 0,1 mg tikslumu.

5.6. Biuksas atidengiamas ir kartu su dangteliu kaitinamas džiovinimo spintoje vieną valandą.

5.7. Pakartojama 5.5 aprašyta procedūra.

5.8. 5.6 ir 5.5 aprašyta procedūra kartojama tol, kol dviejų vienas po kito atliekamų svėrimų rezultatų skirtumas neviršija 0,5 mg arba kol masė padidėja. Jeigu masė padidėja, skaičiavimams (6.1) naudojama mažiausia gauta masė. Paskutinis užfiksuotas svoris žymimas M_2, g.

6. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

6.1. **Apskaičiavimo metodas**

Masės nuostoliai, gauti džiovinant bandinį, išreikšti masės procentais, apskaičiuojami pagal formulę:

$$\frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

kur:

M_0 = biukso ir jo dangtelio masė, g, atlikus 5.2 aprašytą procedūrą;

M_1 = biukso, jo dangtelio ir bandinio masė, g, atlikus 5.3 aprašytą procedūrą;

M_2 = biukso, jo dangtelio ir galutinio bandinio masė, g, atlikus 5.5 aprašytą procedūrą.

6.2. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, kurias tuo pat metu arba vieną po kitos tomis pačiomis sąlygomis atlieka tas pats analitikas, rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,1 g drėgmės 100 g produkto.

3 METODAS: RIEBALŲ KIEKIO SUTIRŠTINTAME PIENE NUSTATYMAS (RÖSE–GOTTLIEB METODAS)

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatomas riebalų kiekis:

— nesaldinto sutirštinto labai riebaus pieno,
— nesaldinto sutirštinto pieno,
— nesaldinto sutirštinto iš dalies nugriebto pieno,
— nesaldinto sutirštinto lieso pieno,
— saldinto sutirštinto pieno,
— sutirštinto iš dalies nugriebto saldinto pieno,
— saldinto sutirštinto lieso pieno.

2. APIBRĖŽIMAS

Sutirštinto pieno riebalų kiekis: riebalų kiekis, nustatytas apibūdintu metodu.

3. METODO ESMĖ

Riebalų kiekis Röse–Gottlieb metodu nustatomas iš bandinio amoniakinio alkoholinio tirpalo ekstrahuojant riebalus dietilo eteriu ir petroleteriu, po to tirpiklius išgarinant ir likutį pasveriant bei apskaičiuojant bandinio masės procentais.

4. REAGENTAI

Visi reagentai turėtų atitikti reikalavimus, nurodytus tuščiajame bandyme (6.1). Prireikus reagentai gali būti perdistiliuoti kartu su apie 1 g sviesto riebalų 100 ml tirpiklio.

4.1. Amoniako tirpalas, apie 25 % (masės) NH_3 (20 °C temperatūroje tankis apytiksliai 0,91 g/ml) arba stipresnis žinomos koncentracijos tirpalas.

4.2. Etanolis, (96 ± 2) % (tūrį) arba jeigu šio negaunama, etanolis denatūruotas metanoliu, etilmetilketonas arba petroleteris.

4.3. Dietilo eteris, be peroksidų:

1 pastaba: Peroksidams patikrinti į mažą stiklinį užkemšamą, iš anksto eteriu perskalautą cilindrą įpilama 10 ml eterio ir 1 ml naujai paruošto 10 % kalio jodido tirpalo. Supurtoma ir paliekama vienai minutei. Visuose sluoksniuose neturėtų būti geltonos spalvos.

2 pastaba: Dietilo eterį galima išlaikyti be peroksidų įdedant į jį drėgną cinko foliją, kuri vieną minutę buvo visa panardinta į atskiestą parūgštintą vario sulfato tirpalą ir paskui nuplauta vandeniu. 1 litrui naudojama apie 8 000 mm^2 cinko folijos, sukarpytos tokio ilgio juostelėmis, kad siektų bent iki pusės indo.

4.4. Petroleteris, kurio virimo temperatūra 30–60 °C.

4.5. Sumaišytas tirpiklis, paruošiamas prieš pat naudojimą, sumaišant lygius dietilo eterio (4.3) ir petroleterio (4.4) tūrius (ten, kur nurodyta naudoti sumaišytą tirpiklį, jį galima pakeisti arba dietilo eteriu, arba petroleteriu).

5. ĮRANGA

5.1. Analizinės svarstyklės

5.2. Tinkami ekstrahavimo mėgintuvėliai arba kolbos su šlifuotais stikliniais ar kitokiais kamščiais, kurių neveikia naudojami tirpikliai.

5.3. Kolbos, plonasienės ir plokščiadugnės, 150 ir 250 ml talpos.

5.4. Gerai ventiliuojama, termostatiškai reguliuojama, atmosferinio slėgio džiovinimo spinta, kurioje nustatoma 102 ± 1 °C temperatūra.

5.5. Granulės, neleidžiančios kunkuliuoti, be riebalų, neporėtos, netrapios naudojant, pvz., stikliniai rutuliukai arba silicio karbido gabaliukai (šių medžiagų naudojimas nėra būtinas, žiūrėti 6.2.1 punktą).

5.6. Sifonas, įstatomas į ekstrahavimo mėgintuvėlius.

5.7. Centrifuga (nebūtina).

6. PROCEDŪRA

6.1. **Tuščiasis bandymas**

Nustatant riebalų kiekį bandinyje, tuo pačiu metu atliekamas ir tuščiasis bandymas su 10 ml vandens, naudojant tą patį ekstrahavimo įrangos tipą, tuos pačius tų pačių reagentų kiekius ir taikant tą pačią, toliau aprašytą, metodiką, išskyrus 6.2.2 punktą. Jeigu tuščiojo bandymo rezultatas didesnis kaip 0,5 mg, reagentai turėtų būti patikrinti ir negrynas reagentas arba reagentai turėtų būti išgryninti arba pakeisti.

6.2. **Analizė**

6.2.1. Džiovinimo spintoje (5.4) kolba (5.3) (jeigu reikia, kartu su trupučiu granulių nuo kunkuliavimo (5.5), kad sušvelnintų virimą garinant tirpiklius) džiovinama nuo pusės iki valandos. Kolbai leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir atvėsusi kolba pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.2.2. Paruoštas bandinys sumaišomas ir nedelsiant 1 mg tikslumu pasveriama 2–2,5 g saldinto produkto bandinio arba 4–5 g nesaldinto produkto bandinio tiesiai į ekstrahavimo indą (5.2) arba pagal svorių skirtumą į jį perpilamas pasvertas bandinys. Įpilama iki 10,5 ml vandens ir, silpnai šildant (40–50 °C), švelniai purtoma, kol produktas visiškai disperguojamas. Bandinys turi būti visiškai disperguotas, kitu atveju analizė turėtų būti kartojama.

6.2.3. Įpilama 1,5 ml amoniako (25 %) (4.1) arba atitinkamas kiekis stipresnio tirpalo ir gerai išmaišoma.

6.2.4. Įpilama 10 ml etanolio (4.2) ir skysčiai atsargiai, bet gerai sumaišomi neužkimštame inde.

6.2.5. Įpilama 25 ml dietilo eterio (4.3). Atvėsinama tekančiu vandeniu. Indas užkemšamas ir energingai purtoma ir pakartotinai vartoma vieną minutę.

6.2.6. Atsargiai ištraukiamas kamštis ir įpilama 25 ml petroleterio (4.4), keliais pirmaisiais mililitrais perplaunamas kamštis ir indo kakliuko vidinė dalis, leidžiant nuoplovom tekėti į indą. Vėl užkemšama ir pakartotinai purtoma bei vartoma 30 sekundžių. Jeigu bus centrifuguojama pagal 6.2.7 punktą, nereikia purtyti labai energingai.

6.2.7. Indui leidžiama pastovėti, kol viršutinis skysčio sluoksnis nuskaidrėja ir aiškiai atsiskiria nuo vandens sluoksnio. Atskiriama gali būti centrifuguojant (5.7).

