31979L1067

PIERWSZA DYREKTYWA KOMISJI

z dnia 13 listopada 1979 r.

ustanawiająca wspólnotowe metody analiz do badania niektórych rodzajów częściowo lub całkowicie odwodnionego mleka konserwowanego przeznaczonego do spożycia przez ludzi

(79/1067/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 76/118/EWG z dnia 18 grudnia 1975 r. w sprawie zbliżania ustawodawstw Państw Członkowskich odnośnie do niektórych rodzajów częściowo lub całkowicie odwodnionego mleka konserwowanego przeznaczonego do spożycia przez ludzi [1], w szczególności jej art. 11,

a także mając na uwadze, co następuje:

na mocy art. 11 dyrektywy 76/118/EWG wymagane jest, aby skład niektórych rodzajów częściowo lub całkowicie odwodnionego mleka konserwowanego był weryfikowany za pomocą wspólnotowych metod analizy;

wskazane jest przyjęcie początkowej serii metod, w odniesieniu do których badania zostały ukończone;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Środków Spożywczych,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie podejmują wszelkie niezbędne środki dla zapewnienia, aby niezbędne analizy do weryfikacji kryteriów określonych w załączniku I były przeprowadzane zgodnie z metodami opisanymi w załączniku II.

Artykuł 2

Jeśli wyszczególnione są alternatywne metody dla pojedynczych oznaczeń, próbka może być analizowana każdą z metod. Sprawozdanie z badania, określone w załączniku II, musi podawać stosowaną metodę.

Artykuł 3

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy w terminie osiemnastu miesięcy od jej notyfikacji. Niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa jest skierowana do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 13 listopada 1979 r.

W imieniu Komisji
Étienne DAVIGNON
Członek Komisji

[1] Dz.U. L 24 z 30.1.1976, str. 49.

ZAŁĄCZNIK I

ZAKRES PIERWSZEJ DYREKTYWY DOTYCZĄCEJ WSPÓLNOTOWYCH METOD ANALIZ DO BADANIA NIEKTÓRYCH RODZAJÓW CZĘŚCIOWO LUB CAŁKOWICIE ODWODNIONEGO MLEKA KONSERWOWANEGO

I. **Przepisy ogólne**

II. **Oznaczanie suchej masy w:**

— niesłodzonym zagęszczonym mleku wysokotłuszczowym (przy zastosowaniu metody 1, załącznik II),

— niesłodzonym zagęszczonym mleku (przy zastosowaniu metody 1, załącznik II),

— niesłodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 1, załącznik II),

— niesłodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 1, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym mleku (przy zastosowaniu metody 1, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 1, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 1, załącznik II).

III. **Oznaczanie zawartości wody w:**

— wysokotłuszczowym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 2, załącznik II),

— pełnym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 2, załącznik II),

— częściowo odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 2, załącznik II),

— odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 2, załącznik II).

IV. **Oznaczanie zawartości tłuszczu w:**

— niesłodzonym zagęszczonym mleku wysokotłuszczowym (przy zastosowaniu metody 3, załącznik II),

— niesłodzonym zagęszczonym mleku (przy zastosowaniu metody 3, załącznik II),

— niesłodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 3, załącznik II),

— niesłodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 3, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym mleku (przy zastosowaniu metody 3, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 3, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 3, załącznik II),

— wysokotłuszczowym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 4, załącznik II),

— pełnym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 4, załącznik II),

— częściowo odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 4, załącznik II),

— odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 4, załącznik II),

V. **Oznaczanie zawartości sacharozy w:**

— słodzonym zagęszczonym mleku (przy zastosowaniu metody 5, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym (przy zastosowaniu metody 5, załącznik II),

— słodzonym zagęszczonym odtłuszczonym mleku (przy zastosowaniu metody 5, załącznik II).

VI. **Oznaczanie zawartości kwasu mlekowego i mleczanów w:**

— wysokotłuszczowym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 6, załącznik II),

— pełnym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 6, załącznik II),

— częściowo odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 6, załącznik II),

— odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 6, załącznik II)

VII. **Oznaczanie aktywności fosfatazy w:**

— wysokotłuszczowym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 7 lub 8, załącznik II),

— pełnym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 7 lub 8, załącznik II),

— częściowo odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 7 lub 8, załącznik II),

— odtłuszczonym mleku w proszku (przy zastosowaniu metody 7 lub 8, załącznik II).

ZAŁĄCZNIK II

METODY ANALIZ ODNOSZĄCE SIĘ DO SKŁADU NIEKTÓRYCH RODZAJÓW CZĘŚCIOWO LUB CAŁKOWICIE ODWODNIONEGO MLEKA KONSERWOWANEGO PRZEZNACZONEGO DO SPOŻYCIA PRZEZ LUDZI

PRZEPISY OGÓLNE

1. PRZYGOTOWANIE PRÓBKI DO ANALIZ CHEMICZNYCH

1.1. **Niesłodzone zagęszczone mleko wysokotłuszczowe**

Niesłodzone zagęszczone mleko

Niesłodzone zagęszczone mleko częściowo odtłuszczone

Niesłodzone zagęszczone mleko odtłuszczone

Wstrząsnąć i odwrócić zamkniętą puszkę. Otworzyć puszkę i powoli przelać mleko do innego, szczelnie zamykanego pojemnika, mieszając je poprzez kilkakrotne przelewanie. Upewnić się, czy cały tłuszcz i mleko przywierające do ścianek i dna puszki zostały wmieszane do próbki. Zamknąć pojemnik. Jeżeli zawartość nie jest jednolita, ogrzewać pojemnik w łaźni wodnej w temperaturze 40 °C. Potrząsać energicznie co 15 minut. Po 2 godzinach usunąć pojemnik z łaźni wodnej i ostudzić do temperatury pokojowej. Usunąć wieczko i dokładnie wymieszać zawartość pojemnika łyżką lub łopatką (jeżeli tłuszcz oddzielił się, próbka nie powinna być badana). Przechowywać w chłodnym miejscu.

1.2. **Słodzone zagęszczone mleko**

Słodzone zagęszczone mleko częściowo odtłuszczone

Słodzone zagęszczone mleko odtłuszczone

Puszki: Ogrzewać zamkniętą puszkę w łaźni wodnej w temperaturze 30–40 °C przez około 30 minut. Otworzyć puszkę i starannie wymieszać zawartość łopatką lub łyżką ruchami w górę, w dół i okrężnie, aby uzyskać jednorodną mieszaninę warstwy górnej i dolnej z całą zawartością. Upewnić się, czy pozostałe mleko przylegające do ścian i dna puszki zostało włączone do próbki. Przelać jak najdokładniej zawartość do drugiego pojemnika wyposażonego w szczelne wieczko. Zamknąć pojemnik i przechować go w chłodnym miejscu.

Próbówki: odciąć końcówkę i przelać zawartość do pojemnika wyposażonego w szczelne wieczko. Następnie przeciąć próbówkę wzdłuż. Wyskrobać cały materiał przylegający do wnętrza i zmieszać z resztą zawartości. Pojemnik przechowywać w chłodnym miejscu.

1.3. *Wysokotłuszczowe mleko proszku*

Pełne mleko w proszku

Częściowo odtłuszczone mleko w proszku

Odtłuszczone mleko w proszku

Przenieść mleko w proszku do czystego, suchego pojemnika (ze szczelnym wieczkiem) o pojemności dwukrotnie większej od objętości próbki. Zamknąć niezwłocznie pojemnik i starannie wymieszać zawartość przez wielokrotne potrząsanie i odwracanie pojemnika. Podczas przygotowywania próbki należy unikać wystawiania mleka w proszku na oddziaływanie powietrza atmosferycznego, aby zminimalizować absorpcję wody.

2. ODCZYNNIKI

2.1. **Woda**

2.1.1. Ilekroć jest mowa o wodzie do rozpuszczania, rozcieńczania lub płukania, stosowana jest woda destylowana lub woda odmineralizowana, o co najmniej równorzędnej czystości.

2.1.2. W przypadku odniesienia do „rozpuszczania”, „roztworu” lub „rozcieńczenia” bez dalszych wskazań, oznacza to „rozpuszczenie w wodzie”, „roztwór wodny” oraz „rozcieńczenie w wodzie”.

2.2. **Produkty chemiczne**

Wszystkie stosowane produkty chemiczne są uznanej analitycznej jakości, chyba że posiadają specyfikacje szczególne.

3. SPRZĘT

3.1. **Wykazy sprzętu**

Wykazy sprzętu zawierają tylko pozycje specjalistycznego zastosowania lub pozycje o specyfikacjach szczególnych.

3.2. **Waga analityczna**

Waga analityczna oznacza wagę umożliwiającą ważenie co najmniej z dokładnością do 0,1 mg.

4. WYRAŻANIE WYNIKÓW

4.1. **Obliczanie udziału procentowego**

Z wyjątkiem sytuacji, w których inaczej określono, wyniki są obliczane jako udział procentowy masy próbki, uzyskany w laboratorium.

4.2. **Liczba cyfr znaczących**

Wynik nie zawiera więcej cyfr znaczących niż liczba uzasadniona precyzją zastosowanej metody analitycznej.

5. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania wskazuje zastosowaną metodę analityczną, jak również uzyskane wyniki. Ponadto musi zawierać wszelkie szczegóły procedury, niewyszczególnione w metodzie analizy, lub takie, które są fakultatywne, jak również wszelkie okoliczności, które mogłyby mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Sprawozdanie z badania podaje wszelkie informacje niezbędne do pełnej identyfikacji próbki.

METODA 1: OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SUCHEJ MASY

(suszarka 99 °C)

1. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda określa zawartość suchej masy w:

— niesłodzonym zagęszczonym mleku wysokotłuszczowym,

— niesłodzonym zagęszczonym mleku,

— niesłodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym,

— niesłodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym,

— słodzonym zagęszczonym mleku,

— słodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym,

— słodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym.

2. DEFINICJA

Zawartość suchej masy mleka: zawartość suchej masy oznaczana przy zastosowaniu określonej metody.

3. ZASADA

Zasada polega na rozcieńczeniu wodą próbki znanej wielkości, wymieszaniu z piaskiem i suszeniu w temperaturze 99 °C ± 1 °C. Masa po wysuszeniu stanowi suchą masę i jest obliczana jako procent masy próbki.

