31979L1067

24.12.1979 URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI L 327/29

PRVA DIREKTIVA KOMISIJE

z dne 13. novembra 1979

o določitvi analitskih metod Skupnosti za preskušanje nekaterih vrst delno ali v celoti dehidriranega konzerviranega mleka za prehrano ljudi

(79/1067/EEC)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 76/118/EEC z dne 18. decembra 1975 o približevanju zakonodaj držav članic, ki se nanašajo na nekatere vrste delno ali v celoti dehidriranega konzerviranega mleka za prehrano ljudi [1] in zlasti člena 11 Direktive,

ker je treba v skladu s členom 11 Direktive 76/118/EEC sestavo nekaterih vrst delno ali v celoti dehidriranega konzerviranega mleka za prehrano ljudi preveriti z analitskimi metodami Skupnosti;

ker je zaželeno, da se sprejme začetno serijo postopkov, v zvezi s katerimi so že bile opravljene študije;

ker so ukrepi, ki jih določa ta direktiva, v skladu z mnenjem Stalnega odbora o živilih,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice ustrezno ukrepajo, da zagotovijo, da se analize, potrebne za preverjanje kriterijev, navedenih v Prilogi I, izvedejo v skladu s postopki, opisanimi v Prilogi II.

Člen 2

Kadar so določene alternativne metode za enkratno določanje, se sme vzorec analizirati po eni ali drugi metodi. Poročilo o preskusu, navedeno v Prilogi II, mora navesti metodo, ki je bila uporabljena.

Člen 3

Države članice uveljavijo zakone, predpise in upravne določbe, ki so potrebne za skladnost s to direktivo v 18 mesecih po uradnem obvestilu. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 4

Ta direktiva je namenjena državam članicam.

V Bruslju, 13. novembra 1979

Za Komisijo

Etienne DAVIGNON

Član Komisije

[1] UL L 24, 30.1.1976, str. 49.

PRILOGA I

OBSEG PRVIH ANALITSKIH METOD SKUPNOSTI ZA DIREKTIVO O NEKATERIH VRSTAH DELNO ALI V CELOTI DEHIDRIRANEGA KONZERVIRANEGA MLEKA

I. **Splošne določbe**

II. **Določanje suhe snovi v:**

— nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe (z uporabo metode 1, Priloga II).

— nesladkanem kondenziranem mleku (z uporabo metode 1, Priloga II),

— nesladkanem kondenziranem delno posnetem mleku (z uporabo metode 1, Priloga II),

— nesladkanem kondenzirane posnetem mleku (z uporabo metode 1, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem mleku (z uporabo metode 1, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku (z uporabo metode 1, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem posnetem mleku (z uporabo metode 1, Priloga II).

III. **Določanje vlage v:**

— sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe (z uporabo metode 2, Priloga II),

— sušenem polnem mleku ali polnem mleku v prahu (z uporabo metode 2, Priloga II),

— sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 2, Priloga II),

— sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 2, Priloga II).

IV. **Določanje maščobe v:**

— nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe (z uporabo metode 3, Priloga II),

— nesladkanem kondenziranem mleku (z uporabo metode 3, Priloga II),

— nesladkanem kondenziranem delno posnetem mleku (z uporabo metode 3, Priloga II),

— nesladkanem kondenziranem posnetem mleku (z uporabo metode 3, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem mleku (z uporabo metode 3, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku (z uporabo metode 3, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem posnetem mleku (z uporabo metode 3, Priloga II),

— sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe (z uporabo metode 4, Priloga II),

— sušenem polnem mleku ali polnem mleku v prahu (z uporabo metode 4, Priloga II),

— sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 4, Priloga II),

— sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 4, Priloga II)

V. **Določanje saharoze v:**

— sladkanem kondenziranem mleku (z uporabo metode 5, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku (z uporabo metode 5, Priloga II),

— sladkanem kondenziranem posnetem mleku (z uporabo metode 5, Priloga II).

VI. **Določanje mlečne kisline in laktatov v:**

— sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe (z uporabo metode 6, Priloga II),

— sušenem polnem mleku ali polnem mleku v prahu (z uporabo metode 6, Priloga II),

— sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 6, Priloga II),

— sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 6, Priloga II).

VII. **Določanje aktivnosti fosfataze v:**

— sušenem mleku v visoko vsebnostjo maščobe ali mlečnem prahu z visoko vsebnostjo maščobe (z uporabo metode 7 ali 8, Priloga II),

— sušenem polnem mleku ali polnem mleku v prahu (z uporabo metode 7 ali 8, Priloga II),

— sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 7 ali 8, Priloga II),

— sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu (z uporabo metode 7 ali 8, Priloga II).

PRILOGA II

ANALITSKI POSTOPKI, KI SE NANAŠAJO NA SESTAVO NEKATERIH VRST DEHIDRIRANIH ALI DELNO DEHIDRIRANIH KONZERVIRANIH MLEČNIH PROIZVODOV NAMENJENIH ZA PREHRANO LJUDI

SPLOŠNE DOLOČBE

1. PRIPRAVA VZORCA ZA KEMIJSKO ANALIZO

1.1 **Nesladkano kondenzirano mleko z visoko vsebnostjo maščobe**

Nesladkano kondenzirano mleko

Nesladkano kondenzirano delno posneto mleko

Nesladkano kondenzirano posneto mleko

Stresemo in obrnemo zaprto konzervo. Odpremo konzervo in počasi zlijemo mleko v drugo posodo, ki se jo da nepredušno zapreti, ter mešamo s.ponavljajočim prelivanjem Zagotovimo, da je vsa preostala maščoba in mleko, ki se trdno drži sten in koncev konzerve premešana z vzorcem. Zapremo posodo. Če vsebina ni homogena, segrejemo posodo v vodni kopeli pri 40 °C. Močno premešamo vsakih 15 minut. Po dveh urah odstranimo posodo iz vodne kopeli in jo ohladimo na sobno temperaturo. Odstranimo pokrov in temeljito premešamo vsebino posode z žlico ali lopatico (če se je maščoba ločila, se vzorec ne testira). Shranimo na hladnem.

1.2 **Sladkano kondenzirano mleko**

Sladkano kondenzirano delno posneto mleko

Sladkano kondenzirano posneto mleko

Konzerve: Segrevamo zaprto konzervo v vodni kopeli pri 30 do 40 °C približno 30 minut. Odpremo konzervo in temeljito premešamo vsebino z lopatico ali žlico z gibi navzgor, navzdol in krožnimi gibi, da dobimo dobro mešanico zgornjih in spodnjih plasti z vso vsebino. Zagotovimo, da je preostalo mleko, ki se drži sten in koncev konzerve vključeno v vzorec. Kolikor je mogoče, prelijemo vsebino v drugo posodo z nepredušnim pokrovom. Zapremo posodo in jo shranimo na hladno.

Tube: Prerežemo na vrhu in prelijemo vsebino v posodo z nepredušnim pokrovom. Nato prerežemo tube po dolžini. Postrgamo ves material, ki se drži notranjosti in ga previdno zmešamo s preostalo vsebino. Posodo shranimo na hladno.

1.3 **Sušeno mleko z visoko vsebnostjo maščobe ali mleko v prahu z visoko vsebnostjo maščobe**

Sušeno polno mleko ali polno mleko v prahu

Sušeno delno posneto mleko ali delno posneto mleko v prahu

Sušeno posneto mleko ali posneto mleko v prahu

Prenesemo mleko v prahu v čisto, suho posodo (z nepredušnim pokrovom), ki ima dvakratno prostornino mleka v prahu. Takoj zapremo posodo in temeljito premešamo mleko v prahu s ponavljajočim tresenjem in obračanjem posode. Med pripravo vzorca se je treba kolikor mogoče izogibati izpostavljanju mleka v prahu atmosferi, da zmanjšamo absorpcijo vlage.

2. REAGENTI

2.1 **Voda**

2.1.1 Kadar se omenja uporaba vode za raztapljanje, redčenje ali spiranje, uporabljamo destilirano vodo ali demineralizirano voda vsaj enakovredne čistosti.

2.1.2 Kadar se omenja „raztapljanje“, „raztopina“ ali „redčenje“ brez dodatnih navedb, to pomeni „raztapljanje v vodi“, „raztopina v vodi“ in „redčenje v vodi“.

2.2 **Kemikalije**

Vse uporabljene kemikalije imajo priznano kvaliteto analitskega reagenta, razen če ni drugače določeno.

3. OPREMA

3.1 **Seznami opreme**

Seznami opreme vsebujejo samo predmete za posebno uporabo in predmete s posebno specifikacijo.

3.2 **Analitska tehtnica**

Analitska tehtnica pomeni tehtnico s točnostjo 0,1 mg.

4. PODAJANJE REZULTATOV

4.1 **Izračun odstotkov**

Razen če ni drugače določeno, so rezultati izračunani kot masni odstotki vzorca, kot ga prejme laboratorij.

4.2 **Število signifikantnih številk**

Rezultat ne vsebuje več signifikantnih številk, kot je to ustrezno glede na točnost uporabljene analitske metode.

5. POROČILO O PRESKUŠANJU

Poročilo o preskušanju opredeli uporabljeni analitski postopek kot tudi dobljene rezultate. Poleg mora vsebovati vse podrobnosti postopka, ki niso opredeljene v analitski metodi ali so poljubne, kot tudi okoliščine, ki bi lahko vplivale na dobljene rezultate.