Pastaba:
Jeigu naudojama centrifuga, kurią suka ne trifazis motoras, gali pasirodyti kibirkštis, todėl reikia pasirūpinti, kad būtų išvengta sprogimo arba neužsidegtų eterio garai, kylantys, pavyzdžiui, iš sudužusio mėgintuvėlio.

6.2.8. Kamštis ištraukiamas, jis ir indo kakliuko vidinė dalis perplaunami keliais mililitrais maišyto tirpiklio (4.5) ir nuoplovoms leidžiama tekėti į indą. Į paruoštą kolbą (6.2.1) atsargiai nupilama kuo daugiau paviršinio sluoksnio dekantuojant arba naudojant sifoną (5.6).

Pastaba:
Jeigu nupilama nenaudojant sifono, gali reikėti įpilti truputį vandens, kad pakiltų tarpfazinė riba ir būtų lengviau dekantuoti.

6.2.9. Keliais mililitrais sumaišyto tirpiklio (4.5) perplaunama indo kakliuko vidinė ir išorinės dalys arba sifono viršutinė ir apatinė dalys. Nuoplovoms nuo indo išorinės dalies leidžiama tekėti į kolbą ir nuoplovoms nuo kakliuko vidinės dalies bei sifono – į ekstrahavimo indą.

6.2.10. Antroji ekstrakcija atliekama, kartojant procedūrą, aprašytą 6.2.5–6.2.9 imtinai, bet naudojant tik 15 ml dietilo eterio ir 15 ml petroleterio.

6.2.11. Trečioji ekstrakcija atliekama, kartojant 6.2.10 aprašytą procedūrą, bet praleidžiant paskutinį perplovimą (6.2.9).

Pastaba:
Analizuojant nesaldinto sutirštinto lieso pieno ir saldinto sutirštinto lieso pieno bandinius, trečiąją ekstrakciją atlikti neprivaloma.

6.2.12. Atsargiai nugarinama arba nudistiliuojama kuo daugiau tirpiklio (įskaitant etanolį). Jeigu kolba mažos talpos, po kiekvienos ekstrakcijos reikės, kaip ir ankščiau, pašalinti truputį tirpiklio.

6.2.13. Kai nebejaučiama tirpiklio kvapo, kolba padedama ant šono džiovinimo spintoje ir kaitinama vieną valandą.

6.2.14. Kolba išimama iš džiovinimo spintos, jai leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.2.15. Kartojamos 6.2.13 ir 6.2.14 aprašytos procedūros, kaitinant 30–60 minučių, kol dviejų vienas po kito atliekamų svėrimų rezultatų skirtumas bus ne didesnis kaip 0,5 mg arba kol masė padidės. Jeigu masė padidėjo, skaičiavimuose (7.1) naudojama mažiausia masė. Paskutinė užfiksuota masė žymima M_1, g.

6.2.16. Kad išekstrahuota medžiaga visiškai ištirptų, įpilama 15–25 ml petroleterio. Kolba švelniai pašildoma ir sukama, kol ištirpsta visi riebalai.

6.2.16.1. Jeigu visa išekstrahuota medžiaga yra ištirpusi petroleteryje, riebalų masė yra lygi 6.2.1 ir 6.2.15 punktuose aprašytose procedūrose nustatytų masių skirtumui.

6.2.16.2. Jeigu yra bent truputis neištirpusios medžiagos arba jeigu tuo abejojama, riebalai visiškai išekstrahuojami pakartotinai plaunant šiltu petroleteriu ir prieš kiekvieną dekantavimą leidžiant neištirpusioms medžiagoms nusėsti. Kolbos kakliuko išorinė dalis perplaunama 3 kartus. Ant šono padėta kolba kaitinama džiovinimo spintoje vieną valandą, kaip ir anksčiau (6.2.1), jai leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama 0,1 mg tikslumu. Riebalų masė yra masės, gautos 6.2.15 punkte, ir šios galutinės masės skirtumas.

7. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

7.1. **Apskaičiavimas**

Išekstrahuotų riebalų masė, g, apskaičiuojama pagal formulę:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

o bandinio riebalų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

kur:

M_1 = kolbos M su riebalais masė, g, atlikus 6.2.15 punkte aprašytą procedūrą;

M_2 = kolbos M masė, g, atlikus 6.2.1 punkte aprašytą procedūrą, o medžiagoms neištirpus arba abejotinu atveju – atlikus 6.2.16.2 aprašytą procedūrą;

B_1 = tuščiojo bandymo kolbos B masė, g, atlikus 6.2.15 punkte aprašytą procedūrą;

B_2 = kolbos B masė, g, atlikus 6.2.1 punkte aprašytą procedūrą, o medžiagoms neištirpus arba abejotinu atveju – atlikus 6.2.16.2 aprašytą procedūrą;

S = naudoto bandinio masė, g.

7.2. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, kurias tuo pat metu arba vieną po kitos tomis pačiomis sąlygomis atlieka tas pats analitikas, rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,05 g riebalų 100 g produkto.

4 METODAS: SAUSOJO PIENO RIEBALŲ KIEKIO NUSTATYMAS (RÖSE – GOTTLIEB METODAS)

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatomas riebalų kiekis:

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių,
— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių,
— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių,
— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių.

2. APIBRĖŽIMAS

Sausojo pieno riebalų kiekis: riebalų kiekis, nustatytas apibūdintu metodu.

3. METODO ESMĖ

Riebalų kiekis nustatomas Röse–Gottlieb metodu, iš bandinio amoniakinio alkoholinio tirpalo ekstrahuojant riebalus dietilo eteriu ir petroleteriu, po to tirpiklius išgarinant ir likutį pasveriant bei apskaičiuojant bandinio masės procentais.

4. REAGENTAI

Visi reagentai turėtų atitikti reikalavimus, nurodytus tuščiajame bandinyje (6.1). Jeigu reikia, reagentai gali būti perdistiliuoti kartu su apie 1 g sviesto riebalų 100 ml tirpiklio.

4.1. Amoniako tirpalas, apie 25 % (masės) NH_3 (20 °C temperatūroje tankis apytiksliai 0,91 g/ml) arba stipresnis žinomos koncentracijos tirpalas.

4.2. Etanolis, 96 ± 2 % (tūrio) arba jeigu šio negaunama, etanolis denatūruotas metanoliu, etilmetilketonas arba petroleteris.

4.3. Dietilo eteris, be peroksidų:

1 pastaba: Peroksidams patikrinti į mažą stiklinį užkemšamą, iš anksto eteriu perskalautą cilindrą įpilama 10 ml eterio ir 1 ml naujai paruošto 10 % kalio jodido tirpalo. Supurtoma ir paliekama vienai minutei. Visuose sluoksniuose turėtų nebūti geltonos spalvos.

2 pastaba: Dietilo eterį galima išlaikyti be peroksidų įdedant į jį drėgną cinko foliją, kuri vieną minutę buvo visa panardinta į atskiestą parūgštintą vario sulfato tirpalą ir paskui nuplauta vandeniu. 1 litrui naudojama apie 8 000 mm^2 cinko folijos, sukarpytos tokio ilgio juostelėmis, kad siektų bent iki pusės indo.

4.4. Petroleteris, kurio virimo temperatūra 30–60 °C.

4.5. Sumaišytas tirpiklis, paruošiamas prieš pat naudojimą, sumaišant lygius dietilo eterio (4.3) ir petroleterio (4.4) tūrius (ten, kur nurodyta naudoti sumaišytą tirpiklį, jį galima pakeisti arba dietilo eteriu, arba petroleteriu).

5. ĮRANGA

5.1. Analizinės svarstyklės

5.2. Tinkami ekstrahavimo mėgintuvėliai arba kolbos su šlifuotais stikliniais ar kitokiais kamščiais, kurių neveikia naudojami tirpikliai.