4. ODCZYNNIKI

Piasek kwarcowy lub piasek morski, potraktowany kwasem chlorowodorowym (wielkość ziaren: 0,18–0,5 mm, to jest przechodzących przez sito 500 µm a zatrzymujących się na sicie 180 µm). Powinien odpowiadać następującej próbie kontrolnej:

Suszyć około 25 g piasku w suszarce (pkt 5.3) przez 2 godziny jak opisano w pkt 6.1.–6.3. Dodać 5 ml wody, suszyć ponownie w suszarce przez 2 godziny, ostudzić i ponownie zważyć. Różnica między dwoma ważeniami nie powinna przekroczyć 0,5 mg.

Jeżeli jest to niezbędne, zalać piasek 25-procentowym roztworem kwasu chlorowodorowego na 3 dni, mieszając od czasu do czasu. Płukać wodą, aż zaniknie reakcja kwasowa lub woda płucząca będzie wolna od chlorków. Suszyć w temperaturze 160 °C i ponownie przeprowadzić badanie jak powyżej.

5. APARATURA

5.1. Waga analityczna

5.2. Metalowe naczynka wagowe, najlepiej z niklu, aluminium lub stali nierdzewnej. Naczynka muszą posiadać bardzo dobrze dopasowane, ale łatwo zdejmowane wieczka. Stosowane wymiary: średnica 60–80 mm, wysokość 25 mm.

5.3. Suszarka pod ciśnieniem atmosferycznym, dobrze wentylowana, z termostatyczną kontrolą temperatury 99 °C ± 1 °C. Temperatura jest jednakowa w całej suszarce.

5.4. Eksykator zawierający świeżo aktywowany żel krzemionkowy ze wskaźnikiem zawartości wody lub równorzędny środek osuszający.

5.5. Pałeczki szklane, spłaszczone na jednym końcu, o długości umożliwiającej sięganie do wnętrza metalowych naczynek (pkt 5.2).

5.6. Wrząca łaźnia wodna.

6. PROCEDURA

6.1. Umieścić w naczynku wagowym (pkt 5.2) około 25 g piasku (pkt 4) i krótką szklaną pałeczkę (pkt 5.5).

6.2. Nie przykrywając naczynia i zawartości wieczkiem podgrzać naczynko wagowe z zawartością i wieczkiem i suszyć w suszarce (pkt 5.3) przez 2 godziny.

6.3. Umieścić wieczko i przenieść naczynko do eksykatora (pkt 5.4). Ostudzić do temperatury pokojowej i starannie zważyć z dokładnością do 0,1 mg (M_0).

6.4. Przechyliwszy naczynko, przesunąć piasek na jedną stronę naczynka. Na wolną powierzchnię przenieść około 1,5 g próbki słodzonego zagęszczonego mleka i 3,0 g niesłodzonego zagęszczonego mleka. Umieścić wieczko i starannie zważyć z dokładnością do 0,1 mg (M_1).

6.5. Zdjąć wieczko, dodać 5 ml wody i przy pomocy szklanej pałeczki wymieszać ciecze, a następnie piasek i ciecz. Pozostawić pałeczkę w mieszaninie.

6.6. Umieścić naczynko we wrzącej łaźni wodnej (pkt 5.6), aż woda wyparuje (zazwyczaj trwa to 20 minut). Mieszać zawartość od czasu do czasu przy użyciu pałeczki, utrzymując masę dobrze napowietrzoną, tak aby schnąc nie zbrylała się. Pozostawić pałeczkę wewnątrz naczynka.

6.7. Umieścić naczynko i wieczko w suszarce na 1,5 godziny.

6.8. Umieścić wieczko, przenieść naczynko do eksykatora (pkt 5.4), ostudzić do temperatury pokojowej i starannie zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

6.9. Ponownie umieścić naczynko i wieczko w suszarce, odkryć naczynko i suszyć je wraz z wieczkiem przez następną godzinę.

6.10. Powtórzyć czynność z pkt 6.8.

6.11. Powtarzać czynności z pkt 6.9 i 6.10, aż różnica masy między dwoma kolejnymi ważeniami będzie niższa niż 0,5 mg lub aż masa zacznie wzrastać. Jeżeli nastąpi wzrost masy, przyjąć najniższą masę otrzymaną w obliczeniach (pkt 7.1). Zanotować ostateczną masę jako M_2 g.

7. WYRAŻANIE WYNIKÓW

7.1. **Metoda obliczania**

Zawartość suchej masy, obliczonej jako udział procentowy masy próbki, przedstawia wzór:

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

gdzie:

M_0 = masa naczynka, wieczka i piasku po operacji z pkt 6.3, wyrażona w gramach;

M_1 = masa naczynka, wieczka i piasku po operacji z pkt 6.4, wyrażona w gramach;

M_2 = masa naczynka, wieczka, piasku i wysuszonej próbki po operacji z pkt 6.11, wyrażona w gramach.

7.2. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń, przeprowadzonych równocześnie lub w krótkich odstępach czasu na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekraczać 0,2 g suchej masy na 100 g produktu.

8. OBLICZANIE OGÓLNEJ SUCHEJ MASY MLECZNEJ I BEZTŁUSZCZOWEJ SUCHEJ MASY MLECZNEJ

8.1. **Zawartość ogólnej suchej masy mlecznej** w słodzonym zagęszczonym mleku jest przedstawiana jako:

Ogólna sucha masa (uzyskana przy zastosowaniu metody 1, załącznik II) – sacharoza (uzyskana przy zastosowaniu metody 5, załącznik II)

8.2. **Zawartość suchej beztłuszczowej masy mlecznej** w słodzonym zagęszczonym mleku jest przedstawiana jako:

Ogólna sucha masa (uzyskana przy zastosowaniu metody 1, załącznik II) – zawartość sacharozy (uzyskana przy zastosowaniu metody 5, załącznik II) i zawartość tłuszczu (uzyskana przy zastosowaniu metody 3, załącznik II).

8.3. **Zawartość suchej beztłuszczowej masy mlecznej** w niesłodzonym zagęszczonym mleku jest przedstawiana jako:

Ogólna sucha masa mleka (uzyskana metodą 1, załącznik II) – zawartość tłuszczu (uzyskana metodą 3, załącznik II).

METODA 2: OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WODY

(suszarka 102 °C)

1. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda określa ubytek masy przy suszeniu:

— wysokotłuszczowego mleka w proszku,

— pełnego mleka w proszku,

— częściowo odtłuszczonego mleka w proszku,

— odtłuszczonego mleka w proszku.

2. DEFINICJA

Zawartość wody: ubytek masy przy suszeniu, oznaczony przy zastosowaniu niniejszej metody.

3. ZASADA

Zasada polega na oznaczeniu pozostałości masy próbki po suszeniu w suszarce w temperaturze 102 °C ± 1 °C pod ciśnieniem atmosferycznym do stałej masy. Ubytek masy jest obliczany jako udział procentowy masy próbki.

4. APARATURA

4.1. Waga analityczna

4.2. Naczynka wagowe, najlepiej z niklu, aluminium, stali nierdzewnej lub szkła. Naczynka muszą posiadać bardzo dobrze dopasowane, ale łatwo zdejmowane wieczka. Stosowne wymiary: średnica 60–80 mm i wysokość 25 mm.

4.3. Suszarka pod ciśnieniem atmosferycznym, dobrze wentylowana, z termostatyczną kontrolą temperatury (102 °C ± 1 °C). Temperatura powinna być jednakowa w całej suszarce.

4.4. Eksykator, zawierający świeżo aktywowany żel krzemionkowy, ze wskaźnikiem zawartości wody, lub inny równorzędny środek osuszający.

5. PROCEDURA

5.1. Odkryć naczynko wagowe (pkt 4.2) i umieścić je wraz z wieczkiem w suszarce (pkt 4.3) i suszyć przez około 1 godziny.

5.2. Umieścić wieczko na naczynku i przenieść do eksykatora (pkt 4.4). Ostudzić do temperatury pokojowej i starannie zważyć z dokładnością do 0,1 mg (M_0).

5.3. Do naczynka wsypać około 2 g próbki mleka w proszku, przykryć naczynko wieczkiem i jak najszybciej starannie zważyć przykryte naczynko z dokładnością do 0,1 mg (M_1).

5.4. Odkryć naczynko i wstawić je wraz z wieczkiem do suszarki na 2 godziny.

5.5. Umieścić wieczko, przenieść przykryte naczynko do eksykatora, ostudzić do temperatury pokojowej i jak najszybciej starannie zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

5.6. Odkryć naczynko i suszyć je wraz z wieczkiem w suszarce przez 1 godzinę.

5.7. Powtórzyć czynność z pkt 5.5.

5.8. Powtórzyć czynność z pkt 5.6 i 5.5, aż spadek masy w dwóch kolejnych ważeniach nie przekroczy 0,5 mg lub aż masa zacznie wzrastać. Jeżeli nastąpi wzrost masy, przyjąć najniższą masę uzyskaną w obliczeniach (pkt 6.1). Zanotować ostateczną masę jako M_2 g.

6. WYRAŻANIE WYNIKÓW

6.1. *Metoda obliczania*

Obliczyć ubytek masy przy suszeniu próbki, wyrażony jako udział procentowy masy według wzoru:

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

gdzie:

M_0 = masa naczynka i wieczka po operacji z pkt 5.2, wyrażona w gramach;

M_1 = masa naczynka, wieczka i próbki po operacji z pkt 5.3, wyrażona w gramach;

M_2 = masa naczynka, wieczka i ostatecznej próbki po operacji z pkt 5.5, wyrażona w gramach.

6.2. *Powtarzalność*

Różnica wyników między dwoma oznaczeniami przeprowadzanymi równocześnie lub w krótkich odstępach czasu na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, przekracza 0,1 g wody na 100 g produktu.

METODA 3: OZNACZANIE ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU W ZAGĘSZCZONYM MLEKU (METODA RÖSE-GOTTLIEBA)

1. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda określa zawartość tłuszczu w:

— niesłodzonym zagęszczonym mleku wysokotłuszczowym,

— niesłodzonym zagęszczonym mleku pełnym,

— niesłodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym,

— niesłodzonym zagęszczonym mleku niesłodzonym,

— słodzonym zagęszczonym pełnym mleku,

— słodzonym zagęszczonym mleku częściowo odtłuszczonym,

— słodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym.