Poročilo o preskušanju mora podati vse potrebne informacije za popolno identifikacijo vzorca.

METODA 1: DOLOČANJE VSEBNOSTI SUHE SNOVI

(sušilnik 99 °C)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek določa vsebnost suhe snovi v:

— nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe,

— nesladkanem kondenziranem mleku,

— nesladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,

— nesladkanem kondenziranem posnetem mleku,

— sladkanem kondenziranem mleku,

— sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,

— sladkanem kondenziranem posnetem mleku.

2. DEFINICIJA

Vsebnost suhe snovi v kondenziranem mleku: vsebnost suhe snovi kot je določena z določeno metodo.

3. PRINCIP METODE

Znano količino vzorca razredčimo z vodo, premešamo s peskom in posušimo na temperaturi 99 °C ± 1 °C. Masa po sušenju je masa suhe snovi in se izračuna kot masni odstotki vzorca.

4. REAGENTI

Kremenčev pesek ali morski pesek, obdelan z klorovodikovo kislino (velikost zrn: 0,18 do 0,5 mm, ki se preseje skozi sito 500 mikronov in ki ostane na situ 180 mikronov). Ustreza naslednjemu kontrolnemu testu:

Dve uri segrevamo približno 25 g peska v sušilniku (5.3), kot je opisano v 6.1 do 6.3. Dodamo 5 ml vode, ponovno segrevamo v sušilniku dve uri, ohladimo in ponovno stehtamo. Razlika med dvema masama ne sme preseči 0,5 mg.

Če je potrebno, obdelamo pesek s 25 % raztopino klorovodikove kisline tri dni, ter občasno mešamo. Operemo z vodo, da ni več kisle reakcije ali dokler ni voda brez klorida. Posušimo pri 160 °C in ponovno preizkusimo, kot je navedeno zgoraj.

5. OPREMA

5.1 Analitska tehtnica.

5.2 Kovinske posode, po možnosti iz niklja, aluminija ali nerjavečega jekla. Posode morajo imeti pokrove, ki se dobro prilegajo in se z lahkoto odstranijo. Primerne dimenzije pokrovov imajo premer od 60 do 80 mm in globino približno 25 mm.

5.3 Sušilnik z atmosferskim tlakom, z dobrim prezračevanjem,, s termostatsko regulacijo temperature na 99°C +- 1 °C. Temperatura mora biti enakomerna po celem sušilniku.

5.4 Eksikator, ki vsebuje sveže aktiviran silikagel z indikatorjem za vsebnost vode ali enakovredno sušilo.

5.5 Steklene palice, sploščene na enem delu, z dolžino, ki se prilagaja notranjosti kovinskih posodic (5.2).

5.6 Vodna kopel, pri temperaturi vrelišča vode.

6. POSTOPEK

6.1 V posodo (5.2) damo približno 25 g peska (4) in kratko stekleno palico (5.5).

6.2 Ne da bi pokrili posodo in vsebino s pokrovom, postavimo posodo, vsebino in pokrov v sušilnik(5.3) in segrevamo dve uri.

6.3 Pokrijemo s pokrovom in prenesemo posodo v eksikator (5.4). Pustimo, da se shladi na sobno temperaturo in natančno stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_0).

6.4 Posodo nagnemo, da pesek zdrsne na eno stran posode. Na izpraznjeni prostor damo približno 1,5 g vzorca sladkanega zgoščenega mleka ali 3,0 g nesladkanega kondenziranega mleka. Pokrijemo s pokrovom in natančno stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_1).

6.5 Odstranimo pokrov, dodamo 5 ml vode in s stekleno palico premešamo tekočine ter nato pesek in tekoči del. Palico pustimo v mešanici.

6.6 Postavimo posodo v vrelo vodno kopel (5.6), dokler voda ne izpari. To ponavadi traja 20 minut. S palico občasno premešamo mešanico, da je masa dobro prezračena in da se ne sprime, ko je suha. Palico položimo v posodo.

6.7 Posodo in pokrov postavimo v sušilnik za eno uro in pol.

6.8 Ponovno pokrijemo posodo, posodo prenesemo v eksikator (5.4), in pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo in nato stehtamo s točnostjo 0,1 mg.

6.9 Ponovno postavimo posodo in pokrov v sušilnik, odkrijemo posodo in jo odkrito segrevamo s pokrovko še za eno uro.

6.10 Ponovimo postopek 6.8.

6.11 Ponovimo opisane postopke 6.9 in 6.10, dokler ni razlika v masi dveh zaporednih tehtanj manj kot 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do porasta mase, uporabimo najnižjo maso, dobljeno v izračunu (7.1). Končna zabeležena masa naj bo M_2 g.

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Metoda izračuna**

Vsebnost suhe snovi, izračunane kot masni odstotek vzorca, se izraža kot:

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

kjer je:

M_0 = masa v g, posode, pokrova in peska po postopku 6.3;

M_1 = masa v g, posode, pokrova, peska in vzorca po postopku 6.4;

M_2 = masa v g, posode, pokrova, peska in posušenega vzorca po postopku 6.11.

7.2 **Ponovljivost**

Razlika med rezultati dveh določanj, izvedenih istočasno ali v hitrem zaporedju na istem vzorcu, z istim analitikom pod istimi pogoji, ne presega 0,2 g suhe snovi na 100 g proizvoda.

8. IZRAČUN SKUPNE SUHE SNOVI MLEKA IN SUHE SNOVI MLEKA BREZ MAŠČOBE

8.1 **Skupna vsebnost suhe snovi sladkanega kondenziranega mleka se določi z**:

Skupna suha snov (dobljena z metodo 1, Priloga II) - saharoze (dobljena z metodo 5, Priloga II).

8.2 **Vsebnost suhe snovi sladkanega kondenziranrga mleka brez maščobe se določi z**:

Skupna suha snov (dobljena z metodo 1, Priloga II) - (vsebnost saharoze dobljena z metodo 5, Priloga II) in vsebnost maščobe (dobljena z metodo 3, Priloga II).

8.3 **Vsebnost suhe snovi nesladkanega kondenziranega mleka brez maščobe se določi z**:

Skupna suha snov (dobljena z metodo 1, Priloga II) - vsebnost maščobe (dobljena z metodo 3, Priloga II).

METODA 2: DOLOČANJE VLAGE

(sušilnik 102 °C)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda določa izgubo mase po sušenju:

— sušenega mleka z visoko vsebnostjo maščobe ali mleka v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,

— sušenega polnega mleka ali polnega mleka v prahu,

— sušenega delno posnetega mleka ali delno posnetega mleka v prahu,

— sušenega posnetega mleka ali posnetega mleka v prahu.

2. DEFINICIJA

Vsebnost vlage: izguba mase po sušenju, kot se določi z določeno metodo.

3. PRINCIP

Preostala masa preiskovanega dela se določi po sušenju pri atmosferskem tlaku v sušilniku pri 102 °C ± 1°C to konstantne mase. Izguba mase se izračuna kot masni odstotek vzorca.

4. OPREMA

4.1 Analitska tehtnica.

4.2 Posode, po možnosti iz niklja, aluminija, nerjavečega jekla ali stekla. Posode morajo imeti pokrove, ki se dobro prilegajo, vendar se z lahkoto odstranijo. Primerne dimenzije so: premer 60 do 80 mm in globina približno 25 mm.

4.3 Sušilnik z atmosferskim tlakom, z dobrim prezračevanjem, s termostatsko regulacijo temperature (pri 120 °C ± 1°C). Temperatura mora biti enakomerna po celem sušilniku.

4.4 Eksikator, ki vsebuje sveže aktiviran silikagel z indikatorjem za vsebnost vode ali ekvivalentno sušilo.

5. POSTOPEK

5.1 Odstranimo pokrov s posode (4.2) in postavimo posodo skupaj s pokrovom v sušilnik (4.3) ter segrevamo približno eno uro.

5.2 Postavimo pokrov na posodo in prenesemo pokrito posodo v eksikator (4.4). Pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo in stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_0).

5.3 V posodo damo 2 g posušenega vzorca mleka, posodo pokrijemo s pokrovom in pokrito posodo čim hitreje stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_1).

5.4 Odkrijemo posodo in jo postavimo skupaj s pokrovom v sušilnik za dve uri.

5.5 Ponovno pokrijemo posodo, ter pokrito posodo prenesemo v eksikator, pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo in čim hitreje stehtamo s točnostjo 0,1 mg.

5.6 Odkrijemo posodo in jo segrevamo odkrito skupaj s pokrovom eno uro v sušilniku.

5.7 Ponovimo postopek 5.5.

5.8 Ponovimo postopka 5.6 in 5.5, dokler zmanjšanje mase med zaporednimi tehtanji ne preseže 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do povečanja mase, uporabimo najbližjo maso, ki smo jo dobili v izračunu (6.1). Zadnja zabeležena masa naj bo M_2 g.

6. PODAJANJE REZULTATOV

6.1 Metoda izračuna

Izračunaj izgubo mase po sušenju vzorca, izraženo kot utežne odstotke po naslednji formuli:

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

kjer je:

M_0 = masa, v gramih, posode in njenega pokrova po postopku 5.2;

M_1 = masa, v gramih, posode, njenega pokrova in vzorca po postopku 5.3;

M_2 = masa, v gramih, posode, njenega pokrova in končnega vzorca po postopku 5.5.

6.2 Ponovljivost

Razlika v rezultatih med dvema postopkoma določanja izvedenima istočasno ali v hitrem zaporedju na istem vzorcu, z istim analitikom, pod istimi pogoji, ne presega 0,1 g vlage na 100 g proizvoda.