5.3. Kolbos, plonasienės ir plokščiadugnės, 150 ir 250 ml talpos.

5.4. Gerai ventiliuojama, termostatiškai reguliuojama, atmosferinio slėgio džiovinimo spinta, kurioje nustatoma 102 ± 1 °C temperatūra.

5.5. Granulės, neleidžiančios kunkuliuoti, be riebalų, neporėtos, netrapios naudojant, pvz.: stikliniai rutuliukai arba silicio karbido gabaliukai (šių medžiagų naudojimas nėra būtinas, žiūrėti punktą 6.2.1).

5.6. Vandens vonia, kurios temperatūra nuo 60 iki 70 °C.

5.7. Sifonas, įstatomas į ekstrahavimo mėgintuvėlius.

5.8. Centrifuga (nebūtina).

6. PROCEDŪRA

6.1. **Tuščiasis bandymas**

Nustatant riebalų kiekį bandinyje, tuo pačiu metu atliekamas ir tuščiasis bandymas su 10 ml vandens, naudojant tą patį ekstrahavimo įrangos tipą, tokius pačius tų pačių reagentų kiekius ir taikant tą pačią, toliau aprašytą metodiką, išskyrus 6.2.2 punktą. Jeigu tuščiojo bandymo rezultatas didesnis kaip 0,5 mg, reagentai turėtų būti patikrinti ir negrynas reagentas arba reagentai turėtų būti išgryninti arba pakeisti.

6.2. **Analizė**

6.2.1. Džiovinimo spintoje (5.4) kolba (5.3) (jeigu reikia, kartu su trupučiu granulių nuo kunkuliavimo (5.5)), kad sušvelnintų virimą garinant tirpiklius) džiovinama nuo pusės valandos iki vienos valandos. Kolbai leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir atvėsusi kolba pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.2.2. Apie 1 g nenugriebto pieno miltelių arba apie 1,5 g iš dalies nugriebto arba nugriebto pieno miltelių 1 mg tikslumu pasveriama tiesiai į ekstrahavimo indą (5.2) arba pasvertas bandinys perpilamas į jį pagal svorių skirtumą. Įpilama 10 ml vandens ir švelniai purtoma, kol pieno milteliai visiškai disperguoja (kai kuriuos bandinius būtina kaitinti).

6.2.3. Įpilama 1,5 ml 25 % amoniako (4.1) arba tiek pat stipresnio tirpalo ir kaitinama 15 minučių 60–70 °C temperatūros vandens vonioje (5.6), retkarčiais purtant. Atšaldoma, pavyzdžiui, tekančiu vandeniu.

6.2.4. Įpilama 10 ml etanolio (4.2) ir skysčiai atsargiai, bet gerai, sumaišomi neužkimštame inde.

6.2.5. Įpilama 25 ml dietilo eterio (4.3). Atvėsinama tekančiu vandeniu. Indas užkemšamas bei energingai purtomas bei pakartotinai vartomas vieną minutę.

6.2.6. Atsargiai ištraukiamas kamštis, įpilama 25 ml petroleterio (4.4), keliais pirmaisiais mililitrais perplaunamas kamštis ir indo kakliuko vidinė dalis, leidžiant nuoplovoms tekėti į indą. Vėl užkemšama ir pakartotinai purtoma ir vartoma 30 sekundžių. Jeigu nebus centrifuguojama pagal 6.2.7 punktą, nereikia purtyti labai energingai.

6.2.7. Indui leidžiama pastovėti, kol viršutinis skysčio sluoksnis nuskaidrėja ir aiškiai atsiskiria nuo vandens sluoksnio. Atskiriama gali būti centrifuguojant (5.8).

Pastaba:
Jeigu naudojama centrifuga, kurią suka ne trifazis motoras, gali pasirodyti kibirkštis, todėl reikia pasirūpinti, kad būtų išvengta sprogimo arba neužsidegtų eterio garai, kylantys, pavyzdžiui, iš sudužusio mėgintuvėlio.

6.2.8. Kamštis ištraukiamas, jis ir indo kakliuko vidinė dalis perplaunami keliais mililitrais maišyto tirpiklio (4.5) nuoplovoms leidžiant tekėti į indą. Į paruoštą kolbą (6.2.1) atsargiai nupilama kuo daugiau paviršinio sluoksnio, dekantuojant arba naudojant sifoną (5.7).

Pastaba:
Jeigu perpilama nenaudojant sifono, gali reikėti įpilti truputį vandens, kad pakiltų tarpfazinė riba ir būtų lengviau dekantuoti.

6.2.9. Keliais mililitrais sumaišyto tirpiklio perplaunama indo kakliuko vidinė ir išorinė dalys arba sifono viršutinė ir apatinė dalys. Nuoplovoms nuo indo išorinės dalies leidžiama tekėti į kolbą, o nuoplovoms nuo kakliuko vidinės dalies bei sifono – į ekstrahavimo įrangą.

6.2.10. Antroji ekstrakcija atliekama kartojant procedūrą, aprašytą 6.2.5–6.2.9 punktuose, bet naudojant tik 15 ml dietilo eterio ir 15 ml petroleterio.

6.2.11. Trečioji ekstrakcija atliekama kartojant 6.2.10 punkte aprašytą procedūrą, bet praleidžiant paskutinį perplovimą (6.2.9).

Pastaba:
Analizuojant sausojo nugriebto pieno bandinius, šią trečiąją ekstrakciją atlikti neprivaloma.

6.2.12. Atsargiai nugarinama arba nudistiliuojama kuo daugiau tirpiklio (įskaitant etanolį). Jeigu kolba mažos talpos, po kiekvienos ekstrakcijos reikės, kaip ir ankščiau, pašalinti truputį tirpiklio.

6.2.13. Kai nebejaučiama tirpiklio kvapo, kolba padedama ant šono džiovinimo spintoje ir kaitinama vieną valandą.

6.2.14. Kolba išimama iš džiovinimo spintos, kaip ir anksčiau (6.2.1), jai leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.2.15. Kartojamos 6.2.13 ir 6.2.14 punktuose aprašytos procedūros, kaitinant 30–60 minučių, kol dviejų vienas po kito atliekamų svėrimų rezultatų skirtumas bus ne didesnis kaip 0,5 mg arba kol masė padidės. Jeigu masė padidėjo, skaičiavimuose (7.1) naudojama mažiausia masė. Paskutinė užfiksuota masė žymima M_1, g.

6.2.16. Kad išekstrahuota medžiaga visiškai ištirptų, įpilama 15–25 ml petroleterio. Kolba švelniai pašildoma ir sukama, kol ištirpsta visi riebalai.

6.2.16.1. Jeigu visa išekstrahuota medžiaga yra ištirpusi petroleteryje, riebalų masė yra lygi 6.2.1 ir 6.2.15 punktuose aprašytose procedūrose nustatytų masių skirtumui.

6.2.16.2. Jeigu yra bent truputis neištirpusios medžiagos arba jeigu tuo abejojama, riebalai visiškai išekstrahuojami pakartotinai plaunant šiltu petroleteriu ir prieš kiekvieną dekantavimą leidžiant neištirpusioms medžiagoms nusėsti. Kolbos kakliuko išorinė dalis perplaunama 3 kartus.

Ant šono padėta kolba kaitinama džiovinimo spintoje vieną valandą, jai, kaip ir anksčiau (6.2.1), leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama 0,1 mg tikslumu. Riebalų masė yra masės, gautos 6.2.15 punkte, ir šios galutinės masės skirtumas.

7. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

7.1. **Apskaičiavimas**

Išekstrahuotų riebalų masė, g, apskaičiuojama pagal formulę:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

p bandinio riebalų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

kur:

M_1 = kolbos M su riebalais masė, g, atlikus 6.2.15 punkte aprašytą procedūrą;

M_2 = kolbos M masė, g, atlikus 6.2.1 punkte aprašytą procedūrą, o medžiagoms neištirpus arba abejotinu atveju – atlikus 6.2.16.2 aprašytą procedūrą;

B_1 = tuščiojo bandymo kolbos B masė, g, po 6.2.15 punkte aprašytą procedūrą;

B_2 = kolbos B masė, g, po 6.2.1 punkte aprašytą procedūrą, o medžiagoms neištirpus arba abejotinu atveju – atlikus 6.2.16.2 aprašytą procedūrą;

S = naudoto bandinio masė, g.

