31992D0608

ROZHODNUTÍ RADY

ze dne 14. listopadu 2003,

kterým se stanoví metoda analýzy a testování tepelně ošetřeného mléka určeného k přímé lidské spotřebě

(92/608/EHS)

RADA EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici 85/397/EHS ze dne 5. srpna 1985 o hygienických a veterinárních otázkách obchodu s tepelně ošetřeným mlékem uvnitř Společenství [1], a zejména na čl. 11 odst. 6 uvedené směrnice,

s ohledem na návrh Komise,

vzhledem k tomu, že podle čl. 11 odst. 6 směrnice 85/397/EHS Rada stanoví zejména režim kontroly podle odstavce 2 uvedeného článku; že tyto kontroly, které provádějí zařízení pod dohledem a na odpovědnost úředních útvarů, jakož i pod pravidelnou kontrolou těchto úřadů, mají zajistit dodržování požadavků směrnice 85/397/EHS, a to zejména požadavků uvedených v čl. 3 odst. A bodu 3;

vzhledem k tomu, že stanovení kontrolních postupů zahrnuje určení metod nezbytných k jejich provádění,

vzhledem k tomu, že je vhodné stanovit pro tepelně ošetřené mléko určené k přímé lidské spotřebě metody pro stanovení obsahu sušiny, obsahu tuku, obsahu tukuprosté sušiny, celkového obsahu dusíku, obsahu bílkovin a objemové hmotnosti tepelně ošetřeného mléka;

vzhledem k tomu, že z technických důvodů je vhodné nejprve stanovit referenční metody analýzy a testování, které mají zajistit dodržování norem stanovených v čl. 3 odst. A bodu 3 směrnice 85/397/EHS; že je zejména důležité prošetřit podmínky, za kterých se tyto rutinní metody analýzy a testování používají; že v očekávání výsledků těchto šetření dbají příslušné orgány na to, aby bylo za pomoci rutinních metod možné dodržet uvedené normy;

vzhledem k tomu, že stanovení uvedených metod zahrnuje zejména určení analytických postupů a stanovení kritérií spolehlivosti za účelem zajistit jednotný výklad výsledků,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

Metody analýzy a testování pro tepelně ošetřené mléko určené k přímé lidské spotřebě jsou tyto:

— stanovení obsahu sušiny,

— stanovení obsahu tuku,

— stanovení obsahu tukuprosté sušiny,

— stanovení celkového obsahu dusíku,

— stanovení obsahu bílkovin,

— stanovení objemové hmotnosti.

[1] Úř. věst. L 226, 24.8.1985, s. 13. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí 89/662/EHS (Úř. věst. L 395, 30.12.1989, s. 13).

Článek 2

Provádění referenčních metod analýzy a testování, stanovení kritérií spolehlivosti a způsobu odběru vzorků se musí provádět podle předpisů stanovených v příloze I.

Článek 3

Metody uvedené v článku 1 jsou popsány v příloze II.

Článek 4

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

V Bruselu den 14. listopadu 1992.

Za Radu

předseda

J. GUMMER

PŘÍLOHA I

I. OBECNÁ USTANOVENÍ

1. ÚVOD

Obecná ustanovení se týkají činidel, materiálu, vyjádření výsledků, kritérií spolehlivosti a zprávy o analýze. Příslušné orgány členských států a laboratoře pověřené odběrem vzorků a provedením analýzy mléka musí dodržovat tato ustanovení.

2. ČINIDLA

2.1. **Voda**

2.1.1. Pokud není stanoveno jinak, voda použitá k rozpouštění, ředění nebo mytí musí být povinně voda destilovaná, deionizovaná nebo demineralizovaná alespoň odpovídající čistoty.

2.1.2. „Rozpouštěním“ nebo „ředěním“ (bez dalšího upřesnění) se rozumí „rozpouštění ve vodě“ nebo „ředění vodou“.

2.2. **Chemikálie**

Pokud není stanoveno jinak, všechny používané chemikálie musí mít být uznané analytické jakosti.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1. **Seznam přístrojů a pomůcek**

Příslušný seznam přístrojů a pomůcek pro různé referenční metody se týká přístrojů a pomůcek ke zvláštnímu použití a se zvláštní specifikací.