METODA 3: DOLOČANJE VSEBNOSTI MAŠČOBE V KONDENZIRANEM MLEKU (METODA RÖSE-GOTTLIEB)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda določa vsebnost maščobe v:

— nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe,

— nesladkanem kondenziranem mleku,

— nesladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,

— nesladkanem kondenziranem posnetem mleku,

— sladkanem kondenziranem mleku,

— sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,

— sladkanem kondenziranem posnetem mleku.

2. DEFINICIJA

Vsebnost maščobe kondenziranega mleka: vsebnost maščobe kot je določena z določeno metodo.

3. PRINCIP

Vsebnost maščobe določamo z ekstrakcijo maščobe iz amonialkalne alkoholne raztopine vzorca z dietiletrom in petroletrom, ki ji sledi odhlapevanje topil in tehtanje preostanka in izračun utežnega odstotka vzorca, skladno z Röse-Gottliebovim postopkom.

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo ustrezati zahtevam, določenim v s slepim preizkusom (6.1). Če je potrebno, lahko reagente ponovno destiliramo v prisotnosti približno 1 g maslene maščobe za 100 ml topila.

4.1 Raztopina amoniaka, približno 25 % (m/m) NH_3 (gostota pri 20 °C približno 0.91 g/ml) ali močnejša raztopina znane koncentracije.

4.2 Etanol, 96 ± 2 % (v/v) ali, če ta ni na razpolago, etanol denaturiran z metanolom, etil metil ketonom ali petroletrom.

4.3 Dietileter, brez peroksida.

Opomba 1:
Za testiranje na prisotnost peroksidov dodamo k 10 ml etra v majhen valj s steklenim zamaškom, ki smo ga prej sprali z etrom 1 ml sveže pripravljene 10 % raztopine kalijevega jodida,. Stresemo in pustimo stati eno minuto. V nobeni od obeh faz se ne sme pojaviti rumena barva.

Opomba 2:
Dietileter lahko ohranjamo brez peroksidov, tako da dodamo mokro cinkovo folijo, ki jo popolnoma pomočimo za eno minuto v razredčeno kislo raztopino bakrovega sulfata ter nato speremo z vodo. Na liter uporabimo približno 8 000 mm^2 cinkove folije; razrežemo jo na trakove, ki so dovolj dolgi, da lahko sežejo vsaj do polovice posode.

4.4 Bencin (petroleter) z območjem vrelišča med 30 in 60 °C.

4.5 Mešano topilo, pripravljeno tik pred uporabo, tako da mešamo enaka volumna dietiletra (4.3) in bencina (4.4) (kadar je indicirana uporaba mešanega topila, se ta lahko nadomesti z dietiletrom ali samo z bencinom)

5. OPREMA

5.1 Analitska tehtnica.

5.2 Primerne epruvete ali bučke za ekstrahiranje z brušenimi zamaški ali drugimi zaporami, odpornimi na uporabljena topila.

5.3 Bučke, s tankimi stenami in ravnim dnom, s kapaciteto 150 do 250 ml

5.4 Atmosferski tlak, sušilnik, z dobrim prezračevanjem, s termostatsko regulacijo (prilagojena za obratovanje pri 102 °C ± 1 °C.

5.5 Vrelni kamenčki, brez maščobe, ki med uporabo niso porozni in niso drobljivi, npr. steklene kroglice ali delci silikonskega karbida (uporaba tega materiala je poljubna, glej klavzulo 6.2.1).

5.6 Sifon (odvodna cev), ki se prilega epruvetam za ekstrahiranje

5.7 Centrifuga (poljubna)

6. POSTOPEK

6.1 **Slepi Preskus**

Istočasno ko določamo vsebnost maščobe v vzorcu, izvedemo tudi določanje v slepem vzorcu v 10 ml vode. Pri tem uporabimo isto aparaturo za ekstrahiranje, iste reagente v istih količinah in isti postopek, kot je opisan v nadaljevanju, razen klavzule 6.2.2 Če slepi vzorec presega 0,5 mg, je treba preveriti reagente ter nečisti reagent ali reagente očistiti ali zamenjati.

6.2 **Določanje**

6.2.1 Posušimo bučo (5.3) (skupaj z, če je potrebno, nekaj vrelnimi kamenčki (5.5), da bi pospešili rahlo vrenje med odstranitvijo topil, ki sledi) v sušilniku (5.4) od pol do ene ure. Pustimo, da se buča ohladi na temperaturo tehtalnega prostora ter točno stehtamo ohlajeno bučo s točnostjo 0,1 mg.

6.2.2 Premešamo pripravljeni vzorec in takoj odtehtamo, s točnostjo 1 mg, 2 do 2,5 g sladkanega vzorca ali 4 do 5 g nesladkanega vzorca naravnost v, ali z diferenčnim tehtanjem, aparaturo za ekstrahiranje (5.2) Dodamo vodo 10,5 ml in rahlo stresamo ob rahlem segrevanju (40 do 50 °C) dokler ni proizvod popolnoma razpršen. Vzorec je treba popolnoma razpršiti, sicer je treba določanje ponoviti.

6.2.3 Dodamo 1,5 ml amoniaka (25 %) (4.1) ali odgovarjajočega volumna močnejše raztopine in dobro premešamo.

6.2.4 Dodamo 10 ml etanola (4.2) in rahlo, vendar temeljito premešamo tekočine v nezaprti aparaturi.

6.2.5 Dodamo 25 ml dietiletra (4.3). Ohladimo pod tekočo vodo. Aparaturo zapremo in temeljito stresamo in obračamo eno minuto.

6.2.6 Previdno odstranimo zamašek in dodamo 25 ml petroletra (4.4), tako da uporabimo nekaj mililitrov, da speremo zamašek in notranjost vratu aparature, tako da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Zapremo, tako da ponovno zamašimo ter stresamo in obračamo 30 sekund. Ne smemo stresati preveč temeljito, če se ne uporabi centrifugiranje v 6.2.7.

6.2.7 Pustimo stati aparaturo, dokler se gornja faza ne zbistri in jasno loči od spodnje vodne faze. Alternativno izvedemo separacijo z uporabo primerne centrifuge (5.7).

Opomba:

Kadar se uporabi centrifuga, ki je ne poganja trifazni motor, lahko pride do iskrenja in je treba paziti, da ne pride do eksplozije ali ognja zaradi eterskih hlapov, ki na primer, prihajajo iz počene epruvete.

6.2.8 Odstranimo zamašek, speremo zamašek in notranjost vratu aparature z nekaj mililitri mešanega topila (4.5) in dovolimo, da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Previdno prenesemo kolikor je mogoče gornje faze, tako da odlijemo ali uporabimo sifon z (5.6) v pripravljeno bučo (6.2.1).

Opomba:

Če prenosa ne naredimo, tako da uporabimo sifon, je morebiti treba dodati malo vode, da bi povečali površino med dvema fazama, ter tako lažje oddekantirali.

6.2.9 Speremo zunanjost in notranjost vratu aparature ali vrh in spodnji del sifona z nekaj mililitri mešanega topila (4.5). Raztopina po izpiranju naj teče iz zunanjosti aparature v bučo in raztopina po izpiranju iz notranjosti vratu in iz sifona v aparaturo za ekstrahiranje.

6.2.10 Opravimo drugo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek 6.2.5 do vključno 6.2.9, vendar tako da uporabimo samo 15 ml dietiletra in 15 ml petroletra.

6.2.11 Opravimo tretjo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek 6.2.10 vendar brez zadnjega izpiranja (6.2.9).

Opomba:
Tretja ekstrakcija ni obvezna, kadar analiziramo vzorce posnetega nesladkanega kondeziranega mleka in posnetega sladkanega kondenziranega mleka.

6.2.12 Previdno izparevamo ali oddestiliramo čim več topila (vključno etanola). Če ima buča majhno kapaciteto, bo treba odstraniti nekaj topila, kot je navedeno zgoraj, po vsaki ekstrakciji.

6.2.13 Kadar ni znatnega vonja po topilu, položimo bučo na postrani v sušilnik in segrevamo eno uro.

6.2.14 Odstranimo bučo iz sušilnika, jo ohladimo do temperature tehtalnega prostora in točno stehtamo s točnostjo 0, 1 mg.

6.2.15 Ponovimo 6.2.13 in 6.2.14, medtem ko segrevamo 30 do 60 minut, dokler razlika v masi med dvema zaporednima tehtanjema ni manj kot 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do povečanja mase, uporabimo najbližjo maso, dobljeno v izračunu (7.1). Zadnja zabeležena masa naj bo M_1 g.

6.2.16 Dodamo 15 do 25 ml petroletra, da potrdimo, da je ekstrahirana snov popolnoma topna. Rahlo segrevamo in premešamo topilo, dokler se vsa maščoba ne raztopi.

6.2.16.1 Če je ekstrahirana snov popolnoma topna v petroletru, je masa maščobe razlika med masami, določenimi v 6.2.1 in 6.2.15.

6.2.16.2 če je prisotna katera koli netopna snov, ali če smo v dvomih, popolnoma ekstrahiramo maščobi iz buč, tako da ponovno izpiramo s toplim petroletrom, ter pustimo, da se neraztopljeni material posede pred vsakim odlitjem. Zunanjost vratu buče izperemo trikrat. V sušilniku eno uro segrevamo bučo, ki jo položimo na stran, ohladimo na temperaturo tehtalnega prostora kot prej (6.2.1) in stehtamo s točnostjo 0,1 mg. Masa maščobe je razlika med maso, dobljeno v 6.2.15 in to končno maso.