7.2. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, kurias tuo pat metu arba vieną po kitos tomis pačiomis sąlygomis atlieka tas pats analitikas, rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,2 g riebalų 100 g produkto, išskyrus nugriebto pieno miltelius, kurių analizių skirtumas turi neviršyti 0,1 g riebalų 100 g produkto.

5 METODAS: SACHAROZĖS KIEKIO NUSTATYMAS (POLIARIMETRINIS METODAS)

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatomas sacharozės kiekis:

— saldinto sutirštinto pieno,
— saldinto sutirštinto iš dalies nugriebto pieno,
— saldinto sutirštinto lieso pieno.

Bandiniuose neturi būti invertuoto cukraus.

2. APIBRĖŽIMAS

Sutirštinto saldinto pieno sacharozės kiekis: sacharozės kiekis, nustatytas pagal apibūdintą metodą.

3. METODO ESMĖ

Šis metodas pagrįstas Clerget inversijos principu – švelnus bandinio apdorojimas rūgštimi, dėl ko įvyksta visiška sacharozės hidrolizė, bet beveik neįvyksta nei vienos laktozės arba kitų cukrų hidrolizės. Sacharozės kiekis nustatomas pagal tirpalo poliarizacijos plokštumos sukimo jėgos pasikeitimą.

Skaidrus bandinio filtratas, be laktozės sukeliamo kintamo poliarizacijos plokštumos sukimo, paruošiamas apdorojant tirpalą amoniaku, paskui neutralizuojant ir nuskaidrinant, pridedant vieną po kito cinko acetato ir kalio heksacianoferato II tirpalus.

Dalyje filtrato sacharozė hidrolizuojama nurodytu būdu.

Sacharozės kiekis apskaičiuojamas, naudojant atitinkamą formulę, pagal filtrato poliarizacijos plokštumos sukimą prieš ir po inversijos.

4. REAGENTAI

4.1. Cinko acetato tirpalas, 1 M: 21,9 g kristalinio cinko acetato su 2 molekulėm vandens $Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2\ H_2O$ ir 3 ml ledinės acto rūgšties ištirpinama vandenyje ir vandeniu atskiedžiama iki 100 ml.

4.2. Kalio heksacianoferato (II) tirpalas, 0,25 M: 10,6 g kristalinio kalio heksacianoferato (II) su 3 molekulėm vandens $K_4[Fe(CN)_6]\ 3H_2O$ ištirpinama vandenyje ir vandeniu atskiedžiama iki 100 ml.

4.3. Druskos rūgšties tirpalas, (6,35 ± 0,20) M (nuo 20 iki 22 %) arba (5,0 ± 0,2) M (nuo 16 iki 18 %).

4.4. Amoniako tirpalas, (2,0 ± 0,2) M (3,5 %).

4.5. Acto rūgšties tirpalas, (2,0 ± 0,2) M (12 %).

4.6. Bromtimolio mėlynojo indikatorius, 1 % (pagal masę) tirpalas etanolyje.

5. ĮRANGA

5.1. Svarstyklės, jautrumas 10 mg.

5.2. Poliarimetro vamzdelis, 2 dm, tiksliai kalibruoto ilgio.

5.3. Poliarimetras arba sacharimetras:

a) poliarimetras su natrio arba gyvsidabrio žalios šviesos spinduliais (gyvsidabrio lempa su prizme arba specialiu Wratten filtru Nr. 77 A), kurio parodymai turi būti skaitomi mažiausiai 0,05 kampo laipsnių tikslumu;

b) sacharimetras su tarptautine cukraus skale, naudojant baltos šviesos spindulius, einančius per 6 % kalio bichromato tirpalo 15 mm storio filtrą, arba natrio šviesos spindulius, tarptautinėje cukraus skalėje parodymai turi būti skaitomi mažiausiai 0,1° tikslumu.

5.4. Vandens vonia, kurios temperatūra 60 ± 1 °C.

6. PROCEDŪRA

6.1. **Kontrolinis nustatymas**

Metodikos, reagentų ir įrangos standartizavimui atliekamas dvigubas kontrolinis nustatymas, kaip aprašyta toliau, naudojant 100 g pieno ir 18 g grynos sacharozės mišinį arba 110 g lieso pieno ir 18 g grynos sacharozės mišinį, kurių kiekvienas atitinka 40 g sutirštinto pieno, kuriame yra 45 % sacharozės. Cukraus kiekis apskaičiuojamas, naudojant 7 punkte pateiktas formules, 1 formulėje vietoje M, F ir P atitinkamai įraant paimto pieno kiekį, jame esančių riebalų ir baltymų kiekius ir 2 formulėje vietoje M įrašant dydį 40,00. Rastų dydžių reikšmės turi nesiskirti daugiau kaip 0,2–45,0 %.

6.2. **Nustatymas**

6.2.1. Į 100 ml talpos stiklinėlę 10 mg tikslumu pasveriama apytiksliai 40 g gerai išmaišyto bandinio. Įpilama 50 ml karšto vandens (80–90 °C) ir gerai išmaišoma.

6.2.2. Visas mišinys perpilamas į 200 ml matavimo kolbutę, perplaunant stiklinėlę keliomis 60 °C temperatūros vandens porcijomis, kol bendras tūris pasiekia (120–150) ml. Sumaišoma ir atšaldoma iki kambario temperatūros.

6.2.3. Įpilama 5 ml atskiesto amoniako tirpalo (4.4). Vėl sumaišoma ir paliekama 15 minučių.

6.2.4. Amoniakas neutralizuojamas, įpilant ekvivalentinį atskiesto acto rūgšties tirpalo (4.5) kiekį. Tikslus ml kiekis nustatomas iš anksto, titruojant amoniako tirpalą, kaip indikatorių naudojant bromtimolio mėlynąjį (4.6). Sumaišoma.

6.2.5. Sukamuoju judesiu atsargiai maišant pasvirusią kolbą, įpilama 12,5 ml cinko acetato tirpalo (4.1).

6.2.6. 12,5 ml kalio heksaciano ferato (II) tirpalo (4.2) įpilama tokiu pat būdu kaip ir acetatas.

6.2.7. Kolbos turinio temperatūra padidinama iki 20 °C ir jis atskiedžiamas 20 °C temperatūros vandeniu iki 200 ml žymės.

Pastaba:
Visuose toliau aprašomuose etapuose vanduo arba reagentai turėtų būti įpilami taip, kad būtų išvengta oro burbuliukų susidarymo taip pat siekiant to paties tikslo, maišoma turėtų būti sukant, o ne purtant. Jeigu oro burbuliukai pastebimi prieš atskiedžiant iki 200 ml tūrio, juos panaikinti gali padėti laikinas kolbos prijungimas prie vakuuminio siurblio ir kolbos sukimas.

6.2.8. Kolba užkemšama sausu kamščiu ir energingai purtant gerai sumaišoma.

6.2.9. Kelias minutes leidžiama pastovėti ir po to filtruojama per sausą filtravimo popierių, išpilant pirmuosius 25 ml filtrato.

6.2.10. Tiesioginė poliarizacija: filtrato poliarizacijos plokštumos sukimas nustatomas, esant 20 ± 1 °C temperatūrai.

6.2.11. Inversija: į 50 ml talpos matavimo kolbą įpilama 40 ml anksčiau gauto filtrato. Pripilama 6,0 ml 6,35 M druskos rūgšties arba 7,5 ml 5,0 M druskos rūgšties (4.3).