3.2. **Analytické váhy**

„Analytickými vahami“ se rozumí váhy s přesností vážení na 0,1 mg.

4. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

4.1. **Výsledky**

Pokud není stanoveno jinak, výsledek uvedený ve zprávě o analýze (6) musí být aritmetickým průměrem dvou analýz, které splňují kritérium opakovatelnosti (5.1.1) pro příslušnou metodu. Když není toto kritérium opakovatelnosti splněno, analýza se musí opakovat, jinak je výsledek neplatný.

4.2. **Výpočet procentuálního podílu**

Pokud není stanoveno jinak, výsledek se vypočítá v procentech hmotnosti vzorku.

5. KRITÉRIA SPOLEHLIVOSTI: OPAKOVATELNOST (r) A REPRODUKOVATELNOST (R)

5.1. Kritéria spolehlivosti uvedená pro každou metodu jsou definována takto:

5.1.1. *Opakovatelnost (r)* je hodnota, pod kterou se nachází absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma samostatnými výsledky analýzy, které byly získány stejným postupem s identickým výrobkem za stejných podmínek (stejný pracovník, stejný přístroj, stejná laboratoř, krátké časové období).

5.1.2. *Reprodukovatelnost (R)* je hodnota, pod kterou se nachází absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma samostatnými výsledky analýzy, které byly získány stejným postupem s identickým výrobkem za odlišných podmínek (jiný pracovník, jiný přístroj, jiná laboratoř a/nebo jiné časové období).

5.1.3. Pokud není stanoveno jinak, hodnoty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti pro každou z použitých metod činí 95 % spolehlivosti podle normy ISO 5725, druhé vydání 1986.

5.1.4. Kruhové testy a nezbytné studie by měly být naplánovány a uskutečněny v souladu s mezinárodními pokyny.

6. ZPRÁVA O ANALÝZE

Zpráva o analýze musí upřesnit použitý postup a získané výsledky. Mimo jiné musí uvádět všechny podrobnosti postupu, které nejsou upřesněny v metodě analýzy, nebo volitelné podrobnosti a všechny okolnosti, které by mohly ovlivnit výsledky. Zpráva o analýze obsahuje všechny informace umožňující úplnou identifikaci vzorku.

II. ODBĚR VZORKU TEPELNĚ OŠETŘENÉHO MLÉKA

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční metodu pro odběr vzorků, přepravu a uchování vzorků tepelně ošetřeného mléka.

2. OBECNĚ

Odběr vzorků tepelně ošetřeného mléka (obsaženého v cisternách) provedou pověření zaměstnanci, kteří byli před odběrem vzorků vhodně vyškoleni.

Pokud to příslušné orgány nebo analytická laboratoř považují za nezbytné, vyškolí zaměstnance pověřené odběrem vzorků v metodách odběrů, aby bylo jisté, že odebrané vzorky budou reprezentativní a v souladu s celou šarží.

Pokud to příslušné orgány nebo analytická laboratoř považují za nezbytné, vyškolí zaměstnance pověřené odběrem vzorků v označování vzorků, aby identifikace vzorků byla jednoznačná.

3. VYBAVENÍ PRO ODBĚR VZORKŮ

3.1. **Obecné údaje**

Vybavení pro odběr vzorků musí být nejen zhotoveno z nerezové oceli nebo z jiného vhodného, dostatečně odolného materiálu, ale musí být vyrobeno s ohledem na předpokládané použití (promíchání, odběr vzorků, atd.). Plunžry a míchadla pro míchání kapalin v nádobách musí mít dostatečně velkou plochu povrchu, aby bylo zajištěno dostatečné promíchání výrobku bez vzniku žluklé chuti. Naběračky musí být opatřeny pevnou, dostatečně dlouhou rukojetí k nabírání vzorků z jakékoli hloubky nádoby. Objem naběračky musí být alespoň 50 ml.

Vzorkovnice a víčka musí být skleněná, kovová nebo z vhodného plastu.

Materiály použité při výrobě vybavení pro odběr vzorků (včetně nádob a víček) nesmí způsobit takovou změnu vzorku, která by ovlivnila výsledky analýz. Vlastní materiál a nádoby na vzorky musí mít čistý, suchý, hladký povrch bez trhlin a musí mít zakulacené hrany.