2. DEFINICJA

Zawartość tłuszczu w zagęszczonym mleku: zawartość tłuszczu oznaczona przy zastosowaniu określonej metody.

3. ZASADA

Zawartość tłuszczu jest określona za pomocą ekstrakcji tłuszczu eterem dietylowym i eterem naftowym z amoniakalno–alkoholowego roztworu próbki, odparowaniu rozpuszczalników, wagowym oznaczeniu pozostałości i obliczeniu jako procentu masy próbki, zgodnie z zasadą Röse-Gotlieba.

4. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki są zgodne z wymaganiami ślepej próby (pkt 6.1). Jeżeli jest to niezbędne, odczynniki mogą być ponownie przedestylowane w obecności około 1 g tłuszczu mlecznego na 100 ml rozpuszczalnika.

4.1. Około 25-procentowy (m/m) roztwór amoniaku NH_3 (masa właściwa w temperaturze 20 °C około 0,91 g/ml) lub silniejszy roztwór o znanym stężeniu.

4.2. Alkohol etylowy 96 ± 2 % (v/v) lub, jeśli to niemożliwe, alkohol etylowy skażony alkoholem metylowym, etylometyloketonem lub eterem naftowym.

4.3. Eter dietylowy, wolny od nadtlenków.

Uwaga 1:
Badanie na obecność nadtlenków: do 10 ml eteru w małym cylindrze z doszlifowanym szklanym korkiem, uprzednio wypłukanym eterem, odmierzyć 1 ml świeżo przygotowanego 10-procentowego roztworu jodku potasu. Wstrząsnąć i pozostawić na 1 minutę. W żadnej warstwie nie powinno się zaobserwować żółtego zabarwienia.

Uwaga 2:
Eter dietylowy można oczyścić od nadtlenków przez dodanie wilgotnej folii cynkowej, która została całkowicie zanurzona w rozcieńczonym zakwaszonym roztworze siarczanu miedzi na 1 minutę i następnie spłukana wodą. Użyć około 8 000 mm^2 folii cynkowej na 1 litr; pociąć w paski o dostatecznej długości, aby sięgały co najmniej do połowy wysokości pojemnika.

4.4. Eter naftowy o temperaturze wrzenia 30–60 °C.

4.5. Zmieszany roztwór, przygotowany na krótko przed użyciem przez zmieszanie równych objętości eteru dietylowego (pkt 4.3) i eteru naftowego (pkt 4.4) (tam gdzie wskazane jest użycie mieszaniny rozpuszczalników, można użyć albo samego eteru etylowego albo samego eteru naftowego).

5. APARATURA

5.1. Waga analityczna.

5.2. Odpowiednie probówki lub kolby do ekstrakcji, ze szklanymi szlifowanymi korkami lub innym zamknięciem nieulegającym działaniu rozpuszczalników.

5.3. Kolby cienkościenne, płaskodenne o pojemności 150–250 ml.

5.4. Suszarka pod ciśnieniem atmosferycznym, dobrze wentylowana, z termostatyczną kontrolą temperatury (102 °C ± 1 °C).

5.5. Materiał ułatwiający i regulujący wrzenie, wolny od tłuszczu, nieporowaty, niekruchy w użyciu, np. perełki szklane, kawałki węglika krzemu (użycie tego materiału jest fakultatywne, patrz pkt 6.2.1)

5.6. Lewarek, dopasowany do probówek do ekstrakcji.

5.7. Wirówka (fakultatywnie).

6. PROCEDURA

6.1. Ślepa próba

W tym samym czasie, co oznaczanie zawartości tłuszczu w próbce, przeprowadzić ślepą próbę z 10 ml wody, stosując ten sam typ zestawu do ekstrakcji, te same odczynniki, w tych samych ilościach i ten sam sposób wykonania oznaczenia, jak opisano poniżej, z wyjątkiem pkt 6.2.2. Jeśli wynik ślepej próby przekracza wartość 0,5 mg, należy sprawdzić odczynniki i oczyścić zanieczyszczony odczynnik lub odczynniki, lub wymienić.

6.2. Oznaczanie

6.2.1. Wysuszyć kolbę (pkt 5.3) (razem, jeżeli jest to wymagane, z materiałem ułatwiającym i regulującym wrzenie (pkt 5.5) podczas destylacji rozpuszczalników) w suszarce (pkt 5.4) przez 0,5–1 godziny. Ostudzić kolbę do temperatury pokojowej i starannie zważyć ostudzoną kolbę z dokładnością do 0,1 mg.

6.2.2. Wymieszać przygotowaną próbkę i niezwłocznie odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2–2,5 g próbki mleka słodzonego lub 4–5 g próbki mleka niesłodzonego bezpośrednio w lub przez przeniesienie do zestawu do ekstrakcji (pkt 5.2). Uzupełnić wodą do 10,5 ml i łagodnie wstrząsając prowadzić lekkie ogrzewanie (40–50 °C), aż do całkowitego rozwarstwienia produktu. Próbka musi być całkowicie rozwarstwiona, inaczej oznaczenie należy powtórzyć.

6.2.3. Dodać 1,5 ml amoniaku (25 %) (pkt 4.1) lub odpowiednią objętość silniejszego roztworu i dobrze wymieszać.

6.2.4. Dodać 10 ml alkoholu etylowego (pkt 4.2) i wymieszać ciecze delikatnie, lecz dokładnie, w otwartym zestawie.

6.2.5. Dodać 25 ml eteru dietylowego (pkt 4.3). Ostudzić pod bieżącą wodą. Zamknąć zestaw i wstrząsać energicznie i wielokrotnie odwracać przez 1 minutę.

6.2.6. Wyjąć ostrożnie korek i dodać 25 ml eteru naftowego (pkt 4.4), popłukując pierwszymi kilkoma mililitrami korek i wnętrze szyjki aparatu, pozwalając, aby popłuczyny ściekały do aparatu. Zamknąć korkiem i wstrząsać oraz odwracać wielokrotnie przez 30 sekund. Nie wstrząsać zbyt energicznie, jeśli nie będzie stosowane odwirowanie w pkt 6.2.7.

6.2.7. Odstawić aparat do ekstrakcji, aż górna warstwa cieczy stanie się klarowna i wyraźnie oddzieli się od dolnej warstwy wodnej. Można też przeprowadzić rozdział za pomocą odpowiedniej wirówki (pkt 5.7).

Uwaga:
Przy stosowaniu wirówki niezasilanej silnikiem trójfazowym może nastąpić iskrzenie i należy uważać, aby nie spowodować wybuchu lub pożaru wywołanego oparami eteru pochodzącymi np. z pękniętej probówki.

6.2.8. Usunąć korek i spłukać go oraz wnętrze szyjki aparatu kilkoma mililitrami mieszaniny rozpuszczalników (pkt 4.5) i pozwolić, aby popłuczyny spływały do aparatu. Ostrożnie przenieść jak najdokładniej warstwę cieczy sklarowanej nad osadem przez dekantację lub za pomocą lewarka (pkt 5.6) do przygotowanej kolby (pkt 6.2.1).

Uwaga:
Jeżeli przenoszenia dokonuje się bez lewarka, może być konieczne dodanie nieco wody, aby podnieść granicę faz między warstwami, ułatwiając w ten sposób dekantację.

6.2.9. Popłukać zewnętrzną i wewnętrzną stronę szyjki aparatu lub wierzchołek i dolną część lewarka kilkoma mililitrami mieszaniny rozpuszczalników (pkt 4.5). Pozwolić, aby popłuczyny z zewnętrznej powierzchni aparatu spływały do kolby, a popłuczyny z wewnętrznej części szyjki i z lewarka spływały do aparatu do ekstrakcji.

6.2.10. Przeprowadzić drugą ekstrakcję powtarzając czynności pkt 6.2.5–6.2.9 włącznie, ale stosując tylko 15 ml eteru dietylowego i 15 ml eteru naftowego.

6.2.11. Przeprowadzić trzecią ekstrakcję powtarzając czynności z pkt 6.2.10, ale pominąć końcowe płukanie (pkt 6.2.9).

Uwaga:
Nie jest obowiązkowe przeprowadzanie trzeciej ekstrakcji przy analizie niesłodzonego zagęszczonego mleka odtłuszczonego i słodzonego zagęszczonego mleka odtłuszczonego.

6.2.12. Ostrożnie odparować lub oddestylować jak najwięcej rozpuszczalnika (włącznie z alkoholem etylowym). Jeżeli kolba ma małą pojemność, trzeba będzie usunąć nieco rozpuszczalnika jak powyżej, po każdej ekstrakcji.

6.2.13. Kiedy zapach rozpuszczalnika nie jest już wyczuwalny, umieścić kolbę na boku w suszarce i suszyć przez 1 godzinę.

6.2.14. Wyjąć kolbę z suszarki, ostudzić do temperatury pokojowej i starannie zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

6.2.15. Powtórzyć czynności z pkt 6.2.13 i pkt 6.2.14, ogrzewając przez 30–60 minut, aż różnica masy między dwoma kolejnymi ważeniami będzie mniejsza niż wartość 0,5 mg lub aż masa zacznie wzrastać. Jeżeli nastąpi wzrost masy, przyjąć najniższą masę uzyskaną w obliczeniach (pkt 7.1). Zanotować ostateczną masę jako M_1 g.

6.2.16. Dodać 15–25 ml eteru naftowego, aby stwierdzić, czy wyekstrahowana substancja jest całkowicie rozpuszczona. Ogrzewać łagodnie i zawirować rozpuszczalnik, aż cały tłuszcz zostanie rozpuszczony.

6.2.16.1. Jeżeli wyekstrahowana substancja jest całkowicie rozpuszczona w eterze naftowym, masa tłuszczu stanowi różnicę między dwoma ważeniami, określonymi w pkt 6.2.1 i 6.2.15.

6.2.16.2. Jeśli pozostanie jakakolwiek substancja nierozpuszczona lub w przypadku wątpliwym, całkowicie wyekstrahować tłuszcz z kolb przez wielokrotne płukanie ciepłym eterem naftowym, pozwalając, aby nierozpuszczone substancje osadziły się na dnie przed każdą dekantacją. Przepłukać zewnętrzną powierzchnię szyjki kolby trzykrotnie. Suszyć położoną na boku kolbę przez 1 godzinę w suszarce, ostudzić do temperatury pokojowej jak uprzednio (pkt 6.2.1) i zważyć z dokładnością do 0,1 mg. Masa tłuszczu jest różnicą między masą uzyskaną wg pkt 6.2.15 i niniejszą masą ostateczną.