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Izračun**

Masa, v gramih, ekstrahirane maščobe je:

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

in vsebnost maščobe vzorca, izražena v odstotkih, je:

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

kjer je:

M_1 = masa, v gramih, buče M z maščobo po fazi 6.2.15;

M_2 = masa, v gramih, buče M po fazi 6.2.1 ali v primeru neraztopljenega materiala ali dvoma, po fazi 6.2.16.2;

B_1 = masa, v gramih buče B slepega vzorca po fazi 6.2.15;

B_2 = masa, v gramih, buče B po fazi 6.2.1 ali v primeru neraztopljenega materiala ali dvoma, po fazi 6.2.16.2;

S = masa, v gramih uporabljenega vzorca

7.2 **Ponovljivost**

Razlika med rezultati dveh določanj, ki jih istočasno ali v hitrem zaporedju na istem vzorcu, izvede isti analitik, pod istimi pogoji, ne presega 0,05 g maščobe na 100 g proizvoda.

METODA 4: DOLOČANJE VSEBNOSTI MAŠČOBE V SUŠENEM MLEKU (RÖSE-GOTTLIEBOVA METODA)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda določa vsebnost maščobe v:

— sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,

— sušenem polnem mleku ali polnem mleku v prahu,

— sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu,

— sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu.

2. DEFINICIJA

Vsebnost maščobe sušenega mleka: vsebnost maščobe, kot je določena z določeno metodo.

3. PRINCIP METODE

Vsebnost maščobe se določa z ekstrakcijo maščobe iz amonialkalne raztopine vzorca z dietiletrom in petroletrom, ki ji sledi izparevanje topil in tehtanje preostanka in izračun masnega odstotka vzorca, v skladu z metodo Röse-Gottlieb.

4. REAGENTI

Vsi reagenti ustrezajo zahtevam, določenim v slepem vzorcu (6.1). Če je potrebno, se reagente lahko ponovno destilira v prisotnosti približno 1g mlečne maščobe na 100 ml topila.

4.1 Raztopina amoniaka, približno 25 % (m/m) NH_3 (gostota pri 20 °C je približno 0,91 g/ml), ali močnejša raztopina znane koncentracije.

4.2 Etanol, 96 +- 2 % (v/v) ali, če to ni dosegljivo, etanol denaturiran z metanolom, etil metil keton ali petroleter.

4.3 Dietileter, brez peroksida

Opomba 1:
Za testiranje peroksidov dodamo 1 ml sveže pripravljene 10 % raztopine kalijevega jodida k 10 ml etra v majhnem cilindru s steklenim zamaškom, ki smo ga prej sprali z etrom. Stresemo in pustimo stati eno minuto. V nobeni fazi se ne sme pojaviti rumena barva.

Opomba 2:
Dietileter lahko ohranjamo prostega peroksidov, tako da dodamo mokro cinkovo folijo, ki jo popolnoma namočimo eno minuto v razredčeno kislo raztopino bakrovega sulfata ter nato speremo z vodo. Na liter uporabimo približno 8 000 mm^2 cinkove folije; razrežemo jo na trakove, ki so dovolj dolgi, da lahko sežejo vsaj do polovice posode.

4.4 Bencin (petroleter) z območjem vrelišča med 30 in 60 °C.

4.5 Mešano topilo, pripravljeno tik pred uporabo, tako da mešamo enaka volumna dietiletra (4.3) in petroletra (4.4) (kadar je indicirana uporaba mešanega topila, se ta lahko nadomesti z dietiletrom ali samo s petroletrom)

5. OPREMA

5.1 Analitska tehtnica.

5.2 Primerne epruvete ali buče za ekstrahiranje z brušenimi zamaški ali drugimi zaporami, odpornimi na uporabljena topila.

5.3 Buče, s tankimi stenami in ravnim dnom, s kapaciteto 150 do 250 ml

5.4 Atmosferski tlak, sušilnik, z dobrim prezračevanjem, s termostatsko regulacijo (prilagojena za obratovanje pri 102 °C ± 1 °C.

5.5 Vrelni kamenčki, brez maščobe, ki med uporabo niso porozni in niso drobljivi, npr. steklene kroglice ali delci silikonskega karbida (uporaba tega materiala je poljubna, glej klavzulo 6.2.1).

5.6 Vodna kopel, pri 60 do 70 °C.

5.7 Sifon (odvodna cev), ki se prilega epruvetam za ekstrahiranje.

5.8 Centrifuga (poljubna).

6. POSTOPEK

6.1 **Slepi preskus**

Istočasno, ko določamo vsebnost maščob v vzorcu, izvedemo tudi določanje v slepem vzorcu v 10 ml vode. Pri tem uporabimo isto aparaturo za ekstrahiranje, iste reagente v istih količinah in isti postopek, kot je opisan v nadaljevanju, razen klavzule 6.2.2 Če slepi vzorec presega 0,5 mg, je treba preveriti reagente ter nečisti reagent ali reagente očistiti ali zamenjati.

6.2 **Določanje**

6.2.1 Posušimo bučo (5.3) (skupaj z, če je potrebno, nekaj vrelnimi kamenčki (5.5), da bi pospešili rahlo vrenje med odstranjevanjem topil, ki sledi) v sušilniku (5.4) od pol do ene ure. Pustimo, da se buča ohladi na temperaturo tehtalnega prostora, stehtamo ohlajeno bučo s točnostjo 0,1 mg.

6.2.2 Premešamo pripravljeni vzorec in takoj stehtamo s točnostjo 1 mg, približno 1 g polnega mleka v prahu ali približno 1,5 g delno posnetega ali posnetega mleka v prahu naravnost v, ali z diferenčnim tehtanjem, aparaturo za ekstrahiranje (5.2) Dodamo 10 ml vode in rahlo stresamo, dokler ni mleko v prahu popolnoma razpršeno (za nekatere vzorce je potrebno segrevanje).

6.2.3 Dodamo 1,5 ml amoniaka (25 %) (4.1) ali odgovarjajoči volumen močnejše raztopine in segrevamo na vodni kopeli (5.6) 15 minut pri 60 do 70 şC, ter občasno mešamo. Ohladimo, na primer pod tekočo vodo.

6.2.4 Dodamo 10 ml etanola (4.2) in rahlo, vendar temeljito premešamo tekočine v nezaprti aparaturi.

6.2.5 Dodamo 25 ml dietiletra (4.3). Ohladimo pod tekočo vodo. Aparaturo zapremo in temeljito stresamo in obračamo eno minuto.

6.2.6 Previdno odstranimo zamašek in dodamo 25 ml petroletra (4.4), tako da s prvimi nekaj mililitri speremo zamašek in notranjost vratu aparature, tako da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Zapremo, tako da ponovno zamašimo ter stresamo in obračamo 30 sekund. Ne smemo stresati preveč temeljito, če se ne uporabi centrifugiranje v 6.2.7.

6.2.7 Pustimo stati aparaturo, dokler se gornja faza ne zbistri in jasno loči od spodnje vodne faze. Alternativno izvedemo separacijo z uporabo primerne centrifuge (5.8).

Opomba:

Kadar se uporabi centrifuga, ki je ne poganja trifazni motor, lahko pride do iskrenja in je treba paziti, da ne pride do eksplozije ali ognja zaradi eterskih hlapov, ki na primer, prihajajo iz počene epruvete.

6.2.8 Odstranimo zamašek, speremo zamašek in notranjost vratu aparature z nekaj mililitri mešanega topila (4.5) in dovolimo, da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Previdno prenesemo kolikor je mogoče gornje faze, tako da odlijemo ali uporabimo sifon (5.7) v pripravljeno bučo (6.2.1).

Opomba:

Če prenosa ne naredimo, tako da uporabimo sifon, je morebiti potrebno dodati malo vode, da bi povečali površino med dvema fazama, ter tako lažje odlili.

6.2.9 Speremo zunanjost in notranjost vratu aparature ali vrh in spodnji del sifona z nekaj mililitri mešanega topila. Raztopina po izpiranju naj teče iz zunanjosti aparature v bučo in raztopina po izpiranju iz notranjosti vratu in iz sifona v aparaturo za ekstrahiranje.

6.2.10 Opravimo drugo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek 6.2.5 do vključno 6.2.9, vendar tako da uporabimo samo 15 ml dietiletra in 15 ml petroletra.

6.2.11 Opravimo tretjo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek 6.2.10 vendar brez zadnjega izpiranja (6.2.9).

Opomba:
Tretja ekstrakcija ni obvezna, kadar analiziramo vzorce posušenega posnetega mleka v prahu.

6.2.12 Previdno izparevamo ali oddestiliramo čim več topila (vključno etanola). Če ima buča majhno kapaciteto, bo treba odstraniti nekaj topila, kot je navedeno zgoraj, po vsaki ekstrakciji.

6.2.13 Kadar ni občutnega vonja po topilu, položimo bučo postrani v sušilnik in segrevamo eno uro.

6.2.14 Odstranimo bučo iz sušilnika, jo ohladimo do temperature tehtalnega prostora, kot že prej rečeno (6.2.1) in stehtamo s točnostjo 0, 1 mg.