4. TECHNIKA ODBĚRU VZORKŮ

4.1. **Obecné údaje**

Bez ohledu na analýzu, která má být provedena, mléko musí být před odběrem důkladně promícháno buď ručně nebo mechanicky.

Vzorek musí být odebrán ihned po promíchání, když je mléko ještě v pohybu.

Objem vzorku musí odpovídat potřebám analýzy. Objem použitých nádob musí být takový, aby byly tyto nádoby téměř naplněny vzorkem a při tom bylo možné dobře promíchat obsah před analýzou, aniž by však hrozilo nebezpečí stloukání másla během přepravy.

4.2. **Ruční odběr vzorků**

4.2.1. *Odběr vzorků z rozdělené šarže*

Když je množství mléka, u něhož se má provést odběr vzorků, rozděleno do více nádob, z každé nádoby se odebere reprezentativní množství, přičemž se zaznamená množství mléka pro každý vzorek. Pokud vzorky z každé nádoby nemusí být odděleně analyzovány, smíchají se jednotlivé dávky těchto reprezentativních množství v poměru k množství, které se nachází v nádobě, ze které byl každý ze vzorků odebrán. Po promíchání se odebere jeden (nebo více) vzorek (vzorků) z těchto poměrných množstvích.

4.2.2. *Odběr z velkých nádob – skladovací nádrže, cisternové kamiony, cisternové vagóny*

4.2.2.1. Před odběrem vzorků se mléko důkladně promíchá.

K promíchání obsahu velkých nádob, skladovacích nádrží, cisternových kamionů nebo cisternových vagónů se doporučuje mechanické promíchání (4.2.2.2).

Délka promíchání závisí na době, po kterou bylo mléko v klidu. Musí být prokázáno, že postup promíchání použitý v každém z jednotlivých případů je vhodný pro potřeby plánované analýzy. Účinnost promíchání značně ovlivňuje shodu výsledků analýz provedených na vzorcích odebraných buď z různých částí šarže, nebo v pravidelných intervalech při vyprazdňování mléka z nádob. Způsob promíchání mléka (syrového mléka nebo plnotučného mléka) je účinný, pokud je rozdíl obsahu tuku u obou vzorků odebraných za těchto podmínek menší než 0,1 %.

Ve velké nádobě s vypouštěcím otvorem ve spodní části může v místě vypouštění zůstat malé množství mléka, které ani po promíchání není reprezentativní pro celý obsah. Proto se upřednostňuje odběr vzorků z průlezového otvoru. V případě odběru vzorků z vypouštěcího otvoru je třeba nechat vytéci dostatečné množství mléka, aby byla zajištěna reprezentativnost vzorků.

4.2.2.2. Promíchání obsahu velkých nádob nebo skladovacích nádrží, cisternových kamionů a cisternových vagónů je možné provést:

— mechanickou míchačkou zabudovanou do nádoby a poháněnou elektrickým motorem,

— vrtulí nebo míchačkou poháněnou elektrickým motorem a umístěnou v průlezovém otvoru; míchačka je ponořena v mléce,

— v případě cisternových kamionů nebo cisternových vagónů recyklací mléka v ohebné přepravní hadici, která je napojena na pumpu a zavedena do průlezového otvoru,

— filtrovaným, stlačeným a čistým vzduchem. Použije se minimální tlak a objem vzduchu, aby se zabránilo vniku žluklé chuti.

4.3. **Odběr vzorků tepelně ošetřeného mléka určeného k přímé lidské spotřebě a upraveného v maloobchodních baleních**

Pokud jde o tepelně ošetřené mléko určené k přímé lidské spotřebě a upravené v maloobchodních baleních, vzorky se povinně skládají z nepoškozených, zapečetěných nádob. Vzorky musí být odebrány během obchodní úpravy nebo z chladírenské místnosti zařízení pro ošetření, a to, pokud je to možné, ihned po zpracování (v případě pasterovaného mléka v den pasterace).