Kolba 15 min pastatoma į 60 °C temperatūros vandens vonią, įsitikinant kad visa kolbos viršutinė dalis panirusi. Pirmąsias penkias minutes, per kurias kolbos turinio temperatūra turėtų pasiekti vonios temperatūrą, maišoma sukamuoju judesiu. Atšaldoma iki 20 °C temperatūros ir tokios pat temperatūros vandeniu atskiedžiama iki žymės. Sumaišoma ir leidžiama šioje temperatūroje pastovėti vieną valandą.

6.2.12. *Inversinė poliarizacija*

Invertuoto tirpalo poliarizacijos plokštumos sukimas nustatomas, esant 20 ± 0,2 °C temperatūrai. (Tačiau jeigu matavimo metu skysčio temperatūra T poliarizacijos vamzdelyje skiriasi daugiau kaip 0,2 °C, turi būti koreguojama temperatūra pagal 7.2 punktą.)

7. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

7.1. **Apskaičiavimo metodas**

Sacharozės kiekis apskaičiuojamas pagal šią formulę:

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

2) $S = \frac{D - 1.25\ I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times M}\ \%$

kur:

S = sacharozės kiekis;

M = pasverto bandinio masė, g;

F = riebalų kiekis, %, bandinyje;

P = baltymų kiekis, %, (N × 6,38) bandinyje;

V = tūris, ml, iki kurio bandinys atskiedžiamas prieš filtraciją;

v = korekcija, ml, dėl nuskaidrinimo metu susidariusių nuosėdų tūrio;

D = tiesioginis poliarimetro parodymas (poliarizacija prieš inversiją);

I = poliarimetro parodymas po inversijos;

L = poliarimetro vamzdelio ilgis, dm;

Q = inversijos koeficientas, kurio reikšmės pateiktos toliau.

Pastabos:

a) kai pasveriama tiksliai 40,00 g sutirštinto pieno ir naudojamas poliarimetras su natrio šviesos spinduliais, kampo laipsniais bei 2 dm ilgio poliarimetro vamzdeliu bei matavimas atliekamas esant 20 ± 0,1 °C temperatūrai, sutirštinto pieno (C = 9) sacharozės kiekis gali būti apskaičiuotas pagal tokią formulę:

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

b) jeigu inversinė poliarizacija pamatuota prie kitos nei 20 °C temperatūros, skaičiai turėtų būti padauginti iš:

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

7.2. **Inversijos koeficiento Q reikšmės**

Tikslios Q reikšmės įvairiems šviesos šaltiniams su koncentracijos bei temperatūros koregavimu pateiktos šiose formulėse:

Natrio šviesos spinduliai ir poliarimetras su kampo laipsniais:

$Q = 0{,}8825 + 0{,}0006\ (C - 9) - 0{,}0033\ (T - 20)$

Gyvsidabrio žalios šviesos spinduliai ir poliarimetras su kampo laipsniais:

$Q = 1{,}0392 + 0{,}0007\ (C - 9) - 0{,}0039\ (T - 20)$.

Balta šviesa su dichromato filtru ir sacharimetras su tarptautinės cukraus skalės laipsniais:

$Q = 2{,}549 + 0{,}0017\ (C - 9) - 0{,}0095\ (T - 20)$.

Aukščiau pateiktose formulėse:

C = Bendras cukraus kiekis, procentais, invertuotame tirpale, nustatytas poliarizacijos būdu

T = invertuoto tirpalo temperatūra, atliekant matavimą poliarimetru.

1 Pastaba:
Bendras cukraus kiekis C, procentais, invertuotame tirpale gali būti apskaičiuotas pagal tiesioginį atskaitymą ir pasikeitimą po inversijos įprastiniu būdu, naudojant įprastines, sacharozei, laktozei ir invertuotam cukrui būdingas poliarizacijos plokštumos sukimo reikšmes.
Korekcija 0,0006 (C – 9) ir t. t. yra tik tada teisinga, kai C yra apytikriai 9; normaliam sutirštintam pienui šios korekcijos galima nepaisyti, kai C yra artimas 9.

2 Pastaba:
20 °C temperatūros svyravimas 1 °C neturi didelės įtakos tiesioginiams rodmenims, tačiau dėl didesnio nei 0,2 °C svyravimo būtina koreguoti invertinius rodmenis. Korekcija – 0,0033 (T – 20) t. t. yra teisinga tik esant 18–22 °C temperatūrai.

7.3. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, kurias tuo pat metu arba vieną po kitos tomis pačiomis sąlygomis atlieka tas pats analitikas, rezultatų skirtumas turi neviršyti 0,3 g cukraus 100 g sutirštinto pieno.

6 METODAS: PIENO RŪGŠTIES IR LAKTATŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatomas pieno rūgšties ir laktatų, išreikštų pieno rūgštimi, kiekis:

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių,
— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių,
— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių,
— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių.

2. APIBRĖŽIMAS

Pieno miltelių, pieno rūgšties ir laktatų kiekis: pieno rūgšties ir laktatų, išreikštų pieno rūgštimi, kiekis, nustatytas apibūdintu metodu.

3. METODO ESMĖ

Riebalai, baltymai ir laktozė vienas po kito pašalinami iš bandinio tirpalo pridedant vario sulfato ir kalcio hidroksido, po to filtruojant.

Pieno rūgštis ir laktatai paverčiami acetaldehidais naudojant koncentruotą sieros rūgštį bei vario (II) sulfatą.

Pieno rūgšties kiekis nustatomas kolorimetriniu būdu, naudojant p–hidroksidifenilą.

Pieno rūgštis ir laktatų kiekis išreiškiamas pieno rūgšties mg 100–e g sausųjų neriebalinių pieno medžiagų.

4. REAGENTAI

4.1. Vario (II) sulfato tirpalas: 250 g vario (II) sulfato ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ištirpinama vandenyje ir atskiedžiama vandeniu iki 1000 ml.

4.2. Kalcio hidroksido suspensija.

4.2.1. 300 g kalcio hidroksido ($Ca(OH)_2$) grūstuvėje sutrinama su vandeniu, iš viso sunaudojant 900 ml vandens. Suspensija turi būti pagaminta prieš pat naudojimą.

4.2.2. Kalcio hidroksido suspensija: 300 g kalcio hidroksido ($Ca(OH)_2$) grūstuvėje sutrinama su vandeniu, iš viso sunaudojant 1400 ml vandens. Suspensija turi būti pagaminta prieš pat naudojimą.

4.3. Sieros rūgšties – vario (II) sulfato tirpalas: į 300 ml 95,9–97,0 % (masės) sieros rūgšties (H_2SO_4) įpripilama 0,5 ml vario (II) sulfato tirpalo (4.1).

4.4. p–hidroksidifenilo ($C_4H_5C_6H_4OH$) tirpalas: 0,75 g p–hidroksidifenilo purtant ir truputį šildant ištirpinama 5 ml natrio hidroksido vandeninio tirpalo, kurio 100 ml yra 5 g NaOH. Matavimo kolbutėje tirpalas atskiedžiamas vandeniu iki 50 ml. Jis laikomas rudos spalvos stiklo butelyje sausoje ir šaltoje vietoje. Jeigu tirpalo spalva pasikeičia arba tirpalas susidrumsčia, jis nenaudojamas. Maksimali laikymo trukmė – 72 valandos.

4.5. Standartinės pieno rūgšties tirpalas: prieš pat naudojimą vandenyje ištirpinama 0,1067 g ličio laktato ($CH_3CHOHCOOLi$) ir matavimo kolboje atskiedžiama vandeniu iki 1000 ml, 1 ml šio tirpalo atitinka 0,1 mg pieno rūgšties.

4.6. Standartinis regeneruotas pienas: iš anksto analizuojama keletas geros kokybės sausojo pieno bandinių. Kalibracinei kreivei gauti atrenkamas bandinys, kuriame yra mažiausiai pieno rūgšties, t. y. ne daugiau kaip 30 mg pieno rūgšties 100–e g sausųjų neriebalinių medžiagų. Laikomasi darbo metodikos, aprašytos 6.2.1 ir 6.2.2. punktuose.