6.2.15 Ponovimo 6.2.13 in 6.2.14, medtem ko segrevamo 30 do 60 minut, dokler razlika v masi med dvema zaporednima tehtanjema ni manj kot 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do povečanja mase, uporabimo najnižjo maso, dobljeno v izračunu (7.1). Zadnja zabeležena masa naj bo M_1 g.

6.2.16 Dodamo 15 do 25 ml petroletra, da potrdimo, da je ekstrahirana snov popolnoma topna. Rahlo segrevamo in premešamo topilo, dokler se vsa maščoba ne raztopi.

6.2.16.1 Če je ekstrahirana snov popolnoma topna v petroletru, je masa maščobe razlika med masami, določenimi v fazah 6.2.1 in 6.2.15.

6.2.16.2 če je prisotna katera koli netopna snov, ali če smo v dvomih, popolnoma ekstrahiramo maščobi iz buč, tako da ponovno speremo s toplim petroletrom, ter pustimo, da se neraztopljeni material posede pred vsakim odlitjem. Zunanjost vratu buče izperemo trikrat.

V sušilniku eno uro segrevamo bučo, ki jo položimo na stran, ohladimo na temperaturo tehtalnega prostora kot prej (6.2.1) in stehtamo s točnostjo 0,1 mg. Masa maščobe je razlika med maso, dobljeno v 6.2.15 in to končno maso.

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Izračun**

Masa, v gramih, ekstrahirane maščobe je:

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

in vsebnost maščobe vzorca, izražena v odstotkih, je:

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

kjer je:

M_1 = masa, v gramih, buče M z maščobo po fazi 6.2.15;

M_2 = masa, v gramih, buče M po fazi 6.2.1 ali, v primeru neraztopljenega materiali ali dvoma, po fazi 6.2.16.2;

B_1 = masa, v gramih buče B slepega vzorca po fazi 6.2.15;

B_2 = masa, v gramih, buče B po fazi 6.2.1 ali v primeru neraztopljenega materiala ali dvoma, po fazi 6.2.16.2;

S = masa, v gramih uporabljenega vzorca.

7.2 **Ponovljivost**

Razlika med rezultati dveh določanj, ki jih istočasno ali v hitrem zaporedju na istem vzorcu, izvede isti analitik, pod istimi pogoji, ne presega 0,2 g maščobe na 100 g proizvoda z izjemo posnetega mleka v prahu, za katerega razlika ne sme presegati 0,1 g maščobe na 100 g proizvoda.

METODA 5: DOLOČANJE VSEBNOSTI SAHAROZE (POLARIMETRIJSKA METODA)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda določa vsebnost saharoze v:

— sladkanem kondenziranem mleku,

— sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,

— sladkanem kondenziranem posnetem mleku.

Vzorci ne smejo vsebovati invertiranega sladkorja.

2. DEFINICIJA

Vsebnost saharoze sladkanega kondenziranega mleka: vsebnost saharoze kot je določena z določeno metodo.

3. PRINCIP METODE

Metoda je osnovana na načelu Clergetove inverzije, rahle obdelave vzorca s kislino, ki izvede popolno hidrolizo saharoze, vendar skoraj nič hidrolize laktoze ali drugih sladkorjev. Vsebnost saharoze se dobi iz spremembe v rotacijei raztopine.

Bistri filtrat vzorca, brez mutarotacije laktoze, pripravimo tako, da raztopino obdelamo z amoniakom, sledi nevtralizacija in bistrenje z zaporednim dodajanjem raztopin cinkovega acetata in kalijevega heksacianoferata II.

V delu filtrata se saharoza hidrolizira na poseben način.

Iz rotacije filtrata pred in po inverziji, vsebnost saharoze izračunamo z uporabo primernih formul.

4. REAGENTI

4.1 Raztopina cinkovega acetata, 1 M: raztopimo 21,9 g kristaliziranega cinkovega acetata dihidrata $Zn(C_2H_3O_2)_2$. $2H_20$ in 3 ml ledocetne kisline v vodi in dopolnimo do 100 ml z vodo.

4.2 Raztopina kalijevega heksacianoferata (II), 0,25 M: raztopimo 10,6 g kristaliziranega kalijevega heksacianoferata (II) trihidrata $K_4[Fe(CN)_6]$. $3H_2O$ v vodi in dopolnimo do 100 ml z vodo.

4.3 Raztopina klorovodikove kisline, 6,35±=0,20 M (20 do 22 %) ali 5,0 ± 0,2 M (16 do 18 %).

4.4 Raztopina amoniaka, 2,0 ± 0,2 M (3,5 %).

4.5 Raztopina ocetne kisline, 2,0 ± 0,2 M (12 %).

4.6 Indikator bromtimol modro, 1 % (m/v) raztopina v etanolu.

5. OPREMA

5.1 Tehtnica, občutljivost 10 mg.

5.2 Polarimetrijska cevka, 2 dm,s točno kalibrirano dolžino.

5.3 Polarimeter ali saharimeter:

a) polarimeter z natrijevo svetlobo ali živosrebrno zeleno svetlobo (svetloba živosrebrnih hlapov s prizmo ali posebni Wratten zaslon št. 77 A), s točnostjo najmanj 0,05 kotnih stopinj.

b) saharimeter z mednarodno sladkorno lestvico, z uporabo bele svetlobe, ki gre skozi 15 mm filter 6 % raztopine kalijevega dikromata, ali natrijeve svetlobe, s točnostjo najmanj 0,1 ° na mednarodni sladkorni lestvici.

5.4 Vodna kopel, regulirana pri 60 °C ± 1 °C.

6. POSTOPEK

6.1 **Kontrolno določanje**

Da bi standardizirali postopek, reagente in aparature, izvedemo kontrolno določanje v dveh paralelnih določitvah, kot je opisano spodaj, tako da uporabimo mešanico 100 g mleka in 18 g čiste saharoze ali mešanice 110 g posnetega mleka in 18 g čiste saharoze, vsaka odgovarja 40 g zgoščenega mleka, ki vsebuje 45 % saharoze. Izračunamo vsebnost sladkorja, tako da uporabimo formulo pod 7, tako da namesto M, F in P v formuli 1 uporabimo količino odvzetega mleka in vsebnost maščob in beljakovin tega mleka, in namesto M v formuli 2, vrednost 40,00. Razlika povprečij dobljenih vrednosti ni večja od 0,2 % od 45,0 %.

6.2 **Določanje**

6.2.1 Odtehtamo s točnostjo 10 mg, približno 40 g dobro premešanega vzorca v 100 ml stekleno čašo. Dodamo 50 ml vroče vode (80 do 90 °C) in dobro premešamo.

6.2.2 Kvantitativno prenesemo mešanico v 200 ml merilni valj, izpiramo čašo z zaporednimi količinami vode pri 60 °C, dokler ni celoten volumen med 120 in 150 ml. Mešamo in ohladimo na sobno temperaturo.

6.2.3 Dodamo 5 ml razredčene raztopine amoniaka (4.4). ponovno premešamo in pustimo stati 15 minut.

6.2.4 Nevtraliziramo amoniak tak,o da dodamo ekvivalentno količino razredčene raztopine ocetne kisline (4.5). Vnaprej določimo točno porabo v ml s titracijo raztopine amoniaka, tako da uporabimo bromtimol modro kot indikator. Premešamo.

6.2.5 Dodamo 12,5 ml raztopine cinkovega acetata, tako da nagnjeno bučo rahlo premešamo z vrtenjem.

6.2.6 Dodamo 12, 5 ml raztopine kalijevega heksacianoferata (II) (4.2) kot to velja za raztopino acetata.

6.2.7 Segrejemo vsebino buče na 20 °C in dopolnimo do oznake 200 ml z vodo pri 20 °C.

Opomba:
Med katerimi koli do zdaj opisanimi fazami, je treba dodajati vodo ali reagent na tak način, da se ne tvorijo mehurčki, in iz istega razloga mešamo vedno tako, da bučo rotiramo namesto stresamo. Če ugotovimo prisotnost zračnih mehurčkov preden dopolnimo do 200 ml volumna, jih je možno odstraniti tako, da začasno priključimo bučo na vakumsko črpalko in bučo rotiramo.

6.2.8 Zamašimo bučo s suhim zamaškom in temeljito premešamo z močnim stresanjem.

6.2.9 Pustimo stati nekaj minut in nato filtriramo skozi suh filter papir. Prvih 25 ml filtrata zavržemo.

6.2.10 Direktna polarizacija: določimo optično rotacijo filtrata pri 20 °C ± 1 °C.

6.2.11 Inverzija: odpipetiramo 40 ml gornjega filtrata v 50 ml merilno bučo. Dodamo 6,0 ml 6,35 M klorovodikove kisline ali 7,5 ml 5,0 M klorovodikove kisline (4.3).

Postavimo bučo na vodno kopel, ki ima 60 °C, za 15 minut, ter zagotovimo, da je celotni vrat buče pod vodo. Mešamo tako, da prvih pet minut vrtimo. V tem času vsebina buče doseže temperaturo kopeli. Ohladimo na 20 °C in razredčimo do oznake z vodo pri 20 °C. Premešamo in pustimo stati eno uro na tej temperaturi.

6.2.12 *Invertna polarizacija*

Določimo rotacijo invertne raztopine pri 20 °C ± 0,2 °C. (Vendar če se temperatura T tekočine v polarizacijski epruveti razlikuje za več kot 0,2 °C med merjenjem, je treba uporabiti korekcijo temperature, ki je omenjena pod 7.2).