7. WYRAŻANIE WYNIKÓW

7.1. *Obliczanie wyniku*

Masa wyekstrahowanego tłuszczu, w gramach, wynosi:

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

a zawartość tłuszczu w próbce jest wyrażana w udziale procentowym wg wzoru:

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

gdzie:

M_1 = masa kolby M z tłuszczem, po etapie z pkt 6.2.15, wyrażona w gramach;

M_2 = masa kolby M po etapie z pkt 6.2.1 lub, w przypadku nierozpuszczonej lub wątpliwej substancji, pkt 6.2.16.2, wyrażona w gramach;

B_1 = masa kolby B w ślepej próbie po etapie z pkt 6.2.15, w gramach;

B_2 = masa kolby B po etapie z pkt 6.2.1 lub, w przypadku substancji nierozpuszczonej lub wątpliwej, po etapie z pkt 6.2.16.2, wyrażona w gramach;

S = masa użytej próbki, w gramach.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych równocześnie lub w krótkim odstępie czasu na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekroczyć wartości 0,05 g tłuszczu na 100 g produktu.

METODA 4: OZNACZANIE ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU W MLEKU W PROSZKU (METODA RÖSE-GOTLIEBA)

1. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda określa zawartość tłuszczu w:

— wysokotłuszczowym mleku w proszku,

— pełnym mleku w proszku,

— częściowo odtłuszczonym mleku w proszku,

— odtłuszczonym mleku w proszku.

2. DEFINICJA

Zawartość tłuszczu w mleku w proszku: zawartość tłuszczu oznaczona przy zastosowaniu określonej metody.

3. ZASADA

Zasada polega na ekstrakcji tłuszczu z amoniakalno–alkoholowego roztworu próbki przy użyciu eteru dietylowego i eteru naftowego, następnie odparowaniu rozpuszczalników i ważeniu pozostałości oraz obliczeniu procentu masy próbki zgodnie z zasadą Röse-Gotlieba.

4. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki powinny odpowiadać wymaganiom wyszczególnionym w ślepej próbie (pkt 6.1). Jeżeli jest to niezbędne, odczynniki mogą być ponownie przedestylowane w obecności około 1 g tłuszczu mlecznego na 100 ml rozpuszczalnika.

4.1. Roztwór amoniaku, około 25 % (m/m) NH_3 (masa właściwa w temperaturze 20 °C około 0,91 g/ml) lub silniejszy roztwór o znanym stężeniu.

4.2. Alkohol etylowy, 96 ± 2 % (v/v) lub, jeśli to niemożliwe, alkohol etylowy skażony alkoholem metylowym, etylometyloketonem lub eterem naftowym.

4.3. Eter etylowy wolny od nadtlenków.

Uwaga 1:
Próba na nadtlenki: do małego cylindra ze szklanym szlifowanym korkiem odmierzyć 10 ml świeżo przygotowanego 10-procentowego roztworu jodku potasowego. Wstrząsnąć i odstawić na 1 minutę. W żadnej warstwie nie powinno się zaobserwować żółtego zabarwienia.

Uwaga 2:
Eter dietylowy może być oczyszczony z nadtlenków przez dodanie wilgotnej folii cynkowej, która została całkowicie zanurzona w rozcieńczonym zakwaszonym roztworze siarczanu miedzi przez 1 minutę, a następnie wypłukana wodą. Użyć około 8 000 mm^2 folii cynkowej na 1 litr, pociętej na paski o dostatecznej długości, aby dosięgnąć co najmniej połowy wysokości pojemnika.

4.4. Eter naftowy o temperaturze wrzenia 30–60 °C.

4.5. Mieszanina rozpuszczalników, przygotowana na krótko przed użyciem przez wymieszanie jednakowych objętości eteru etylowego (pkt 4.3) i eteru naftowego (pkt 4.4) (kiedy wskazane jest użycie mieszaniny rozpuszczalników, może być ona zastąpiona albo samym eterem dietylowym, albo samym eterem naftowym).

5. APARATURA

5.1. Waga analityczna.

5.2. Odpowiednie probówki lub kolby do ekstrakcji ze szklanymi doszlifowanymi korkami lub innymi zamknięciami nieulegającymi działaniu rozpuszczalników.

5.3. Kolby płaskodenne, cienkościenne, o pojemności 150–250 ml.

5.4. Suszarka pod ciśnieniem atmosferycznym, dobrze wentylowana, z termostatyczną kontrolą temperatury (102 °C ± 1 °C).

5.5. Materiał ułatwiający i regulujący wrzenie, wolny od tłuszczu, nieporowaty, niekruchy w użyciu, np. perełki szklane lub kawałki węglika krzemu (stosowanie tego materiału nie jest obowiązkowe; patrz pkt 6.2.1).

5.6. Łaźnia wodna, 60–70 °C.

5.7. Lewarek dopasowany do probówek do ekstrakcji.

5.8. Wirówka.

6. WYKONANIE OZNACZENIA

6.1. **Ślepa próba**

W tym samym czasie, co oznaczanie zawartości tłuszczu w próbce, przeprowadzić ślepą próbę z 10 ml wody, stosując ten sam typ zestawu do ekstrakcji, te same odczynniki w tych samych ilościach i ten sam sposób wykonania oznaczenia jak podano poniżej, z wyjątkiem pkt 6.2.2. Jeśli wynik ślepej próby przekroczy wartość 0,5 mg, należy sprawdzić odczynniki i oczyścić zanieczyszczony odczynnik lub odczynniki lub wymienić.

6.2. **Oznaczanie**

6.2.1. Wysuszyć kolbę (pkt 5.3) (razem, jeżeli jest to wymagane, z materiałem ułatwiającym i regulującym wrzenie (pkt 5.5) podczas destylacji rozpuszczalników) w suszarce (pkt 5.4) przez 0,5–1 godziny. Ostudzić kolbę do temperatury pokojowej i starannie zważyć ostudzoną kolbę z dokładnością do 0,1 mg.

6.2.2. Starannie odważyć, z dokładnością do 1 mg bezpośrednio w lub przez przeniesienie do zestawu do ekstrakcji (pkt 5.2) około 1 g mleka pełnego w proszku lub około 1,5 g częściowo odtłuszczonego lub odtłuszczonego mleka w proszku. Dodać 10 ml wody i łagodnie wytrząsać, aż do całkowitego rozpuszczenia się proszku (niezbędne może być ogrzanie niektórych próbek).

6.2.3. Dodać 1,5 ml amoniaku (25 %) (pkt 4.1) lub odpowiednią objętość silniejszego roztworu i ogrzewać w łaźni wodnej (pkt 5.6) przez 15 minut w temperaturze 60–70 °C, co jakiś czas wstrząsając. Ostudzić, na przykład pod bieżącą wodą.

6.2.4. Dodać 10 ml alkoholu dietylowego (pkt 4.2) i delikatnie, lecz dokładnie wymieszać obie ciecze w otwartym zestawie do ekstrakcji.

6.2.5. Dodać 25 ml eteru dietylowego (pkt 4.3). Ostudzić pod bieżącą wodą. Zamknąć zestaw do ekstrakcji i wstrząsać energicznie i wielokrotnie odwracać przez 1 minutę.

6.2.6. Wyjąć ostrożnie korek i dodać 25 ml eteru naftowego (pkt 4.4), popłukując pierwszymi kilkoma mililitrami korek i wnętrze szyjki aparatu, pozwalając, aby popłuczyny ściekały do aparatu. Zamknąć korkiem i wytrząsać oraz odwracać kilkakrotnie przez 30 sekund. Nie wstrząsać zbyt energicznie, jeśli ma nie być stosowane odwirowanie w pkt 6.2.7.

6.2.7. Pozostawić aparat do ekstrakcji, aż górna warstwa cieczy stanie się klarowna i oddzieli się wyraźnie od dolnej warstwy wodnej. Można też przeprowadzić rozdział przy zastosowaniu odpowiedniej wirówki (pkt 5.8).

Uwaga:

Przy stosowaniu wirówki niezasilanej silnikiem trójfazowym może nastąpić iskrzenie i należy uważać, aby nie spowodować wybuchu lub pożaru wywołanego oparami eteru pochodzącymi np. z pękniętej probówki.

6.2.8. Usunąć korek i spłukać go oraz wnętrze szyjki aparatu kilkoma mililitrami mieszaniny rozpuszczalników (pkt 4.5) i pozwolić, aby popłuczyny spływały do aparatu. Ostrożnie przenieść jak najdokładniej warstwę cieczy sklarowanej nad osadem przez dekantację lub za pomocą lewarka (pkt 5.7) do przygotowanej kolby (pkt 6.2.1).

Uwaga:

Jeżeli przenoszenia dokonuje się bez lewarka, może być konieczne dodanie nieco wody, aby podnieść granicę faz między warstwami, ułatwiając w ten sposób dekantację.

6.2.9. Popłukać zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnię szyjki aparatu lub wierzchołek i dolną część lewarka przy użyciu kilku mililitrów mieszaniny rozpuszczalników. Pozwolić, aby popłuczyny z zewnętrznej powierzchni aparatu spływały do kolby, a popłuczyny z wewnętrznej powierzchni szyjki i z lewarka spływały do aparatu do ekstrakcji.

6.2.10. Przeprowadzić drugą ekstrakcję powtarzając czynności pkt 6.2.5–6.2.9 włącznie, ale stosując tylko 15 ml eteru dietylowego i 15 ml eteru naftowego.

6.2.11. Przeprowadzić trzecią ekstrakcję, powtarzając czynności z pkt 6.2.10, ale pominąć końcowe płukanie (pkt 6.2.9).

Uwaga:
Nie jest obowiązkowe przeprowadzanie trzeciej ekstrakcji przy analizie próbek mleka w proszku.

6.2.12. Ostrożnie odparować lub oddestylować możliwie najwięcej rozpuszczalnika (z alkoholem etylowym włącznie). Jeżeli kolba ma małą pojemność, trzeba będzie usunąć nieco rozpuszczalnika jak powyżej, po każdej ekstrakcji.

6.2.13. Kiedy zapach rozpuszczalnika nie jest już wyczuwalny, umieścić kolbę na boku w suszarce i suszyć przez 1 godzinę.