5. ĮRANGA

5.1. Analizinės svarstyklės.

5.2. Spektrofotometras, tinkantis matuoti, esant 570 nm bangos ilgiui.

5.3. Vandens vonia, kurioje palaikoma 30 ± 2 °C temperatūra.

5.4. Grūstuvė ir grūstukas.

5.5. Filtravimo popierius (Schleicher ir Schull 595, Whatman I arba ekvivalentiškas).

5.6. Mėgintuvėliai, karščiui atsparaus arba ekvivalentiško stiklo (matmenys 25x150 mm).

Pastaba: Visi stikliniai indai turi būti gerai išplauti ir skirti tik šiai analizei. Prieš plaunant stiklinius indus, kuriuose yra nuosėdų, jie perplaunami koncentruota druskos rūgštimi.

6. PROCEDŪRA

6.1. **Tuščiasis bandymas**

Tuščiasis bandymas atliekamas į 50 ml talpos matavimo cilindrą įpilant 30 ml vandens ir apdorojant kaip aprašyta 6.2.4–6.2.11 punktuose. Jeigu tuščiajame bandinyje, matuojant prieš vandenį, yra daugiau kaip 20 mg pieno rūgšties 100 g sausųjų neriebalinių medžiagų, reikėtų patikrinti reagentus ir negrynus išgryninti arba pakeisti. Tuščiasis bandymas atliekamas tuo pačiu metu kaip ir bandinio analizė.

6.2. **Analizė**

Pastaba: Turi būti vengiama užteršti nešvarumais, ypač seilėmis ir prakaitu.

6.2.1. Sausųjų neriebalinių medžiagų kiekis (*a*) g, nustatomas iš 100 atimant riebalų kiekį (gautą pagal 4 metodą) ir drėgmės kiekį (gautą pagal 2 metodą).

6.2.2. 0,1 g tikslumu pasveriama $\frac{1000}{(a - 10)}$ g bandinio. Šis bandinio kiekis gerai sumaišomas su 100 ml vandens.

6.2.3. 5 ml gauto tirpalo pipete įpilama į 50 ml matavimo cilindrą ir vandeniu atskiedžiama maždaug iki 30 ml.

6.2.4. Purtant lėtai pripilama 5 ml vario (II) sulfato tirpalo (4.1) ir leidžiama 10 minučių pastovėti.

6.2.5. Purtant lėtai pripilama 5 ml kalcio hidroksido suspensijos (4.2.1) arba 10 ml kalcio hidroksido suspensijos (4.2.2).

6.2.6. Vandeniu atskiedžiama iki 50 ml, energingai supurtoma, leidžiama pastovėti 10 minučių, po to filtruojama. Pirmieji ištekėję lašai išpilami.

6.2.7. Į mėgintuvėlį pipete įpilama 1 ml filtrato (5.6).

6.2.8. Į mėginuvėlį biurete arba matavimo pipete įpilama 6,0 ml sieros rūgšties – vario (II) sulfato tirpalo (4.3). Sumaišoma.

6.2.9. Penkias minutes kaitinama verdančio vandens vonioje. Tekančiu vandeniu atšaldoma iki kambario temperatūros.

6.2.10. Įlašinami 2 lašai p–hydroksidifenilo reagento (4.4), energingai supurtoma, kad reagentas tolygiai pasklistų visame tirpale. Mėgintuvėlis įdedamas į vandens vonią, kurios temperatūra 30 ± 2 °C; joje laikomas 15 minučių, retkarčiais supurtant.

6.2.11. Mėgintuvėlis įdedamas į verdančią vandens vonią 90–čiai sekundžių. Tekančiu vandeniu atšaldomas iki kambario temperatūros.

6.2.12. Per tris valandas matuojamas optinis tankis prieš tuščiąjį bandymą (6.1), esant 5.2 punkte apibrėžtam bangos ilgiui.

6.2.13. Jeigu optinis tankis didesnis, nei rodo standartinės kreivės aukščiausias taškas, bandymas kartojamas atitinkamai atskiedžiant filtratą, gautą 6.2.6 punkte.

6.3. **Standartinio tirpalo paruošimas**

6.3.1. Į penkis 50 ml talpos matavimo cilindrus pipete įpilama po 5 ml regeneruoto pieno (4.6). Atskirai į kiekvieną šių cilindrų pipete įpilama 0, 1, 2, 3 ir 4 ml standartinio tirpalo (4.5), kad būtų gauta standartinių tirpalų eilė, atitinkanti 0, 20, 40, 60 ir 80 mg pieno rūgšties 100 g sausojo pieno sausųjų neriebalinių medžiagų.

6.3.2. Vandeniu atskiedžiama iki apie 30 ml ir apdorojama kaip aprašyta 6.2.4–6.2.11 punktuose.

6.3.3. Standartinių tirpalų (6.3.1) optiniai tankiai išmatuojami prieš tuščiąjį bandymą (6.1), esant 5.2 nurodytam bangos ilgiui. Diagramoje pažymimas optinis tankis, priklausomai nuo pieno rūgšties kiekio, pateikto 6.3.1, t. y. 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg ir 80 mg 100 g sausųjų neriebalinių medžiagų. Per taškus išvedama tiesi linija ir standartinė kreivė nubrėžiama vedant šią liniją lygiagrečiai jai pačiai taip, kad ji eitų per koordinačių ašių pradžią.

7. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

7.1. **Apskaičiavimo metodas**

6.2.12 arba 6.2.13 išmatuotas optinis tankis pakeičiamas pieno rūgšties kiekiu mg 100 g bandinio sausųjų neriebalinių medžiagų, remiantis standartine kreive Šis rezultatas padauginamas iš atskiedimo koeficiento, jeigu filtratas buvo skiedžiamas pagal 6.2.13. punktą.

7.2. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, kurias tuo pat metu arba vieną po kitos tomis pačiomis sąlygomis atlieka tas pats analitikas, rezultatų skirtumas turi neviršyti 8 mg pieno rūgšties 100 g sausųjų neriebalinių medžiagų, jeigu pieno rūgšties kiekis yra mažesnis nei 80 mg. Jei šis kiekis didesnis, skirtumas gali neviršyti 10 % mažiausios reikšmės.

7 METODAS: FOSFATAZĖS AKTYVUMO NUSTATYMAS (MODIFIKUOTA SANDERS IR SAGU METODIKA)

1. TAIKYMO SRITIS

Šis metodas aprašo fosfatazės aktyvumo nustatymą:

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių,
— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių,
— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių,
— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių.

2. APIBRĖŽIMAS

Sausojo pieno fosfatazės aktyvumas yra produkte esančios aktyvios šarminės fosfatazės kiekio matas. Jis išreiškiamas fenolio kiekiu, mikrogramais, kurį toliau aprašytomis sąlygomis išskyrė 1 ml regeneruoto pieno.

3. METODO ESMĖ

Sausojo pieno fosfatazės aktyvumas nustatomas pagal fofatazės gebėjimą iš dinatriofenilfosfato išskirti fenolį. Nurodytomis sąlygomis išsiskyrusio fenolio kiekis nustatomas spektrofotometru matuojant Gibbso reagentu išryškintą spalvą.

4. REAGENTAI

4.1. **A tirpalas**

Bario borato hidroksido buferinis tirpalas: pH 10,6 ± 0,1, esant 20 °C temperatūrai.

Ištirpinama: 25,0 g bario hidroksido ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) vandenyje ir atskiedžiama iki 500 ml.

Ištirpinama: 11,0 g boro rūgšties (H_3BO_3) vandenyje ir atskiedžiama iki 500 ml.

Abu tirpalai pašildomi iki 50 °C ir sumaišomi.

Mišinys supurtomas ir atšaldomas iki kambario temperatūros.

pH pakoreguojamas bario hidroksido tirpalu iki 10,6 ± 0,1 ir filtruojama.

Tirpalas laikomas sandariai užkimštame inde.

Prieš naudojant buferinis tirpalas atskiedžiamas tokiu pačiu vandens kiekiu.