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Metoda izračuna**

Izračunamo vsebnost saharoze z naslednjo formulo:

1) $v = \frac{M}{100} (1{,}08\ F + 1{,}55\ P)$

2) $S = \frac{D - 1{,}25\ I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times M}\ \%$

kjer je:

S = vsebnost saharoze,

M = masa odtehtanega vzorca v gramih,

F = odstotek maščobe v vzorcu,

P = odstotek beljakovin (N x 6,38) v vzorcu,

V = volumen v ml, na katerega se vzorec razredči pred filtracijo,

v = korekcija v ml za volumen oborine, ki se tvori med bistrenjem

D = direktni polarimetrijski odcitek (polarimetrijski odcitek pred inverzijo),

I = polarimetrijski odčitek po inverziji,

L = dolžina v dm polarimetrijske cevi,

Q = inverzijski faktor, katerega vrednosti so dane spodaj.

Opombe:

(a) Kadar odtehtamo točno 40,00 g kondenziranega mleka in uporabimo polarimeter z natrijevo svetlobo, kotnimi stopinjami in 2dm polarimetrijsko cevko pri 20,0 °C ± 0,1 °C, lahko vsebnost saharoze normalno zgoščenega mleka (C = 9) izračunamo na podlagi naslednje formule:

$$S = (D - 1{,}25\ I) \times (2{,}833 - 0{,}00612\ F - 0{,}00878\ P)$$

(b) Če je invertna polarizacija merjena na temperaturi, ki ni 20 °C, se številke množi s:

$$(1 + 0{,}0037\ (T - 20\ )).$$

7.2 **Vrednosti inverzijskega faktorja Q**

Naslednje formule dajo točne vrednosti za Q, za različne vire svetlobe s popravki za koncentracijo in temperaturo:

natrijeva svetloba in polarimeter s kotnimi stopinjami:
Q = 0,8825 + 0,0006 (C - 9) - 0,0033 (T - 20).

Živosrebrna zelena svetloba in polarimeter s kotnimi stopinjami:
Q = 1,0392 + 0,0007 (C - 9) - 0,0039 (T - 20).

Bela svetloba z dikromatnim filtrom in saharimetrom s stopinjami po mednarodni sladkorni lestvici:
Q = 2,549 + 0,0017 (C - 9) - 0,0095 (T - 20).

V gornji formuli:

C = odstotek skupnega sladkorja v invertirani raztopini kot je polarizirana,

T = temperatura invertirane raztopine pri polarimetrijskem odčitku.

Opomba 1:
Odstotek skupnega sladkorja C v invertirani raztopini se lahko izračuna iz neposrednega odčitka in spremembe inverzije na običajen način, z uporabo običajnih vrednosti za specifične rotacije saharoze, laktoze in invertnega sladkorja.
Popravek 0,0006 (C - 9) itd., je točen samo, kadar je C približno 9; za normalno kondenzirano mleko se to korekcijo lahko zanemari, ker je C blizu 9.

Opomba 2:
Nihanje temperature od 20 °C za 1 °C pomeni majhno razliko v neposrednem odčitku, vendar nihanja več kot 0,2 °C v invert odčitku zahteva korekcijo. Korekcija -0,0033 (T - 20) itd., je točna samo med 18 °C in 22 °C.

7.3 **Ponovljivost**

Razlika med rezultati dveh določanj, ki jih izvaja simultano ali v hitrem zaporedju na istem vzorcu isti analitik, pod istimi pogoji, ni večja od 0,3 g saharoze na 100 g kondenziranega mleka.

METODA 6: DOLOČANJE VSEBNOSTI MLEČNE KISLINE IN LAKTATOV

1. PODROČJE IN NAMEN UPORABE

Ta metoda določa mlečno kislino in laktate, izražene kot mlečna kislina, v:

— sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleko v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,

— sušeno polno mleko ali polno mleko v prahu,

— sušeno delno posneto mleko ali delno posneto mleko v prahu,

— sušeno posneto mleko ali posneto mleko v prahu.

2. DEFINICIJA

Vsebnost mlečne kisline in laktatov v sušenem mleku: mlečna kislina in laktati, izraženi kot mlečna kislina, vsebnost določena z opredeljeno metodo.

3. PRINCIP METODE

Iz raztopine vzorca istočasno odstranimo maščobo, beljakovine in laktozo, tako da dodajamo bakrov sulfat in kalcijev hidroksid, ter nato filtriramo.

Mlečna kislina in laktati v filtratu se spremenijo v acetaldehid s koncentrirano žveplovo kislino v prisotnosti bakrovega II sulfata.

Vsebnost mlečne kisline se določa kolorimetrijsko z uporabo p-hidroksidifenila.

Vsebnost mlečne kisline in laktatov je izražena kot mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe.

4. REAGENTI

4.1 Raztopina bakrovega (II) sulfata: raztopimo 250 g bakrovega (II) sulfata ($CuSO_4$. $5H_20$) v vodi in razredčimo do 1 000 ml z vodo.

4.2 Suspenzija kalcijevega hidroksida.

4.2.1 Stremo 300 g kalcijevega hidroksida ($Ca(OH)_2$) v tarilnici z vodo; skupaj uporabimo 900 ml vode. Suspenzijo je treba sveže pripraviti pred uporabo.

4.2.2 Suspenzijo kalcijevega hidroksida: zmeljemo 300 g kalcijevega hidroksida ($Ca(OH)_2$) v tarilnici z vodo, tako da skupaj uporabimo 1 400 ml. Suspenzijo je treba sveže pripraviti pred uporabo.

4.3 Žveplova kislina - raztopina bakrovega (II) sulfata): K 300 ml žveplove kisline 95,9 do 97,0 % (m/m) H_2SO_4, dodamo 0,5 ml raztopine bakrovega (II) sulfata (4.1).

4.4 Raztopina p-hidroksidifenila ($C_6H_5C_6H_4OH$): raztopimo, tako da stresamo in rahlo segrevamo 0,75 g p-hidroksidifenila v 5 ml vodne raztopine natrijevega hidroksida, ki vsebuje 5 g NaOH na 100 ml. Razredčimo na 50 ml z vodo v merilni buči. Raztopino hranimo v steklenici iz rjavega stekla na temnem in hladnem. Raztopine ne smemo uporabiti, če pride do spremembe barve ali motnosti. Najdaljša doba uporabnosti je 72 ur.

4.5 Standardna raztopina mlečne kisline: raztopimo, tik pred uporabo 0,1067 g litijevega laktata (CH_3CHOH-COOLi) v vodi in razredčimo do 1 000 ml v merilni buči. 1 ml te raztopine odgovarja 0,1 mg mlečne kisline.

4.6 Standardno rekonstituirano mleko: vnaprej analiziramo več vzorcev visoko kvalitetnega sušenega mleka. Za pripravo umeritvene krivulje izberemo vzorec, ki ima najnižjo vsebnost mlečne kisline, ki ne vsebuje več kot 30 mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe. Upoštevamo postopek opisan pod 6.2.1 in 6.2.2. spodaj.

5. OPREMA

5.1 Analitska tehtnica.

5.2 Spektrofotometer primeren za odčitke pri valovni dolžini 570 nm.

5.3 Vodna kopel pri 30 °C ± 2 °C.

5.4 Terilnica in pestilo.

5.5 Filter papir (Schleicher in Schull 595, Whatman I ali enakovreden papir).

5.6 Epruvete iz pireksa ali enakovrednega materiala (dimenzije 25 x 150 mm).

Opomba:
Vsa steklovina mora biti povsem čista in namenjena izključno uporabi za to določanje. Steklovino, ki vsebuje ostanke oborine speremo s koncentrirano klorovodikovo kislino pred umivanjem.

6. POSTOPEK

6.1 **Slepi preskus**

Izvedemo slepi preskus, tako da 30 ml vode postavimo v 50 ml graduirane epruvete in da to epruveto postopamo kot je opisano v 6.2.4 do vključno 6.2.11. Če slepi vzorec, merjen proti vodi, presega ekvivalentno koncentracijo 20 mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe, je treba preveriti reagente in nečiste reagente ali reagent zamenjati. Slepi preskus izvedemo istočasno kot analizo vzorca.

6.2 **Določanje**

Opomba:
Izogibamo se kontaminacije z nečistočami, posebno slino in znojem.

6.2.1 Določimo vsebnost suhe snovi brez maščobe a) g vzorca tako da odštejemo vsebnost maščob (ki jo dobimo z metodo 4) in vsebnost vlage (ki jo dobimo z metodo 2) od 100.

6.2.2 Stehtamo $\frac{1000}{(a - 10)}$ g vzorca s točnostjo 0,1 g. To količino vzorca dodamo 100 ml vode in temeljito premešamo.

6.2.3 Odpipetiramo 5 ml dobljene raztopine v 50 ml graduirano epruveto in razredčimo z vodo do 30 ml.

6.2.4 Med stresanjem počasi dodajamo 5 ml raztopine bakrovega (II) sulfata (4.1) in pustimo stati 10 minut.

6.2.5 Med stresanjem počasi dodajamo 5 ml suspenzije kalcijevega hidroksida (4.2.1) ali 10 ml suspenzije kalcijevega hidroksida (4.2.2).

6.2.6 Razredčimo z vodo do 50 ml, temeljito stresamo in pustimo stati 10 minut. Nato filtriramo. Prvi del filtrata zavržemo.

6.2.7 Odpipetiramo 1 ml filtrata v epruveto (5.6).

6.2.8 Z bireto ali graduirano pipeto dodamo v epruveto 6,0 ml raztopine žveplove kisline-bakrovega (II) sulfata (4.3). Premešamo.