Z každého druhu tepelně ošetřeného mléka (pasterovaného, ošetřeného metodou UHT a sterilizovaného) se odebere takový počet vzorků, aby odpovídal počtu analýz, které mají být provedeny, a to podle pokynů poskytnutých analytickou laboratoří nebo podle pokynů jiného příslušného orgánu.

5. IDENTIFIKACE VZORKU

Vzorek by měl být označen identifikačním kódem, který umožňuje jeho rychlou identifikaci podle pokynů analytických laboratoří nebo příslušného orgánu.

6. OŠETŘENÍ, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

Se souhlasem příslušného vnitrostátního orgánu připraví analytická laboratoř pokyny týkající se lhůty a podmínek ošetření (chemického nebo tepelného), přepravy a skladování, které mají být dodrženy v době mezi odběrem vzorků jejich analýzou, a to na základě druhu mléka a analýzy, která má být použita.

Pokyny stanoví toto:

— během přepravy a skladování je třeba dbát na to, aby vzorky nebyly vystaveny nežádoucímu zápachu a přímému slunečnímu světlu. Je-li je nádoba použitá pro vzorek průsvitná, musí být skladován ve tmě.

PŘÍLOHA II

I. STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční metodu pro stanovení obsahu sušiny v mléce.

2. DEFINICE

„Sušina“: množství vyjádřené v hmotnostních procentech, které zůstane po níže popsaném sušení.

3. PRINCIP

Odpaření vody ze zkušební dávky v sušičce při teplotě 102 ± 2 °C.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY ZE SKLA

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

4.1. **Analytické váhy**

4.2. **Exsikátor**, obsahující účinné vysoušecí činidlo (např. čerstvě vysušený silikagel s indikátorem vlhkosti).

4.3. **Sušárna**, odvětraná, řízená termostatem, fungující při teplotě 102 ± 2 °C v celém pracovním prostoru.

4.4. **Misky s plochým dnem** o výšce 20–25 mm a průměru 50–75 mm, z vhodného materiálu, opatřené dobře těsnícími a snadno odnímatelnými víky.

4.5. **Vroucí vodní lázeň**

4.6. **Homogenizátor**

5. PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍHO VZORKU

Vzorek mléka se zahřeje na teplotu 20 až 25 °C. Řádně se promíchá, aby bylo zajištěno homogenní rozmístění tuku ve vzorku. Je třeba vyhnout se příliš intenzivnímu protřepání, aby se zabránilo tvorbě pěny v mléce nebo stloukání tuku. Pokud je obtížné rozptýlit vrstvu smetany, vzorek se pozvolna a za pečlivého míchání zahřeje na teplotu 35 až 40 °C, aby se vmísila i smetana, která přilnula na stěny nádoby. Poté se vzorek rychle zchladí na teplotu 20 až 25 °C.

Pro usnadnění rozptýlení tuku může být případně použit homogenizátor.

Nelze očekávat správné výsledky, pokud vzorek obsahuje viditelný tekutý tuk nebo viditelné bílé částice nepravidelného tvaru, přilnuté ke stěnám nádoby.

6. POSTUP

6.1. **Příprava misky**

Miska (4.4) s víčkem položeným vedle se zahřívá v sušárně (4.3) při teplotě 102 ± 2 °C po dobu nejméně 30 minut. Poté se víčko položí na misku a miska se ihned umístí do exsikátoru (4.2). Nechá se zchladit na pokojovou teplotu (nejméně po dobu 30 minut) a zváží se s přesností na 0,1 mg.

6.2. **Zkušební vzorek**

V připravené misce (6.1) se rychle zváží 3–5 gramů zkušebního vzorku (5) s přesností na 0,1 mg.

6.3. **Stanovení**

6.3.1. Miska se předběžně vysušuje umístěním na vroucí vodní lázeň (4.5) po dobu 30 minut.

6.3.2. Miska s víčkem položeným vedle se zahřívá v sušárně (4.3) při teplotě 102 ± 2 °C po dobu 2 hodin. Poté se víčko položí na misku a miska se vyjme ze sušárny.

6.3.3. Miska s víčkem se nechá zchladit v exsikátoru (4.2) na pokojovou teplotu (nejméně po dobu 30 minut) a zváží se s přesností na 0,1 mg.