6.2.14. Wyjąć kolbę z suszarki, ostudzić do temperatury pokojowej jak uprzednio (pkt 6.2.1) i starannie zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

6.2.15. Powtórzyć czynności z pkt 6.2.13 i pkt 6.2.14, ogrzewając przez 30–60 minut, aż różnica masy między dwoma kolejnymi ważeniami będzie mniejsza niż wartość 0,5 mg lub aż masa zacznie wzrastać. Jeżeli nastąpi wzrost masy, przyjąć najniższą masę uzyskaną w obliczeniach (pkt 7.1). Zanotować ostateczną masę jako M_1 g.

6.2.16. Dodać 15–25 ml eteru naftowego, aby stwierdzić, czy wyekstrahowana substancja jest całkowicie rozpuszczona. Ogrzewać łagodnie i zawirować rozpuszczalnik, aż cały tłuszcz zostanie rozpuszczony.

6.2.16.1. Jeżeli wyekstrahowana substancja jest całkowicie rozpuszczona w eterze naftowym, masa tłuszczu stanowi różnicę między dwoma ważeniami, określonymi w pkt 6.2.1 i 6.2.15.

6.2.16.2. Jeżeli wyekstrahowana substancja nie rozpuści się całkowicie w eterze naftowym oraz w przypadkach wątpliwych wyekstrahować całkowicie tłuszcz z kolby przez kolejne wymywanie ciepłym eterem naftowym, pozwalając, aby nierozpuszczone substancje osadziły się na dnie przed każdą dekantacją. Przepłukać zewnętrzną powierzchnię szyjki kolby trzykrotnie.

Suszyć położoną na boku kolbę przez 1 godzinę w suszarce, ostudzić do temperatury pokojowej jak uprzednio (pkt 6.2.1) i zważyć z dokładnością do 0,1 mg. Masa tłuszczu jest różnicą między masą uzyskaną wg pkt 6.2.15 i niniejszą masą ostateczną.

7. WYRAŻANIE WYNIKÓW

7.1. **Obliczanie wyniku**

Masa wyekstrahowanego tłuszczu, w gramach:

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

a zawartość tłuszczu w próbce jest wyrażana w udziale procentowym wg wzoru:

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

gdzie:

M_1 = masa kolby M z tłuszczem, po etapie z pkt 6.2.15, wyrażona w gramach;

M_2 = masa kolby M po etapie z pkt 6.2.1. lub, w przypadku nierozpuszczonej lub wątpliwej substancji, po etapie z pkt 6.2.16.2, wyrażona w gramach;

B_1 = masa kolby B w ślepej próbie po etapie z pkt 6.2.15, w gramach;

B_2 = masa kolby B etapie z pkt 6.2.1 lub, w przypadku substancji nierozpuszczonej lub wątpliwej, po etapie z pkt 6.2.16.2, wyrażona w gramach;

S = masa użytej próbki, w gramach.

7.2. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń, przeprowadzonych równocześnie lub w krótkich odstępach czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekraczać 0,2 g tłuszczu na 100 g produktu, z wyjątkiem odtłuszczonego mleka w proszku, dla którego ta różnica nie może przekroczyć 0,1 g tłuszczu na 100 g produktu.

METODA 5: OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SACHAROZY (METODA POLAROMETRYCZNA)

1. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda określa zawartość sacharozy w:

— słodzonym zagęszczonym mleku,

— słodzonym zagęszczonym częściowo odtłuszczonym mleku,

— słodzonym zagęszczonym mleku odtłuszczonym.

Próbki nie mogą zawierać cukru inwertowanego.

2. DEFINICJA

Zawartość sacharozy w słodzonym zagęszczonym mleku: zawartość sacharozy oznaczana przy zastosowaniu niniejszej metody.

3. ZASADA

Metoda opiera się na zasadzie wynalazku Clergeta, polegającego na łagodnej obróbce próbki mleka przy użyciu kwasu, który powoduje całkowitą hydrolizę sacharozy, ale prawie żadną laktozy lub innych cukrów. Zawartość sacharozy jest otrzymywana na podstawie różnicy w skręcalności roztworu.

Klarowny filtrat próbki, bez mutarotacji spowodowanej przez laktozę, otrzymuje się przez potraktowanie roztworu amoniakiem, następnie neutralizację i sklarowanie go przez sukcesywne dodawanie roztworów octanu cynkowego i żelazocyjanku potasowego II.

W części filtratu sacharoza jest hydrolizowana w podany sposób.

Na podstawie skręcalności filtratu przed inwersją i po, oblicza się zawartość sacharozy, stosując odpowiednie wzory.

4. ODCZYNNIKI

4.1. Roztwór octanu cynkowego 1 M: rozpuścić 21,9 g skrystalizowanego hydratu octanu cynkowego $Zn(C_2H_3O_2)_2.2H_2O$ i 3 ml kwasu octowego lodowatego w wodzie i uzupełnić wodą do 100 ml.

4.2. Roztwór żelazocyjanku potasowego (II) 0,25M: rozpuścić 10,6 g skrystalizowanego 3 hydratu żelazocyjanku potasowego (II) $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ w wodzie i uzupełnić wodą do 100 ml.

4.3. Roztwór kwasu chlorowodorowego 6,35 ± 0,20 M (20–22 %) lub 5,0 ± 0,2 M (16–18 %).

4.4. Roztwór amoniaku, 2,0 ± 0,2 M (3,5 %).

4.5. Roztwór kwasu octowego, 2,0 ± 0,2 M (12 %).

4.6. Błękit bromotymolowy, 1-procentowy roztwór (m/v) w alkoholu etylowym.

5. APARATURA

5.1. Waga z dokładnością do 10 mg.

5.2. Rurka polarymetryczna 2 dm, o dokładnie wyskalowanej długości.

5.3. Polarymetr lub sacharymetr:

a) Polarymetr ze światłem sodowym lub zielonym światłem rtęciowym (lampa rtęciowa kwarcowa z pryzmatem lub specjalnym Ekranem Wratten 77 A) z dokładnością odczytu co najmniej do 0,05 stopni kątowych.

b) Sacharymetr z międzynarodową skalą cukrów, stosujący przepuszczanie białego światła przez piętnastomilimetrowy filtr 6-procentowego roztworu dichromianu potasu lub światło sodowe, z dokładnością odczytu co najmniej do 0,1 ° na międzynarodowej skali cukrów.

5.4. Łaźnia wodna, w 60 °C ± 1 °C.

6. PROCEDURA

6.1. **Oznaczenie kontrolne**

W celu znormalizowania sposobu procedury, odczynników i aparatury, przeprowadzić oznaczenie kontrolne w dwóch powtórzeniach, jak opisano poniżej, z użyciem mieszaniny 100 g mleka i 18 czystej sacharozy lub mieszaniny 110 g odtłuszczonego mleka i 18 g czystej sacharozy, gdzie każda mieszanina odpowiada 40 g zagęszczonego mleka o zawartości 45 % sacharozy. Obliczyć zawartość cukru przy zastosowaniu wzoru wg pkt 7, podstawiając zamiast M, F i P, odpowiednio, we wzorze 1, ilość użytego mleka oraz zawartość tłuszczu i białka w tym mleku, oraz we wzorze 2 zamiast M – wartość 40,00. Średnia uzyskanych wartości nie może się różnić więcej niż o 0,2 % od 45,0 %.

6.2. **Oznaczenie**

6.2.1. Do szklanej zlewki o pojemności 100 ml odważyć, z dokładnością do 10 mg, około 40 g dobrze wymieszanej próbki. Dodać 50 ml gorącej wody (80–90 °C) i dobrze wymieszać.

6.2.2. Mieszaninę przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 200 ml, popłukując zlewkę kilkakrotnie wodą o temperaturze 60 °C, aż cała objętość w kolbie wyniesie 120–150 ml. Wymieszać i ostudzić do temperatury pokojowej.

6.2.3. Dodać 5 ml rozcieńczonego roztworu amoniaku (pkt 4.4). Ponownie wymieszać i pozostawić w spokoju na 15 minut.

6.2.4. Zneutralizować amoniak dodając równoważną ilość rozcieńczonego roztworu kwasu octowego (pkt 4.5).Oznaczyć uprzednio dokładnie ilość ml przez miareczkowanie roztworu amoniaku przy użyciu błękitu bromotymolowego jako wskaźnika (pkt 4.6). Wymieszać.

6.2.5. Dodać, ostrożnie mieszając poprzez obracanie lekko pochylonej kolby, 12,5 ml roztworu octanu cynkowego (pkt 4.1).

6.2.6. Dodać 12,5 ml roztworu żelazocyjanku potasowego (II) (pkt 4.2) w ten sam sposób, co w odniesieniu do roztworu octanu.

6.2.7. Ustalić temperaturę zawartości kolby na 20 °C i uzupełnić kolbę do kreski wodą o temperaturze 20 °C.

Uwaga:
Podczas wszystkich dotychczas opisanych etapów wszelki dodatek wody lub odczynników powinien być dokonywany w taki sposób, aby uniknąć powstawania pęcherzyków powietrza, i mając to samo na uwadze, wszelkie mieszanie powinno być przeprowadzane raczej przez obracanie kolby niż przez wytrząsanie. Jeżeli pojawią się pęcherzyki powietrza przed uzupełnieniem kolby do 200 ml objętości, ich usunięcia można dokonać przez chwilowe połączenie kolby z pompą próżniową i obracanie kolby.

6.2.8. Zamknąć kolbę suchym korkiem i starannie wymieszać przez energiczne wstrząsanie.

6.2.9. Pozostawić na kilka minut, a następnie przesączyć przez suchy sączek z bibuły filtracyjnej, odrzucając pierwsze 25 ml filtratu.

6.2.10. Polaryzacja bezpośrednia: oznaczyć skręcalność optyczną filtratu w temperaturze 20 °C ± 1 °C.

6.2.11. Inwersja: odmierzyć pipetą 40 ml otrzymanego powyżej filtratu do kolby miarowej pojemności 50 ml. Dodać 6,0 ml kwasu chlorowodorowego 6,35 M lub 7,5 ml kwasu chlorowodorowego 5,0 M. (pkt 4.3).