6.2.9 Segrevamo na vreli vodni kopeli pet minut. Ohladimo na sobno temperaturo pod tekočo vodo.

6.2.10 Dodamo dve kapljici p-hidroksidifenil reagenta (4.4) in temeljito stresamo, da se reagent enakomerno porazdeli po tekočini. Epruveto postavimo na vodno kopel pri 30 °C ± 2 °C, pustimo stati 15 minut in občasno stresamo.

6.2.11 Epruveto postavimo na vrelo vodno kopel za 90 sekund. Ohladimo na sobno temperaturo okolja pod tekočo vodo.

6.2.12 Zmerimo optično gostoto proti slepemu vzorcu (6.1) v času treh ur pri valovni dolžini predpisani pod 5.2.

6.2.13 Če absorbanca presega absorbanco najvišje točke standardne krivulje, ponovimo preskus, tako da uporabimo ustrezno razredčen filtrat, ki ga dobimo v 6.2.6.

6.3 **Priprava standarda**

6.3.1 Odpipetiramo 5 ml rekonstituiranega mleka (4.6) v pet 50 ml graduiranih epruvet. V te epruvete odpipetiramo 0,1,2,3 in 4 ml standardne raztopine (4.5), da tako dobimo območje standardov, ki odgovarjajo 0, 20, 40, 60 in 80 mg dodane mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe sušenega mleka.

6.3.2 Razredčimo z vodo do približno 30 ml in postopamo, kot je opisano v 6.2.4 do 6.2.11.

6.3.3 Zmerimo absorbance standardnih raztopin (6.3.1) proti slepemu vzorcu (6.1) pri valovni dolžini določeni pod 5.2. V diagramu izrišemo absorbanco proti koncentraciji mlečne kisline, navedene v 6.3.1, t.j. 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg in 80 mg na 100 g suhe snovi brez maščobe. Narišemo najugodnejšo premico skozi točke in pripravimo standardno umeritveno krivuljo tako da jo vzporedno premaknemo, tako da gre čez presečišče obeh osi.

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Metoda izračuna**

Absorbanco, ki jo izmerimo pod 6.2.12 ali 6.2.13 pretvorimo v mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe v vzorcu glede na standardno umeritveno krivuljo. Rezultat pomnožimo s faktorjem redčenja, kadar je filtrat razredčen na način opisan v 6.2.13.

7.2 **Ponovljivost**

Razlika med rezultati dveh določanj, ki jih simultano ali v hitrem zaporedju izvede isti analitik na istem vzorcu, pod istimi pogoji, ne presegajo 8 mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe za vsebino do 80 mg. Za višje vrednosti ta razlika ne sme presegati 10 % najnižje vrednosti.

METODA 7: DOLOČANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE (MODIFICIRAN SANDERS IN SAGERJEV POSTOPEK)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda opisuje dolocanje aktivnosti fosfataze v:

— sušeno mleko z visoko vsebnostjo maščobe ali mleko v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,

— sušeno polno mleko ali polno mleko v prahu,

— sušeno delno posneto mleko ali delno posneto mleko v prahu,

— sušeno posneto mleko ali posneto mleko v prahu.

2. DEFINICIJA

Aktivnost fosfataze sušenega mleka je merilo količine prisotne aktivne bazične fosfataze. Izražena je kot količina fenola v μg ki se sprosti z 1 ml rekonstituiranega mleka, kot to določa spodaj opisan postopek.

3. PRINCIP METODE

Aktivnost fosfataze sušenega mleka se določa s sposobnostjo fosfataze, da sprosti fenol iz dinatrijevega fenilfosfata. Količina sproščenega fenola, pod predpisanimi pogoji se določa s spektrofotometričnim merjenjem barve, ki jo razvije Gibbov reagent.

4. REAGENTI

4.1 **Raztopina A**

Barijev borat hidroksid: pH 10,6 ± 0,1 pri 20 °C.

Raztopimo: 25,0 g barijevega hidroksida ($Ba(OH)_2.8H_20$) v vodi in razredčimo do 500 ml.

Raztopimo: 11,0 g borove kisline (H_3BO_3) v vodi in razredčimo do 500 ml.

Obe raztopini segrejemo na 50 °C in premešamo.

Stresamo in ohladimo mešanico na sobno temperaturo.

Naravnamo pH na 10,6 +- 0,1 z raztopino barijevega hidroksida in filtriramo.

Raztopino shranimo v tesno zaprti posodi.

Pred uporabo razredčimo pufer z enako količino vode.

4.2 **Raztopina B:**

Pufer za razvijanje barve.

Raztopimo 6,0 g natrijevega metaborata ($NaBO_2$) (ali 12,6 g $NaBO_2$. $4H_20$) in 20,0 g natrijevega klorida (NaCl) v vodi in razredčimo do 1 000 ml z vodo.

4.3 **Raztopina C**

Raztopina pufernega substrata.

4.3.1 Raztopimo 0,5 g dinatrijevega fenil fosfata ($Na_2C_6H_5PO_4$. $2H_20$) v 4,5 ml raztopine B (4.2). Dodamo 2 kapljici raztopine E (4.5) in pustimo stati 30 minut. Ekstrahiramo barvo z 2,5 ml butanola (4.10). Če je treba, ponovimo ekstrahiranje barve Po separaciji zavržemo butanol. To raztopino lahko več dni hranimo v hladilniku. Pred uporabo še enkrat razvijemo in ekstrahiramo barvo.

4.3.2 Odpipetiramo 1 ml te raztopine v 100 ml merilno bučo in dopolnimo z raztopino A. Raztopino pufra pripravimo neposredno pred uporabo.

4.4 **Raztopina D**

Obarjanje.

Raztopimo 3,0 g cinkovega sulfata ($ZnSO_4.7H_2O$) in 0,6 g bakrovega (II) sulfata ($CuSO_4$. $5H_2O$) v vodi in dopolnimo do 100 ml z vodo.

4.5 **Raztopina E**

Gibbov reagent

Raztopimo 0,040 g 2,6 -dibromkinona 1,4 - kloroimida ($O.C_6H_2Br_2.NCl$) v 10 ml 96 % etanola. Shranimo raztopino v steklenico iz temnega stekla, ki jo hranimo v hladilniku. Reagent zavržemo, ko se razbarva.

4.6 Pufer za redčenje barve

Razredčimo 10 ml raztopine B (4.2), pufra za razvijanje barve, na 100 ml z vodo.

4.7 Raztopina bakrovega sulfata

Raztopimo 0,05 g bakrovega (II) sulfata ($CuSO_4.5H_20$) v vodi in dopolnimo do 100 ml z vodo.

4.8 Standardna raztopina fenola

Raztopimo 0,200 ± 0,001 g čistega fenola v vodi in dopolnimo z vodo do 100 ml v merilni bučki. To raztopino lahko shranimo več mesecev v hladilniku. Z vodo razredčimo 10 ml te raztopine do 100 ml. Ta razredčena raztopina vsebuje 200 μg fenola v 1 ml in se lahko uporabi za pripravo bolj razredčenih raztopin.

4.9 Prevreta destilirana voda.

4.10 n-Butanol

5. OPREMA

5.1 Analitska tehtnica.

5.2 Vodna kopel, termostatsko regulirana pri 37 °C ± 1 °C.

5.3 Spektrofotometer, primeren za odčitke pri valovni dolžini 610 nm.

5.4 Filter papir (Schleicher in Schull 597, Whatman 42 ali enakovreden filter papir).

5.5 Vodna kopel, vrela.

5.6 Aluminijeva folija.

6. POSTOPEK

Varnostni ukrepi:

1. Izogibati se je treba direktni sončni svetlobi.
2. Vsa steklovina, zamaški in material za odstranjevanje morajo biti popolnoma čisti. Priporočljivo je, da se sperejo in segrejejo do vrenja v vodi ali obdelajo s paro.
3. Izogibati se je treba uporabi plastičnih materialov (zamaškov na primer), ker lahko vsebujejo fenole.
4. Slina vsebuje fosfatazo, zato se je treba skrbno izogibati kontaminaciji s slino.

6.1 **Priprava vzorca**

6.1.1 S točnostjo 0,1 g stehtamo 10 g vzorca in raztopimo v 90 ml vode. Temperatura za raztapljanje mleka v prahu v nobenem primeru ne sme presegati 35 °C.

6.2 **Določanje**

6.2.1 V vsako od obeh epruvet vstavimo 1 ml rekonstituiranega mleka, pripravljenega kot je opisano v 6.1.1.

6.2.2 Segrevamo eno od epruvet v vreli vodi dve minuti. Z aluminijevo folijo (5.6) pokrijemo epruveto in vodno kopel (5.5) ali, na primer, čašo, da zagotovimo,da se segreva celotna epruveta. Ohladimo v hladni vodi na sobno temperaturo. To epruveto uporabimo za slepi preskus. V vseh naslednjih postopkih z obema epruvetama ravnamo enako.

6.2.3 Dodamo 10 ml raztopine C (4.3.2). Premešamo in postavimo epruveto v vodno kopel pri 37 °C (5.2).

6.2.4 Inkubiramo 60 minut v vodni kopeli, tako da občasno stresamo.

6.2.5 Epruvete takoj prenesemo v vrelo vodno kopel (5.5) in segrevamo dve minuti; ohladimo na sobno temperaturo v hladni vodi.