4.2. **B tirpalas**

Spalvos išryškinimo buferinis tirpalas.

Ištirpinama: 6,0 g natrio metaborato ($NaBO_2$) (arba 12,6 $NaBO_2 \cdot 4\ H_2O$) ir 20,0 g natrio chlorido (NaCl) vandenyje ir atskiedžiama vandeniu iki 1000 ml.

4.3. **C tirpalas**

Buferinis substrato tirpalas.

4.3.1. 0,5 g dinatriofenilfosfato ($Na_2C_6H_5PO_4 \cdot 2H_2O$) ištirpinama 4,5 ml B tirpalo (4.2). Įlašinami 2 lašai E tirpalo (4.5) ir leidžiama pastovėti 30 min. Spalva ekstrahuojama su 2,5 ml butanolio (4.10). Jeigu būtina, spalvos ekstrakcija pakartojama. Atsiskyręs butanolis pašalinamas. Tirpalas gali būti laikomas šaldytuve keletą dienų. Prieš naudojant spalva išryškinama ir dar kartą ekstrahuojama.

4.3.2. Į 100 ml matavimo kolbą pipete įpilama 1 ml tirpalo ir tirpalu A atskiedžiama iki žymės. Buferinis tirpalas paruošiamas prieš pat naudojimą.

4.4. **D tirpalas**

Nusodiklis.

3,0 g cinko sulfato ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ir 0,6 g vario (II) sulfato ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ištirpinama vandenyje ir vandeniu atskiedžiama iki žymės.

4.5. **E tirpalas**

Gibso reagentas.

0,040 g 2,6–dibromchinon 1,4–chloroimido ($O_2C_6H_2Br_2$ NCl) ištirpinama 10 ml 96 % etanolio. Tirpalas laikomas šaldytuve, tamsaus stiklo butelyje. Reagentui tapus bespalviu, jis išpilamas.

4.6. Spalvos atskiedimo buferinis tirpalas

10 ml B tirpalo (4.2), spalvos išryškinimo buferio, vandeniu atskiedžiama iki 100 ml.

4.7. Vario sulfato tirpalas.

0,05 g vario (II) sulfato ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ištirpinama vandenyje ir vandeniu atskiedžiama iki 100 ml.

4.8. Fenolio standartinis tirpalas.

(0,200 ± 0,001) g gryno fenolio ištirpinama vandenyje ir matavimo kolboje atskiedžiama vandeniu iki 100 ml. Šis tirpalas gali būti laikomas šaldytuve keletą mėnesių. 10 ml šio tirpalo atskiedžiama vandeniu iki 100 ml. 1 ml šio atskiesto tirpalo yra 200 µg fenolio ir jis gali būti naudojamas labiau atskiestų tirpalų paruošimui.

4.9. Virintas distiliuotas vanduo.

4.10. n–Butanolis.

5. ĮRANGA

5.1. Analizinės svarstyklės.

5.2. Vandens vonia (temostatiškai reguliuojama), kurioje palaikoma 37 °C ± 1 °C temperatūra.

5.3. Spektrofotometras, tinkantis matuoti, esant 610 nm bangos ilgiui.

5.4. Filtravimo popierius (Schleicher ir Schull 597, Whatman 42 arba ekvivalentiškas).

5.5. Vandens vonia, virinimui.

5.6. Aliumininė folija.

6. PROCEDŪRA

Atsargumo priemonės:

1. Vengti tiesioginės saulės šviesos.
2. Visi stikliniai indai, kamščiai ir filtravimo medžiagos turėtų būti visiškai švarūs. Rekomenduojama, kad jie būtų perplauti vandeniu ir pavirinti jame arba kad būtų apdoroti garais.
3. Vengti naudoti plastikines medžiagas (pavyzdžiui kamščius), nes jose gali būti fenolio.
4. Seilėse yra fosfatazės, todėl būtina vengti užteršimo seilių liekanomis.

6.1. **Bandinio paruošimas**

6.1.1. 0,1 g tikslumu pasveriama 10 g bandinio ir ištirpinama 90 ml vandens. Miltelių tirpinimo temperatūra bet kokiomis aplinkybėmis turi neviršyti 35 °C.

6.2. **Nustatymas**

6.2.1. Į kiekvieną iš dviejų mėgintuvėlių įpilama po 1 ml regeneruoto pieno, paruošto kaip aprašyta 6.1.1 punkte.

6.2.2. Vienas iš mėgintuvėlių pakaitinamas verdančio vandens vonioje 2 minutes. Mėgintuvėlis ir vandens vonia (5.5) arba, pavyzdžiui, stiklinė uždengiami aliuminine folija (5.6), tam kad būtų užtikrintas viso mėgintuvėlio šilimas. Šaltame vandenyje atšaldoma iki kambario temperatūros. Šis mėgintuvėlis naudojamas tuščiajam bandymui. Visose vėlesnėse operacijose abu mėgintuvėliai apdorojami vienodai.

6.2.3. Pripilama 10 ml C tirpalo (4.3.2). Sumaišoma ir mėgintuvėlis įdedamas į vandens vonią, kurios temperatūra 37 °C (5.2).

6.2.4. Periodiškai purtant mėgintuvėliai laikomi vandens vonioje 60 minučių.

6.2.5. Mėgintuvėliai nedelsiant perkeliami į verdančio vandens vonią (5.5) ir kaitinami dvi minutes; šaltame vandenyje atšaldomi iki kambario temperatūros.

6.2.6. Įpilama 1 ml D tirpalo (4.4), sumaišoma ir filtruojama per sausą filtravimo popierių; pirmieji filtrato lašai išpilami, tol kol gaunamas skaidrus tirpalas.

6.2.7. Į mėgintuvėlius įpilama po 5 ml kiekvieno filtrato, pripilama 5 ml B tirpalo (4.2) ir 0,1 ml E tirpalo (4.5). Sumaišoma.

6.2.8. Spalvai leidžiama išryškėti, laikant 30 minučių kambario temperatūroje, netiesioginėje saulės šviesoje.

6.2.9. Bandinio tirpalo optinis tankis matuojamas prieš tuščiąjį bandymą, esant 5.3. nurodytam bangos ilgiui.

6.2.10. Nustatymas kartojamas, jeigu tirpalo optinis tankis yra didesnis už pagal 7 punktą paruoštą standartinio bandinio su 20 µg fenolio optinį tankį.

Jeigu ši riba viršijama, reikiamas regeneruoto pieno tūris atskiedžiamas pagal 6.1.1 atitinkamu tūriu rūpestingai pavirinto šio pieno, kaip nurodyta 6.2.2, tam kad būtų inaktivuota jame esanti fosfatazė.

7. STANDARTINĖS KREIVĖS PARUOŠIMAS

7.1. Į keturis 100 ml matavimo kolbutes pipete įpilama 1, 3, 5 ir 10 ml standartinio tirpalo, atskiesto pagal 4.8, ir atskiedžiama vandeniu iki žymės; šiuose atskiedimuose atatinkamai yra 2, 6, 10 ir 20 µg fenolio 1 ml.

7.2. Į mėgintuvėlius pipete įpilama 1 ml vandens arba po 1 ml kiekvieno standartinio tirpalo (7.1), kad būtų gauta bandinių serija, kurioje būtų 0 (tuščiasis bandymas, naudojant 1 ml vandens) – 2–6 – 10 ir 20 µg fenolio.

7.3. Į kiekvieną mėgintuvėlį iš eilės pipete įpilama po 1 ml vario (II) sulfato tirpalo (4.7), 5 ml spalvos atskiedimo buferinio tirpalo (4.6), 3 ml vandens ir 0,1 ml E tirpalo (4.5). Sumaišoma.

7.4. Mėgintuvėliai paliekami 30 minučių kambario temperatūroje ne tiesioginėje saulės šviesoje.

7.5. Pamatuojama kiekvieno mėgintuvėlio tirpalo absorbcija, lyginant su tuščiuoju bandymu esant 5.3 nurodytam bangos ilgiui.