6.3.4. Miska s víčkem položeným vedle se znovu umístí na 1 hodinu do sušárny. Poté se přikryje víčkem a vyjme se ze sušárny. Nechá se zchladit v exsikátoru přibližně 30 minut a zváží se s přesností na 0,1 mg.

6.3.5. Postup popsaný v bodu 6.3.4 se opakuje tak dlouho, dokud rozdíl hmotností dvou po sobě následujících vážení nepřesáhne 0,5 mg. Nejnižší hmotnost se zaznamená.

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

7.1. **Způsob výpočtu a vzorec**

Obsah sušiny v hmotnostních procentech se vypočítá pomocí tohoto vzorce:

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

kde:

W_T = sušina v gramech na 100 g

m_0 = hmotnost misky a víčka v gramech (6.1)

m_1 = hmotnost misky, víčka a zkušebního vzorku v gramech (6.2)

m_2 = hmotnost misky, víčka a zkušebního vzorku po vysušení v gramech (6.3.5).

Výsledek se zaokrouhluje na 0,01 % (hmotnostní procento).

7.2. **Spolehlivost**

7.2.1. *Opakovatelnost (r)*: 0,10 g sušiny na 100 g výrobku.

7.2.2. *Reprodukovatelnost (R)*: 0,20 g sušiny na 100 g výrobku.

II. **STANOVENÍ OBSAHU TUKU**

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční metodu pro stanovení obsahu tuku v plnotučném mléce, částečně odstředěném mléce a odstředěném mléce.

2. DEFINICE

„Obsah tuku v mléce“: všechny látky stanovené zvláštním postupem. Vyjadřuje se v hmotnostních procentech.

3. PRINCIP

Amoniakálně-ethanolový roztok se extrahuje diethyletherem a petroletherem, rozpouštědla jsou odstraněna destilací nebo vypařením a stanoví se hmotnost extrahovaných látek rozpustných v petroletheru (metoda běžně známá pod názvem Rose-Gottlieb).

4. ČINIDLA

Všechna činidla musí mít čistotu p. a. a při pokusu naslepo nesmí zanechávat žádná prokazatelná rezidua.

K ověření jakosti činidel se provádí pokus naslepo podle bodu 6.3. K vážení se používá baňka, pohárek nebo prázdná kovová miska (5.8), které jsou připraveny jako tára podle bodu 6.4 (aby se mohl upravovat vliv změněných atmosférických podmínek na výslednou hmotnost). Pokud je celkové reziduum, upravené na základě nápadných změn hmotnosti táry, vyšší než 2,5 mg, stanoví se reziduum rozpouštědel odpařením 100 ml diethyletheru (4.4) a 100 ml petroletheru (4.5). K vážení se rovněž použije tára. Když je reziduum vyšší než 2,5 mg, rozpouštědlo se vyčistí destilací nebo se nahradí.

4.1. **Hydroxid amonný**: roztok obsahující přibližně 25 % (hmotnost/hmotnost) NH_3. Může se rovněž použít koncentrovanější roztok hydroxidu amonného (6.5.1 a A.1.5.1).

4.2. **Ethanol**, nejméně 94 % (objem/objem). Může se použít i ethanol denaturovaný methanolem, pokud je jisté, že nebude ovlivněn výsledek testu.

4.3. **Kongočerveň nebo kresolčerveň**

1 g kongočerveně nebo kresolčerveně se rozpustí ve vodě a naředí se ve 100 ml.

Poznámka: Použití tohoto roztoku, který umožňuje jednoznačněji určit rozhraní mezi rozpouštědlem a vodnou vrstvou, je volitelné (6.5.2). Pokud se nezmění výsledek, mohou být použity i jiné vodné roztoky barviv.

4.4. **Diethylether** neobsahující peroxidy a více než 2 mg/kg antioxydantů a splňující požadavky pokusu naslepo (6.3).

4.5. **Petrolether** s bodem varu v rozmezí 30 až 60 °C.

4.6. **Směs rozpouštědel** připravená krátce před použitím smícháním stejných objemů diethyletheru (4.4) a petroletheru (4.5).