Umieścić kolbę w łaźni wodnej o temperaturze 60 °C na 15 minut upewniwszy się, że cały pojemnik kolby jest zanurzony. Mieszać ostrożnie zawartość kolby ruchem rotacyjnym przez 5 minut, podczas których zawartość kolby powinna osiągnąć temperaturę łaźni. Ostudzić do temperatury 20 °C i uzupełnić do kreski wodą o temperaturze 20 °C. Wymieszać i pozostawić w spokoju na 1 godzinę w powyższej temperaturze.

6.2.12. *Polaryzacja odwrócona*

Oznaczyć skręcalność zinwertowanego roztworu w temperaturze 20 °C ± 0,2 °C. (Jednakże jeżeli temperatura T cieczy w rurce polarymetrycznej różni się więcej niż o 0,2 °C podczas pomiaru, wówczas należy uwzględnić poprawkę temperatury według pkt 7.2).

7. WYRAŻANIE WYNIKÓW

7.1. **Metoda obliczenia**

Obliczyć zawartość sacharozy według następujących wzorów:

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

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

gdzie:

S = zawartość sacharozy;

M = masa odważonej próbki, wyrażona w gramach;

F = zawartość procentowa tłuszczu w próbce;

P = procentowa zawartość białka (N x 6,38) w próbce;

V = objętość, do której rozcieńczono próbkę przed filtracją, w mililitrach;

v = poprawka na objętość osadu powstałego podczas klaryfikacji, w mililitrach;

D = bezpośredni odczyt na skali polarymetru (polaryzacja przed inwersją);

I = odczyt na skali polarymetru po inwersji;

L = długość rurki polarymetrycznej w dm;

Q = współczynnik inwersji, którego wartości podano poniżej.

Uwagi:

a) Jeśli jest odważone dokładnie 40,00 g zagęszczonego mleka i stosuje się polarymetr ze światłem sodowym, stopniami kątowymi i rurką polarymetryczną 2 dm długości, w temperaturze 20 °C ± 0,1 °C, zawartość sacharozy w zwykłym zagęszczonym mleku (C = 9) można obliczyć według następującego wzoru:

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

b) Jeżeli pomiaru odwróconej polaryzacji dokonuje się w temperaturze niższej niż 20 °C, cyfry należy pomnożyć przez:

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

7.2. **Wartości współczynnika inwersji Q**

Następujące wzory podają dokładne wartości dla Q, dla różnych źródeł światła z poprawkami dla natężenia i temperatury:

Światło sodowe i polarymetr ze stopniami kątowymi:
Q = 0,8825 + 0,0006 (C – 9) – 0,0033 (T – 20).

Zielone światło rtęciowe i polarymetr ze stopniami kątowymi:
Q = 1,0392 + 0,0007 (C – 9) – 0,0039 (T – 20).

Białe światło z filtrem dichromianowym i sacharymetr ze stopniami międzynarodowej skali cukrowej
Q = 2,549 + 0,0017 (C – 9) – 0,0095 (T – 20).

W powyższych wzorach:

C = procentowa zawartość całego cukru w roztworze zinwertowanym podczas polaryzacji,

T = temperatura zinwertowanego roztworu podczas odczytu polarymetrycznego.

Uwaga 1:
Udział procentowy zawartości całego cukru C w zinwertowanym roztworze można obliczyć na podstawie bezpośredniego odczytu i zmiany przy inwersji w zwykły sposób, stosując normalne wartości dla skręcalności właściwej sacharozy, laktozy i inwertowanego cukru.
Poprawka 0,0006 (C – 9) itp. jest dokładna tylko, gdy C wynosi 9; dla zwykłego zagęszczonego mleka można ją pominąć, gdy C jest bliskie 9.

Uwaga 2:
Odchylenia temperatury od 20 °C o 1 °C stwarzają małą różnicę w odczycie bezpośrednim, ale wahania powyżej 0,2 °C przy odczycie inwersji wymagają poprawki. Ta poprawka 0,0033 (T – 20) itp. jest dokładna tylko dla temperatur w przedziale 18–22 °C.

7.3. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń, przeprowadzonych równocześnie lub w krótkim odstępie czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekroczyć 0,3 g sacharozy na 100 g zagęszczonego mleka.

METODA 6: OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU MLEKOWEGO I MLECZANÓW

1. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda określa zawartość kwasu mlekowego i mleczanów, w przeliczeniu na kwas mlekowy w:

— wysokotłuszczowym mleku w proszku,

— pełnym mleku w proszku,

— częściowo odtłuszczonym mleku w proszku,

— odtłuszczonym mleku w proszku.

2. DEFINICJA

Zawartość kwasu mlekowego i mleczanów w przeliczeniu na kwas mlekowy w mleku w proszku, oznaczana przy zastosowaniu określonej metody.

3. ZASADA

Tłuszcz, białka i laktoza są jednocześnie usuwane z roztworu próbki poprzez dodanie siarczanu miedziowego i wodorotlenku wapniowego, a następnie filtrację.

Kwas mlekowy i mleczany w filtracie są przekształcane na aldehyd octowy przy użyciu stężonego kwasu siarkowego w obecności siarczanu miedziowego II.

Zawartość kwasu mlekowego oznacza się kolorymetrycznie, przy użyciu p–fenohydroksydifenylu.

Zawartość kwasu mlekowego i mleczanów jest wyrażana w miligramach kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej.

4. ODCZYNNIKI

4.1. Roztwór siarczanu miedziowego (II): rozpuścić 250 g siarczanu miedziowego (II) ($CuSO_4.5H_2O$) w wodzie i rozcieńczyć wodą do 1 000 ml.

4.2. Zawiesina wodorotlenku wapniowego

4.2.1. Zmielić 300 g wodorotlenku wapniowego ($Ca(OH)_2$) w moździerzu, uzupełniając wodą do 900 ml. Zawiesina powinna być przygotowana świeżo przed użyciem.

4.2.2. Zawiesina wodorotlenku wapniowego: zmielić 300 g wodorotlenku wapniowego ($Ca(OH)_2$) w moździerzu, uzupełniając wodą do 1 400 ml. Zawiesina powinna być przygotowana świeżo przed użyciem.

4.3. Roztwór kwasu siarkowego i siarczanu miedziowego (II): Do 300 ml kwasu siarkowego, o stężeniu 95,9–97,0 % (m/m) H_2SO_4, dodać 0,5 ml roztworu siarczanu miedziowego (II) (pkt 4.1).

4.4. Roztwór p–hydroksydifenylu ($C_6H_5C_6H_4OH$): rozpuścić wstrząsając i łagodnie ogrzewając 0,75 g p–hydroksydwufenylu w 5 ml wodnego roztworu wodorotlenku sodowego, zawierającego 5 g NaOH na 100 ml. Rozcieńczyć wodą w kolbie miarowej do 50 ml. Przechowywać roztwór w brązowej szklanej butelce, w ciemnym i chłodnym miejscu. Nie stosować, jeśli kolor ulegnie zmianie lub pojawi się zmętnienie. Maksymalny okres trwałości wynosi 72 godziny.

4.5. Roztwór mianowany kwasu mlekowego: na krótko przed użyciem rozpuścić 0,1067 g mleczanu litowego ($CH_3CHOHCOOLi$) w wodzie i rozcieńczyć do 1 000 ml w kolbie miarowej. 1 ml tego roztworu odpowiada 0,1 mg kwasu mlekowego.

4.6. Wzorzec rekonstytuowanego mleka: przeprowadzić wcześniej analizę kilkunastu próbek mleka w proszku wysokiej jakości. Do przygotowania krzywej kalibracji wybrać próbkę mającą najniższą zawartość kwasu mlekowego, zawierającą nie więcej niż 30 mg kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej. Przeprowadzić czynności wg pkt 6.2.1. i 6.2.2.

5. APARATURA

5.1. Waga analityczna

5.2. Spektrofotometr odpowiedni do odczytów przy długości fali 570 nm.

5.3. Łaźnia wodna, 30 °C ± 2 °C.

5.4. Moździerz i tłuczek do moździerza.

5.5. Bibuła filtracyjna (Schleicher i Schull 595, Whatman 1 lub równorzędna)

5.6. Probówki ze szkła pyreksowego lub równorzędne (wymiary 25 × 150 mm).

Uwaga:
Całe szkło musi być doskonale czyste i przeznaczone do użytku wyłącznie do niniejszego oznaczenia. Przed umyciem przepłukać szkło zawierające pozostałości osadu stężonym kwasem chlorowodorowym.

6. PROCEDURA

6.1. **Ślepa próba**

Przeprowadzić ślepą próbę umieszczając 30 ml wody w wyskalowanej probówce o pojemności 50 ml i postępować z tą probówką jako to opisano w pkt 6.2.4–6.2.11 włącznie. Jeżeli wynik ślepej próby przeprowadzonej z wodą przekracza równowartość 20 mg kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej, należy sprawdzić odczynniki i zanieczyszczony odczynnik lub odczynniki wymienić. Przeprowadzić ślepą próbę w tym samym czasie, co analizę próbki.

6.2. **Oznaczanie**

Uwaga:

Należy unikać zanieczyszczenia, szczególnie śliną lub potem.

6.2.1. Oznaczyć zawartość suchej masy beztłuszczowej a) próbki, w gramach, przez odjęcie zawartości tłuszczu (uzyskanej metodą 4) i zawartości wody (uzyskanej metodą 2) od 100.

6.2.2. Odważyć $\frac{1000}{(a - 10)}$ g próbki z dokładnością do 0,1 g. Dodać tę ilość próbki do 100 ml wody i dokładnie wymieszać.

6.2.3. Odmierzyć pipetą 5 ml otrzymanego roztworu do wyskalowanej probówki o pojemności 50 ml i rozcieńczyć wodą do około 30 ml.

6.2.4. Dodawać powoli, wstrząsając, 5 ml roztworu (pkt 4.1) siarczanu miedziowego (II) i odstawić na 10 minut.

6.2.5. Dodawać powoli, wstrząsając, 5 ml zawiesiny wodorotlenku wapniowego (pkt 4.2.1.) lub 10 ml zawiesiny wodorotlenku wapniowego (pkt 4.2.2.).

6.2.6. Rozcieńczyć wodą do 50 ml, wstrząsnąć energicznie, pozostawić w spokoju na 10 minut, następnie przefiltrować. Odrzucić pierwszy odciek filtratu.