6.2.6 Dodamo 1 ml raztopine D (4.4), premešamo in filtriramo čez suhi filter papir; zavržemo prvi filtrat, dokler ne dobimo bistre tekočine.

6.2.7 5 ml vsakega filtrata damo v epruvete, dodamo 5 ml raztopine B (4.2) in 0,1 ml raztopine E (4.5). Premešamo.

6.2.8 Pustimo, da se barva razvija 30 minut na sobni temperaturi, zaščiteno od neposredne sončne svetlobe.

6.2.9 Izmerimo absorbanco raztopine vzorca, proti slepemu vzorcu, pri valovni dolžini, ki je navedena v 5.3.

6.2.10 Ponovimo določanje, če je absorbanca raztopine nad absorbanco standardne raztopine s koncentracijo 20 µg fenola, pripravljenega v skladu s 7.

Če je ta meja presežena, razredčimo ustrezen volumen rekonstituiranega mleka v skladu s 6.1.1 s primernim volumnom tega mleka, ki ga previdno segrejemo, kot je navedeno v 6.2.2, da inaktiviramo prisotno fosfatazo.

7. PRIPRAVA STANDARDNE UMERITVENE KRIVULJE

7.1 V štiri 100 ml merilne buče odpipetiramo 1,3,5, in 10 ml standardne raztopine, razredčene v skladu s 4.8 in dopolnimo do volumna z vodo; te raztopine vsebujejo 2, 6, 10 in 20 μg fenola na ml.

7.2 V epruvete odpipetiramo 1 ml vode ali 1 ml vsake standardne raztopine (7.1), da dobimo serijo vzorcev, ki vsebujejo 0 (slepa vrednost, ki jo dobimo z uporabo 1 ml vode) - 2 - 6 -10 in 20 μg fenola.

7.3 V vsako epruveto zaporedno odpipetiramo 1 ml raztopine bakrovega (II) sulfata (4.7), 5 ml raztopine puferne raztopine (4.6), 3 ml vode in 0,1 ml raztopine E (4.5). Premešamo.

7.4 Epruvete pustimo 30 minut na sobni temperaturi, zaščiteno pred neposredno sončno svetlobo.

7.5 Izmerimo absorbanco raztopin v vsaki od epruvet, v primerjavi s slepo vrednostjo, pri valovni dolžini navedeni v 5.3.

7.6 Pripravimo standardno umeritveno krivuljo, tako da nanašamo vrednosti absorbance proti količinam fenola v μg, kot je navedeno v 7.2.

8. PODAJANJE REZULTATOV

8.1 **Izračun**

8.1.1 Pretvorimo številke pod 6.2.9 v μg fenola, z uporabo standardne umeritvene krivulje.

8.1.2 Izračunamo fosfatazno aktivnost, izraženo kot μg fenola na ml rekonstituiranega mleka v skladu z naslednjo formulo:

aktivnost fosfataze = 2,4 x P

kjer P = vsebnost fenola v μg v skladu z 8.1.1

8.1.3 Če je treba razredčiti, kot je navedeno pod 6.2.10, pomnožimo rezultat, ki ga dobimo v 8.1.2 s faktorjem redčenja.

8.2 **Ponovljivost**

Razlika med rezultati dveh določanj, ki jih simultano ali v hitrem zaporedju na istem vzorcu izvede isti analitik, pod istimi pogoji, ne smejo presegati 2 μg fenola, sproščenega iz 1 ml rekonstituiranega mleka.

METODA 8: DOLOČANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE (ASCCHAFFENBURG IN MÜLLENOV POSTOPEK)

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta metoda opisuje določanje aktivnosti fosfataze v:

— sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleko v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,

— sušenem polnem mleku ali polnem mleku v prahu,

— sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu,

— ušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu.

2. DEFINICIJA

Aktivnost fosfataze sušenega mleka je merilo količine aktivne bazičnefosfataze, ki je prisotna v proizvodu. Izraža se kot količina p-nitrofenola v mikrogramih sproščenega iz 1 ml rekonstituiranega vzorca, pod opisanimi pogoji.

3. PRINCIP METODE

Rekonstituirani vzorec je razredčen s pufrovim substratom pri pH 10,2 in inkubiran pri temperaturi 37 °C dve uri. Kakršna koli bazičnafosfataza, ki je prisotna v vzorcu, bo v teh okoliščinah sprostila p-nitrofenol iz dodanega dinatrijevega p-nitrofenil fosfata. Sproščeni p-nitrofenol se določa z neposredno primerjavo s standardnimi barvnimi stekli v enostavnem komparatorju, tako da uporabimo reflektirano svetlobo.

4. REAGENTI

4.1 Raztopina pufra natrijevega karbonata-hidrogenkarbonata.

Raztopimo 3,5 g brezvodnega natrijevega karbonata in 1,5 g natrijevega hidrogen karbonata v vodi in razredčimo z vodo do 1 000 ml v merilni buči.

4.2 Substrat pufra.

Raztopimo 1,5 g dinatrijevega p-nitrofenilfosfata v pufru natrijevega karbonata-hidrogen karbonata (4.1) in razredčimo s pufrom do 1 000 ml v merilni bučki (4.1).

Ta raztopina je stabilna, če je shranjena v hladilniku (4 °C) en mesec, vendar se barvni kontrolni test izvede na takih shranjenih raztopinah - glej 6, varnostni ukrep št. 3.

4.3 Raztopine za bistrenje

4.3.1 Raztopina cinkovega sulfata.

Raztopimo 30,0 g cinkovega sulfata ($ZnSO_4$) v vodi in razredčimo z vodo do 100 ml v merilni bučki.

4.3.2 Raztopina kalijevega heksacianoferata (II)

Raztopimo 17,2 g kalijevega heksacianoferata (II) trihidrata ($K_4Fe(CN)_6.3H_20$) in razredčimo z vodo do 100 ml v merilni buči.

5. OPREMA

5.1 Analitska tehtnica.

5.2 Vodna kopel, termostatsko regulirana pri 37 °C ± 1 °C.

5.3 Komparator s posebnim diskom, ki vsebuje standardna barvna stekla kalibrirana v μg p-nitrofenola na ml mleka, in 2 x 25 mm kivete.

6. POSTOPEK

Varnostni ukrepi:

1. Po uporabi je treba epruvete izprazniti, izprati z vodo, oprati v vroči vodi, ki vsebuje bazični detergent, ter nato dobro sprati in očistiti z vročo tekočo vodo. Končno jih je treba sprati v vodi in posušiti pred uporabo.

   Pipete je treba temeljito sprati v čisti hladni tekoči vodi takoj po uporabi, ter nato sprati v vodi in posušiti pred uporabo.

2. Zamaške za epruvete je treba temeljito sprati v vroči tekoči vodi takoj po uporabi, ter nato v vreli vodi dve minuti.

3. Raztopina pufrovega substrata (4.2) mora ostati stabilna najmanj en mesec, če je shranjena v hladilniku pri 4 °C ali manj. Kakršna koli nestabilnost se pokaže tako, da se pojavi rumena barva. Medtem ko se rezultati testa vedno odčitajo proti z prevretemu kontrolnemu vzorcu, ki vsebuje isto raztopino barvnega substrata, se priporoča, da se ta raztopina ne uporabi, če je barvni odčitek več kot 10 μg, kadar ga odčitamo v 25-mm kiveti v komparatorju merjeno proti destilirani vodi v drugi 25 mm kiveti.

4. Uporabimo pipeto za vsak vzorec in pazimo, da pipete ne kontaminiramo s slino.

5. Test se ne sme nikoli izpostaviti neposredni sončni svetlobi.

6.1 **Priprava vzorca**

Raztopimo 10 g mleka v prahu v 90 ml vode. Temperatura za raztapljanje mleka v prahu ne sme presegati 35 °C.

6.2 **Določanje**

6.2.1 Odpipetiramo 15 ml pufernega substrata (4.2) v čisto, suho epruveto, in dodamo 2 ml rekonstituiranega vzorca (6.1) za testiranje. Zamašimo epruveto, premešamo z obračanjem in postavimo v na vodno kopel pri 37 °C. (5.2).

6.2.2 Istočasno postavimo na vodno kopel kontrolno epruveto, ki vsebuje 15 ml pufernega substrata in 2 ml prevretega rekonstituiranega vzorca, ki je podoben tistemu, ki se testira.

6.2.3 Po dveh urah odstranimo obe epruveti iz vodne kopeli, dodamo 0,5 ml cinkovega sulfata za obarjanje (4.3.1), ponovno zamašimo, temeljito stresamo in pustimo stati tri minute. Dodamo 0,5 ml kalijevega heksacianoferata (II) za obarjanje(4.3.2), temeljito premešamo in filtriramo čez naguban filter papir (5.4) in zberemo čisti filtrat v čisto epruveto.

6.2.4 Prenesemo filtrat v 25-mm kiveto in primerjamo s filtratom prevretega kontrolnega vzorca v komparatorju, tako da uporabimo poseben disk (5.3).

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Izračun**

Neposreden odčitek, ki ga dobimo po 6.2.4 je zabeležen kot µg p-nitrofenol na ml vzorca ali na ml rekonstituiranega vzorca.

7.2 **Ponovljivost**

Razlika med rezultati dveh določanj, ki jih simultano ali v hitrem zaporedju na istem vzorcu izvede isti analitik pod istimi pogoji, ne sme presegati 2 µg p-nitrofenola sproščenega iz 1 ml rekonstituiranega mleka.