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY ZE SKLA

Upozornění:
Vzhledem k tomu, že při stanovení se používají těkavá hořlavá rozpouštědla, používané elektrické přístroje musí vyhovovat právním předpisům pro tato rozpouštědla.

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

5.1. Analytické váhy

5.2. **Odstředivka**, ve které mohou být baňky nebo extrakční zkumavky (5.6) odstřeďovány při rotační rychlosti 500 až 600 ot./min^{-1} takovým způsobem, aby na vnějším okraji použitých baněk nebo zkumavek vzniklo gravitační pole 80 až 90 g.

*Poznámka: Použití odst*ředivky je volitelné (6.5.5).

5.3. **Destilační nebo odpařovací přístroj** umožňující destilovat rozpouštědla a ethanol z baněk nebo je odpařovat z kádinek a misek (6.5.12 a 6.5.15) při teplotě do 100 °C.

5.4. **Sušárna,** elektricky vyhřívaná, vybavená zcela otevřenými ventilačními otvory, v jejímž užitkovém prostoru lze nastavit teplotu od 102 ± 2 °C. Sušárna musí být vybavena vhodným teploměrem.

5.5. **Vodní lázeň** s teplotou nastavitelnou na 35–40 °C.

5.6. **Extrakční baňky na tuk, typ Mojonnier**

Poznámka: Je možné rovněž použít extrakční zkumavky na tuk se sifonem nebo zařízením na umývání lahví, jejichž odlišné použití je v tomto případě popsáno v příloze.

Baňky nebo zkumavky musí být opatřeny skleněnou zábrusovou zátkou, nebo korkovou zátkou dobré jakosti nebo zátkou z jiného materiálu, který se působením činidel nemění. Korkové zátky musí být omyty diethyletherem (4.4) a namočeny na 15 minut ve vodě teplé nejméně 60 °C, a potom ochlazeny ve vodě tak, aby byly v okamžiku použití impregnovány.

5.7. **Stojánek** na extrakční baňky nebo zkumavky (5.6).

5.8. **Promývací láhev** vhodná pro použitou směs rozpouštědel (4.6). Plastová promývací láhev by se neměla používat.

5.9. **Nádoby na sběr tuku**, například varné baňky s plochým dnem nebo Erlenmeyerovy baňky o obsahu 125–250 ml nebo kovové misky. Když se používají kovové misky, musí být přednostně použity misky z nerezové oceli, s plochým dnem, s hubičkou, o průměru 80–100 mm a o výšce přibližně 50 mm.

5.10. **Varná tělíska**, bez tuku, z neporézního porcelánu, z karbidu křemíku nebo ve formě skleněných kuliček (jejich použití je u kovových odpařovacích misek volitelné).

5.11. **Odměrný válec** o obsahu 5 a 25 ml.

5.12. **Kalibrované pipety** o obsahu 10 ml.

5.13. **Kovové kleště** k držení baněk, kádinek nebo misek.

6. POSTUP

Poznámka: Jiný postup za použití extrakčních zkumavek na tuk se sifonem nebo zařízením na umývání lahví (viz poznámku v bodu 5.6) je popsán v příloze.

6.1. **Příprava zkušebního vzorku**

Vzorek se zahřívá na teplotu přibližně 35 až 40 °C po dobu 15 minut, případně se použije vodní lázeň (5.5). Vzorek se důkladně a pomalu promíchá tak, že se několikrát otočí s nádobou, aniž by se vytvořila pěna nebo stlouklo máslo; poté se vzorek rychle zchladí přibližně na 20 °C.

6.2. **Zkušební dávka**

Zkušební vzorek se promíchá (6.1) opatrným otáčením nádoby třikrát nebo čtyřikrát, poté se vzorek ihned zváží s přesností na 1 mg. 10–11 gramů vzorku se přímo nebo po částech přemístí do extrakční baňky (5.6).

Zkušební dávka se musí celá umístit do spodní úzké části extrakční baňky.

6.3. **Pokus naslepo**

Pokus naslepo se provádí současně s vlastním stanovením, a to stejným postupem a se stejnými činidly, ale zkušební dávka se nahradí 10–11 ml vody.

Nápadná změna hmotnosti nádoby na sběr tuku korigovaná nápadnou změnou hmotnosti kontrolní nádoby nesmí být vyšší než 2,5 mg.