6.2.7. Odmierzyć pipetą 1 ml filtratu do probówki (pkt 5.6.).

6.2.8. Przy użyciu biurety lub wyskalowanej pipety dodać do probówki 6,0 ml roztworu (pkt 4.3) kwasu siarkowego i siarczanu miedziowego (II). Wymieszać.

6.2.9. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut. Ostudzić do temperatury pokojowej pod bieżącą wodą.

6.2.10. Dodać 2 krople odczynnika p–hydroksydifenylu (pkt 4.4) i wstrząsać energicznie, aby odczynnik rozszedł się równomiernie w całej cieczy. Umieścić probówkę w łaźni wodnej w temperaturze 30 °C ± 2 °C, pozostawić na 15 minut, wstrząsając od czasu do czasu.

6.2.11. Umieścić probówkę we wrzącej łaźni wodnej na 90 sekund. Ostudzić do temperatury pokojowej pod bieżącą wodą.

6.2.12. Dokonać pomiaru wartości absorpcji wobec ślepej próby (pkt 6.1) w ciągu 3 godzin przy długości fali wymienionej w pkt 5.2.

6.2.13. Jeżeli wartość absorpcji przekracza wartość najwyższego punktu na krzywej wzorcowej, powtórzyć próbę stosując odpowiednie rozcieńczalniki filtratu otrzymanego w pkt 6.2.6.

6.3. **Przygotowanie wzorca**

6.3.1. Odmierzyć pipetą 5 ml rekonstytuowanego mleka (pkt 4.6) do pięciu wyskalowanych probówek o pojemności 50 ml. Odmierzyć pipetą do tych probówek odpowiednio 0, 1, 2, 3 i 4 ml roztworu mianowanego (pkt 4.5) tak, aby otrzymać zakres odpowiadający 0, 20, 40, 60 i 80 mg dodanego kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej mleka w proszku.

6.3.2. Rozcieńczyć wodą do około 30 ml i przeprowadzić czynności z pkt 6.2.4–6.2.11.

6.3.3. Dokonać pomiaru wartości absorpcji wzorców (pkt 6.3.1) wobec ślepej próby (pkt 6.1.) przy długości fali wyszczególnionej w pkt 5.2. Wykreślić wykres wartości absorpcji wobec ilości kwasu mlekowego podanych w pkt 6.3.1, to jest 0, 20, 40, 60 i 80 mg suchej masy beztłuszczowej. Przeprowadzić najbardziej pasującą linię prostą przez te punkty i wykreślić krzywą wzorcową przez przesuwanie tej linii równolegle wobec siebie, tak aby przechodziła przez punkt wyjściowy.

7. WYRAŻENIE WYNIKÓW

7.1. **Metoda obliczania**

Przekształcić wartość absorpcji, odczytaną wg pkt 6.2.12 lub 6.2.13, na miligramy kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej próbki, odwołując się do krzywej wzorcowej. Pomnożyć ten wynik przez współczynnik rozcieńczenia tam, gdzie filtrat został rozcieńczony wg pkt 6.2.13.

7.2. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równocześnie lub w krótkich odstępach czasu, na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekroczyć 8 mg kwasu mlekowego na 100 g suchej masy beztłuszczowej dla zawartości do 80 mg. Dla wyższych wartości różnica ta nie może przekroczyć 10 % najniższej wartości.

METODA 7: OZNACZANIE AKTYWNOŚCI FOSFATAZY (ZMODYFIKOWANA METODA SANDERSA I SAGERA)

1. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda opisuje oznaczanie aktywności fosfatazy w:

— wysokotłuszczowym mleku w proszku,

— pełnym mleku w proszku,

— częściowo odtłuszczonym mleku w proszku,

— odtłuszczonym mleku w proszku.

2. DEFINICJA

Aktywność fosfatazy w mleku w proszku stanowi miarę ilości obecnej aktywnej fosfatazy alkalicznej. Jest wyrażana jako ilość fenolu, w μg, uwalniana przez 1 ml rekonstytuowanego mleka, oznaczana przy zastosowaniu niniejszej metody.

3. ZASADA

Aktywność fosfatazy w mleku w proszku jest określana zdolnością fosfatazy do uwalniania fenolu z disodowego fosforanu fenylowego. Ilość fenolu uwolniona w opisanych warunkach jest oznaczana przez pomiar spektrofotometryczny barwy wywołanej przez odczynnik Gibba.

4. ODCZYNNIKI

4.1. **Roztwór A**

Bufor: wodorotlenek boranowo–barowy: pH 10,6 ± 0,1 w temperaturze 20 °C.

Rozpuścić: 25,0 g 8-hydratu wodorotlenku barowego ($Ba(OH)_2.8H_2O$ w wodzie i rozcieńczyć do 500 ml.

Rozpuścić: 11,0 g kwasu ortoborowego (H_3BO_3) w wodzie i rozcieńczyć do 500 ml.

Ogrzać oba roztwory do 50 °C i wymieszać.

Wstrząsnąć i oziębić mieszaninę do temperatury pokojowej.

Uregulować pH do 10,6 ± 0,1 przy użyciu roztworu wodorotlenku barowego i przefiltrować.

Przechowywać roztwór w szczelnie zamkniętym pojemniku.

Przed użyciem rozcieńczyć bufor taką samą ilością wody.

4.2. **Roztwór B:**

Bufor wywołujący barwę.

Rozpuścić: 6,0 g metaboranu sodowego ($NaBO_2$) (lub 12,6 g $NaBO_2.4H_2O$) i 20,0 g chlorku sodowego (NaCl) w wodzie i rozcieńczyć wodą do 1 000 ml.

4.3. **Roztwór C**

Roztwór substratu buforowego.

4.3.1. Rozpuścić 0,5 g fenylofosforanu disodowego ($Na_2C_6H_5PO_4.2H_2O$) w 4,5 ml roztworu B (pkt 4.2). Dodać dwie krople roztworu E (pkt 4.5) i odstawić na 30 minut. Wywołać barwę przy użyciu 2,5 ml butanolu (pkt 4.10). Jeśli potrzeba, powtórzyć ekstrakcję barwy. Po rozdzieleniu odrzucić butanol. Roztwór można przechowywać kilka dni w lodówce. Przed użyciem jeszcze raz wywołać i wyekstrahować barwę.

4.3.2. Odmierzyć pipetą 1 ml powyższego roztworu do kolby miarowej pojemności 100 ml i uzupełnić objętość roztworem A. Przygotowywać roztwór buforowy tuż przed użyciem.

4.4. **Roztwór D**

Odczynnik strącający.

Rozpuścić 3,0 g siarczanu cynkowego ($ZnSO_4.7H_2O$) i 0,6 g siarczanu ($CuSO_4.5H_2O$) miedziowego (II) w wodzie i uzupełnić wodą do 100 ml.

4.5. **Roztwór E**

Odczynnik Gibba.

Rozpuścić 0,040 g 2,6–dib.omochinonu 1,4–chloroimidu ($O{\cdot}C_6H_2Br_2{\cdot}NCl$) w 10 ml 96-procentowego alkoholu etylowego. Przechowywać roztwór w ciemnej szklanej butelce w lodowce. Wyrzucić odczynnik, jeśli się odbarwi.

4.6. Bufor rozcieńczenia barwy

Rozcieńczyć 10 ml roztworu B (pkt 4.2), buforu wywołującego barwę, z wodą i uzupełnić do 100 ml przy użyciu wody.

4.7. Roztwór siarczanu miedziowego

Rozpuścić 0,05 g siarczanu miedziowego (II) ($CuSO_4.5H_2O$) w wodzie i uzupełnić wodą do 100 ml.

4.8. Roztwór wzorca fenolowego

Rozpuścić 0,200 ± 0,001 g czystego fenolu w wodzie i uzupełnić wodą do 100 ml w kolbie miarowej. Ten roztwór może być przechowywany przez kilkanaście miesięcy w lodówce. Rozcieńczyć 10 ml roztworu do 100 ml przy użyciu wody. Ten rozcieńczony roztwór zawiera 200 µg fenolu w 1 ml i może być stosowany do przygotowywania bardziej rozcieńczonych roztworów.

4.9. Woda destylowana, wrząca.

4.10. n–butanol.

5. APARATURA

5.1. Waga analityczna.

5.2. Łaźnia wodna z termostatyczną kontrolą temperatury 37 °C ± 1 °C.

5.3. Spektrofotometr odpowiedni do odczytów przy długości fali 610 nm.

5.4. Bibuła filtracyjna (Schleicher i Schull 597, Whatman 42 lub równorzędna bibuła filtracyjna).

5.5. Łaźnia wodna, wrząca.

5.6. Folia aluminiowa.

6. PROCEDURA

Środki ostrożności:

1. Unikać bezpośredniego oddziaływania promieni słonecznych.
2. Całe szkło, korki i materiały służące do manipulacji powinny być doskonale czyste. Zaleca się, aby były płukane i sterylizowane wodą lub poddawane działaniu pary.
3. Unikać stosowania materiałów z tworzywa (na przykład korków), gdyż mogą one zawierać fenole.
4. Ślina zawiera fosfatazę; dlatego należy unikać zanieczyszczenia śladowymi ilościami śliny.

6.1. **Przygotowanie próbki.**

6.1.1. Odważyć 10 g próbki, z dokładnością do 0,1 g, i rozpuścić w 90 ml wody. Temperatura rozpuszczania proszku nie może w żadnych okolicznościach przekroczyć 35 °C.

6.2. **Oznaczanie**

6.2.1. Odmierzyć do każdej z dwóch probówek po 1 ml rekonstytuowanego mleka przygotowanego wg pkt 6.1.1.

6.2.2. Ogrzewać jedną z probówek we wrzącej wodzie przez 2 minuty. Przykryć probówkę i łaźnię wodną (pkt 5.5) lub na przykład zlewkę, folią aluminiową (pkt 5.6), aby upewnić się, że cała probówka będzie ogrzewana. Ostudzić do temperatury pokojowej w zimnej wodzie. Użyć tę probówkę do ślepej próby. W dalszych kolejnych czynnościach, traktować te dwie probówki w identyczny sposób.

6.2.3. Dodać 10 ml roztworu C (pkt 4.3.2). Wymieszać i wstawić próbówkę do łaźni wodnej o temperaturze 37 °C (pkt 5.2).

6.2.4. Inkubować przez 60 minut w łaźni wodnej, okresowo wstrząsając.

6.2.5. Przenieść niezwłocznie probówki do wrzącej łaźni wodnej (pkt 5.5) i ogrzewać przez 2 minuty; ostudzić do temperatury pokojowej w zimnej wodzie.