7.6. Standartinės kreivės sudaromos, pažymint absorbcijos reikšmes, nelygu fenolio kiekis µg, kaip nurodyta 7.2.

8. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

8.1. **Apskaičiavimas**

8.1.1. Remantis standartine kreive, 6.2.9 nustatyti skaičiai paverčiami fenolio µg.

8.1.2. Fosfatazės aktyvumas, išreikštas fenolio µg/ml regeneruoto pieno, apskaičiuojamas pagal formulę:

Fosfatazės aktyvumas = 2,4 × P

čia P – fenolio kiekis, µg pagal 8.1.1.

8.1.3. Jeigu buvo būtina atskiesti, kaip nurodyta 6.2.10, 8.1.2 gautas rezultatas dauginamas iš atskiedimo koeficiento.

8.2. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, kurias tuo pat metu arba vieną po kitos tomis pačiomis sąlygomis atlieka tas pats analitikas, rezultatų skirtumas turi neviršyti 2 µg fenolio, kurį išskyrė 1 ml regeneruoto pieno.

8 METODAS: FOSFATAZĖS AKTYVUMO NUSTATYMAS (ASCHAFFENBURG IR MÜLLEN METODIKA)

1. TAIKYMO SRITIS

Šis metodas aprašo fosfatazės aktyvumo nustatymą

— sausojo labai riebaus pieno arba labai riebaus pieno miltelių,
— sausojo nenugriebto pieno arba nenugriebto pieno miltelių,
— sausojo iš dalies nugriebto pieno arba iš dalies nugriebto pieno miltelių,
— sausojo lieso pieno arba lieso pieno miltelių.

2. APIBRĖŽIMAS

Sausojo pieno fosfatazės aktyvumas yra produktuose esančios aktyvios šarminės fosfatazės kiekio matas. Jis išreiškiamas p–nitrofenolio kiekiu mikrogramais, kurį aprašytomis sąlygomis išskyrė 1 ml regeneruoto pieno.

3. METODO ESMĖ

Regeneruotas bandinys atskiedžiamas buferiniu substratu, kurio pH 10,2 ir dvi valandas laikomas 37 °C temperatūroje. Bet kokia bandinyje esanti šarminė fosfatazė šiomis aplinkybėmis iš pridėto dinatrio p–nitrofenilfosfato išskirs p–nitrofenolį. Išsiskyręs p–nitrofenolis nustatomas tiesiogiai lyginant su standartiniais spalvotais stiklais paprastame komparatoriuje (spalvomatyje), naudojant atspindėtą šviesą.

4. REAGENTAI

4.1. Natrio karbonato ir bikarbonato buferinis tirpalas.

3,5 g bevandenio natrio karbonato ir 1,5 g natrio bikarbonato ištirpinama vandenyje ir matavimo kolboje vandeniu atskiedžiama iki 1000 ml.

4.2. Buferinis substratas.

1,5 g dinatrio p–nitrofenilfosfato ištirpinama natrio karbonato–bikarbonato buferyje (4.1) ir matavimo kolboje buferiu (4.1) atskiedžiama iki 1 000 ml.

Šis tirpalas nekinta vieną mėnesį, jeigu laikomas šaldytuve (≤ 4 °C), bet reikia atlikti tokių tirpalų spalvos kontrolės bandymą – žiūrėti 6 punktą, atsargumo priemonė numeris 3.

4.3. Nuskaidrinimo tirpalas.

4.3.1. Cinko sulfato tirpalas.

30,0 g cinko sulfato ($ZnSO_4$) ištirpinama vandenyje ir matavimo kolbutėje vandeniu atskiedžiama iki 100 ml.

4.3.2. Kalio heksacianoferato (II) tirpalas.

17,2 g kalio heksacianoferato (II) su trim molekulėm vandens ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3\ H_2O$) ištirpinama ir matavimo kolbutėje vandeniu atskiedžiama iki 100 ml.

5. ĮRANGA

5.1. Analizinės svarstyklės.

5.2. Termostatiškai kontroliuojama vandens vonia, kurioje nustatoma 37 ± 1 °C temperatūra.

5.3. Spalvomatis su specialiu disku, kuriame yra standartiniai spalvoti stiklai, kalibruoti p–nitrofenolio mikrogramais pieno ml, ir 2x25 mm kiuvetės.

6. PROCEDŪRA

Atsargumo priemonės:

1. Panaudoti mėgintuvėliai turi būti ištuštinti, išplauti karštu vandeniu su šarminiu plovikliu, po to kruopščiai perplaunami karštu vandentiekio vandeniu. Pabaigoje jie turi būti perskalauti vandeniu ir prieš naudojant išdžiovinti.

   Pipetės turi būti kruopščiai perplaunamos švariu šaltu vandentiekio vandeniu tuoj pat po naudojimo, po to perskalaujamos vandeniu ir prieš naudojant išdžiovintos.

2. Mėgintuvėlių kamščiai turi būti kruopščiai perplaunami karštu vandentiekio vandeniu tuoj pat po naudojimo, po to dvi minutes virinami vandenyje.

3. Buferio substrato tirpalas (4.2) laikomas šaldytuve 4 °C arba žemesnėje temperatūroje, turėtų nekisti mažiausiai vieną mėnesį. Geltonos spalvos atsiradimas reiškia pakitimą. Nors bandinio matavimas visada atliekamas prieš virinto produkto kontrolę, kurioje yra tas pats buferinio substrato tirpalas, rekomenduojama tirpalo nenaudoti, jeigu jo spalvos matas viršija 10 µg, matuojant spalvomatyje, 25 mm kiuvetėje, kitoje 25 mm kiuvetėje naudojant distiliuotą vandenį.

4. Kiekvienam bandiniui naudojama kita pipetė ir vengiant užteršimo seilėmis.

5. Bandymas neturi būti atliekamas tiesioginėje saulės šviesoje.

6.1. **Bandinio paruošimas**

10 g miltelių ištirpinama 90 ml vandens. Miltelių tirpinimo temperatūra turi neviršyti 35 °C.

6.2. **Analizė**

6.2.1. Į švarų, sausą mėgintuvėlį pipete įpilama 15 ml buferio substrato (4.2), po to 2 ml regeneruoto bandinio (6.1), kuris turi būti tiriamas. Mėgintuvėlis užkemšamas, vartant sumaišomas ir įdedamas į 37 °C temperatūros vandens vonią (5.2).

6.2.2. Tuo pat metu į vandens vonią įdedamas kontrolinis mėgintuvėlis, kuriame yra 15 ml buferinio substrato ir 2 ml virinto regeneruoto bandinio, to paties, kuris tiriamas.

6.2.3. Po dviejų valandų abu mėgintuvėliai išimami iš vandens vonios, pripilama 0,5 ml cinko sulfato nusodiklio (4.3.1), užkemšami kitais kamšteliais, energingai purtomi ir jiems leidžiama pastovėti tris minutes. Įpilama 0,5 ml kalio heksacianoferato (II) nusodiklio (4.3.2), kruopščiai sumaišoma, filtruojama per klostelėmis sulankstytą filtravimo popierių (5.4) ir skaidrus filtratas surenkamas į švarų mėgintuvėlį.

6.2.4. Filtratas perpilamas į 25 mm kiuvetę ir, naudojant specialų diską (5.3), spalvomatyje palyginamas su virinto bandinio kontrolės filtratu.

7. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

7.1. **Apskaičiavimas**

6.2.4 gautas tiesioginis atskaitymas užrašomas kaip p–nitrofenolio kiekis, µg, esantis 1 ml bandinio arba 1 ml regeneruoto bandinio.

7.2. **Pakartojamumas**

To paties bandinio dviejų analizių, atliktų tuo pat metu arba viena po kitos tomis pačiomis sąlygimos to paties analitiko, rezultatų skirtumas turi neviršyti 2µg p–nitrofenolio, kurį išskyrė 1 ml regeneruoto pieno.