6.2.6. Dodać 1 ml roztworu D (pkt 4.4), wymieszać i przesączyć przez suchą bibułę filtracyjną; odrzucić pierwszy odciek filtratu aż do uzyskania klarownej cieczy.

6.2.7. Odmierzyć 5 ml każdego filtratu do probówek, dodać 5 ml roztworu B (pkt 4.2) i 0,1 ml roztworu E (pkt 4.5). Wymieszać.

6.2.8. Pozostawić do pojawienia się barwy w temperaturze pokojowej przez 30 minut z dala od bezpośredniego oddziaływania promieni słonecznych.

6.2.9. Dokonać pomiaru wartości gęstości optycznej roztworu próbki wobec ślepej próby przy długości fali wskazanej w pkt 5.3.

6.2.10. Powtórzyć oznaczenie, jeśli wartość absorpcji roztworu znajduje się powyżej wartości próbki wzorcowej o 20 μg fenolu, otrzymanego wg pkt 7.

Jeżeli ta granica zostanie przekroczona, rozcieńczyć odpowiednią objętość rekonstytuowanego mleka wg pkt 6.1.1 z odpowiednią objętością tegoż mleka, ostrożnie ogrzaną do wrzenia jak w pkt 6.2.2, aby unieczynnić obecną fosfatazę.

7. PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ

7.1. Do czterech kolb miarowych o pojemności 100 ml odmierzyć 1, 3, 5 i 10 ml roztworu mianowanego rozcieńczonego wg pkt 4.8 i uzupełnić do kreski wodą; roztwory te zawierają odpowiednio 2, 6, 10 i 20 µg fenolu w 1 ml.

7.2. Odmierzyć pipetą 1 ml wody lub 1 ml każdego roztworu wzorcowego (pkt 7.1.) do probówek, aby uzyskać serię próbek, zawierających 0 (wartość ślepej próby przy użyciu 1 ml wody), 2, 6, 10 i 20 µg fenolu.

7.3. Odmierzyć pipetą kolejno do każdej probówki 1 ml roztworu siarczanu (pkt 4.7.) miedziowego (II), 5 ml roztworu buforowego rozcieńczenia barwy (pkt 4.6), 3 ml wody i 0,1 ml roztworu E (pkt 4.5). Wymieszać.

7.4. Pozostawić probówki na 30 minut w temperaturze pokojowej z dala od bezpośredniego oddziaływania promieni słonecznych.

7.5. Dokonać pomiaru wartości absorpcji roztworów w każdej z probówek w porównaniu ze ślepą próbą, przy długości fali wskazanej w pkt 5.3.

7.6. Wykreślić krzywą wzorcową, sporządzając wykres wartości absorpcji wobec ilości fenolu w µg wg pkt 7.2.

8. WYRAŻANIE WYNIKÓW

8.1. **Obliczanie**

8.1.1. Przekształcić cyfry podane w pkt 6.2.9 w µg fenolu, w odniesieniu do krzywej wzorcowej.

8.1.2. Obliczyć aktywność fosfatazy w przeliczeniu na µg fenolu w 1 ml rekonstytuowanego mleka wg następującego wzoru:

Aktywność fosfatazy = 2,4 × P

gdzie P = ilość fenolu w µg, według pkt 8.1.1.

8.1.3. Gdyby było niezbędne rozcieńczenie wg pkt 6.2.10, pomnożyć wynik uzyskany w pkt 8.1.2 przez współczynnik rozcieńczenia.

8.2. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń, przeprowadzonych równocześnie lub w krótkim odstępie czasu na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekroczyć 2 µg fenolu uwolnionego przez 1 ml rekonstytuowanego mleka.

METODA 8: OZNACZANIE AKTYWNOŚCI FOSFATAZY (METODA ASCHAFFENBURGA I MÜLLENA)

1. **ZAKRES STOSOWANIA**

Metoda opisuje oznaczanie aktywności fosfatazy w:

— wysokotłuszczowym mleku w proszku,

— pełnym mleku w proszku,

— częściowo odtłuszczonym mleku w,

— odtłuszczonym mleku w proszku.

2. DEFINICJA

Aktywność fosfatazy w mleku w proszku jest miarą ilości aktywnej fosfatazy alkalicznej obecnej w produkcie. Jest ona wyrażana jako ilość p–nitrofenolu w mikrogramach, uwolnionego przez 1 ml rekonstytuowanej próbki w opisanych warunkach.

3. ZASADA

Zasada polega na rozcieńczeniu rekonstytuowanej próbki mleka przy użyciu substratu buforowego przy pH 10,2 i inkubacji w temperaturze 37 °C przez 2 godziny. Wszelka fosfataza alkaliczna obecna w próbce, będzie w tych okolicznościach uwalniać p–nitrofenol z dodanego disodowego fosforanu p–nitrofenolowego. Uwolniony p–nitrofenol jest oznaczany przez bezpośrednie porównania z wzorcowymi szkiełkami barwnymi w komparatorze z użyciem odbitego światła.

4. ODCZYNNIKI

4.1. Roztwór buforowy wodorowęglanu i węglanu sodowego.

Rozpuścić 3,5 g bezwodnego węglanu sodowego i 1,5 g wodorowęglanu sodowego w wodzie i rozcieńczyć wodą do 1 000 ml w kolbie miarowej.

4.2. Substrat buforowy.

Rozpuścić 1,5 g p–nitrofenylofosforanu disodowego w buforze: wodorowęglan–węglan sodowy (pkt 4.1) i rozcieńczyć buforem (pkt 4.1) w kolbie miarowej do 1 000 ml.

Ten roztwór jest stabilny, jeśli jest przechowywany w lodówce (4 °C) przez 1 miesiąc, ale powinna być przeprowadzona próba kontrolna barwy dla tak przechowywanych roztworów – patrz pkt 6, uwaga 3.

4.3. Roztwory klarujące.

4.3.1. Roztwór siarczanu cynkowego.

Rozpuścić 30,0 g siarczanu cynkowego ($ZnSO_4$) w wodzie i rozcieńczyć wodą do 100 ml w kolbie miarowej.

4.3.2. Roztwór żelazocyjanku (II) potasowego.

Rozpuścić 17,2 g 3-hydratu żelazocyjanku (II) potasu ($K_4Fe(CN)_6.3H_2O$) i rozcieńczyć wodą do 100 ml w kolbie miarowej.

5. APARATURA

5.1. Waga analityczna.

5.2. Łaźnia wodna z termostatyczną kontrolą temperatury 37 °C ± 1 °C.

5.3. Komparator, ze specjalnym krążkiem, zawierającym wzorcowe szkiełka barwne, wyskalowane w µg p–nitrofenolu w 1 ml mleka oraz naczynka 2 × 25 mm.

6. PROCEDURA

Środki ostrożności:

1. Po użyciu probówki muszą być opróżnione, wypłukane w wodzie, umyte w gorącej wodzie zawierającej detergent alkaliczny, następnie starannie wy płukane w czystej gorącej wodzie z kranu. Na zakończenie, muszą być wypłukane w wodzie i wysuszone przed użyciem.

   Pipety muszą być starannie wypłukane w czystej gorącej wodzie z kranu bezpośrednio po użyciu, a następnie ponownie wypłukane i osuszone przed użyciem.

2. Korki probówek muszą być dokładnie wypłukane w gorącej wodzie z kranu tuż po użyciu, następnie zanurzone we wrzącej wodzie na 2 minuty.

3. Roztwór substratu buforowego (pkt 4.2) powinien być stabilny przez co najmniej 1 miesiąc, jeśli będzie przechowywany w lodówce w temperaturze 4 °C lub mniej. Wszelka niestabilność jest sygnalizowana przez powstanie żółtego zabarwienia. Kiedy próba jest zawsze odczytywana wobec kontrolnej próbki w stanie wrzenia, zawierającej ten sam roztwór substratu buforowego, zaleca się aby nie używać roztworu jeśli daje on odczyt barwny powyżej 10 µg przy odczycie w 25 mm naczynku.

4. Użyć oddzielnej pipety do każdej próbki i unikać zanieczyszczenia pipety śliną.

5. Próba nie może być wystawiona na bezpośrednie oddziaływanie promieni słonecznych w żadnych okolicznościach.

6.1. **Przygotowanie próbki**

Rozpuścić 10 g proszku w 90 ml wody. Temperatura rozpuszczania proszku nie może przekroczyć 35 °C.

6.2. **Oznaczanie**

6.2.1. Odmierzyć pipetą 15 ml substratu buforowego (pkt 4.2) do czystej, suchej próbówki, następnie 2 ml rekonstytuowanej próbki (pkt 6.1), która ma być badana. Zamknąć korkiem probówkę, mieszać przez odwracanie i umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C (pkt 5.2).

6.2.2. Jednocześnie umieścić w łaźni wodnej probówkę kontrolną zawierającą 15 ml substratu buforowego i 2 ml ogrzanej do wrzenia rekonstytuowanej próbki podobnie jak w próbie.

6.2.3. Po 2 godzinach wyjąć obie probówki z łaźni wodnej, dodać 0,5 ml środka strącającego, siarczanu cynkowego (pkt 4.3.1), zamknąć korkiem, wytrząsać energicznie i odstawić w spokoju na 3 minuty. Dodać 0,5 ml środka strącającego (pkt 4.3.2), żelazocyjanku potasu (II), wymieszać starannie i przefiltrować przez karbowany sączek z bibuły filtracyjnej (pkt 5.4) i zebrać klarowny filtrat w czystej probówce.

6.2.4. Przenieść filtrat do 25-milimetrowego naczynka i porównać z filtratem próbki kontrolnej w stanie wrzenia w komparatorze, stosując specjalny krążek (pkt 5.3).

7. WYRAŻANIE WYNIKÓW

7.1. **Obliczanie**

Bezpośredni odczyt, uzyskany wg pkt 6.2.4 jest zanotowany jako ilość lg p–nitrofenolu w 1 ml próbki lub na 1 ml rekonstytuowanej próbki.

7.2. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych równocześnie lub w krótkim odstępie czasu, z tą samą próbką, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekroczyć 2 µg p–nitrofenolu, uwolnionego przez 1 ml rekonstytuowanego mleka.