6.4. **Příprava nádoby na sběr tuku**

Nádoba (5.9) obsahující několik varných tělísek (5.10), která umožňují mírný, jednu hodinu trvající var v průběhu posledního odstranění rozpouštědla v sušárně (5.4), se vysuší. Nádoba se nechá zchladit (ne v exsikátoru, ale v bezprašném prostředí) na teplotu váhovny (skleněné nádoby alespoň jednu hodinu, kovové misky alespoň 30 minut). Pomocí kleští (zejména proto, aby se zabránilo odchylkám v teplotě) se nádoba umístí na váhy a zváží se s přesností na 0,1 mg.

6.5. **Stanovení**

6.5.1. Přidá se 2 ml roztoku hydroxidu amonného (4.1) nebo stejný objem koncentrovanějšího roztoku a řádně se promíchají se zkušební dávkou v úzké části baňky. Po přidání hydroxidu amonného se ihned provede stanovení.

6.5.2. Přidá se 10 ml ethanolu (4.2) a pomalu, ale důkladně se promíchá tak, aby se obsah přeléval z jedné části baňky do druhé. Případně se přidají dvě kapky roztoku kongočerveně nebo kresolčerveně (4.3).

6.5.3. Přidá se 25 ml diethyletheru (4.4), baňka se uzavře korkovou zátkou nasycenou vodou nebo navlhčenou zátkou (5.6). Baňka se řádně, ale ne příliš protřepává (aby se nevytvořila trvalá emulze) po dobu 1 minuty v horizontální poloze, přičemž úzká část baňky směřuje nahoru. Občas se nechá kapalina ze široké části baňky přelít do úzké části baňky. Pokud je to nutné, baňka se zchladí pod tekoucí vodou, potom se pomalu odejme korková zátka nebo jiný uzávěr, opláchne se stejně jako hrdlo baňky malým množstvím směsi rozpouštědel (4.6) a za pomoci promývací láhve (5.8) tak, aby oplachovací kapalina natekla do baňky.

6.5.4. Přidá se 25 ml petroletheru (4.5), baňka se potom uzavře znovu navlhčenou korkovou zátkou (nové zvlhčení se provede namočením do vody), nebo se uzavře jiným uzávěrem. Baňka se po dobu 30 vteřin lehce protřepává, a to podle popisu v bodu 6.5.3.

6.5.5. Uzavřená baňka se odstřeďuje 1 až 5 minut při rotační rychlosti 500–600 ot./min^{-1} (5.2). Když není k dispozici odstředivka (viz poznámku v bodu 5.2.), uzavřená baňka se nechá stát ve stojánku (5.7) nejméně 30 minut, dokud se vrstva supernatantu neprojasní a zcela se neoddělí od vodné vrstvy. Pokud je to nutné, baňka se zchladí pod tekoucí vodou.

6.5.6. Opatrně se odejme korková zátka nebo jiný uzávěr, opláchne se stejně jako vnitřek hrdla baňky malým množstvím směsi rozpouštědel (4.6) tak, aby oplachovací kapalina natekla do baňky.

Když je přechod vrstev pod základem hrdla baňky, hladina se zvýší tak, že se po stěně baňky pomalu přilévá voda, aby se usnadnila dekantace rozpouštědla.

6.5.7. Extrakční baňka se uchopí za úzkou část a s největší možnou opatrností se dekantuje vrstva supernatantu do připravené nádoby na sběr tuku (6.4) a která v případě, že se jedná o baňky (volitelně s kovovými miskami), obsahuje několik varných tělísek (5.10). Přitom nesmí dojít k dekantaci jakékoliv části vodné vrstvy.

6.5.8. Vnějšek hrdla extrakční baňky se opláchne malým množstvím směsi rozpouštědel (4.6) a oplachovací kapalina se shromáždí do nádoby na sběr tuku. Dbá se o to, aby směs rozpouštědel nepřetekla přes vnější stranu extrakční baňky.

Rozpouštědlo může být případně částečně nebo zcela odstraněno z nádoby destilací nebo odpařováním, jak je popsáno v bodu 6.5.12.

6.5.9. K obsahu extrakční baňky se přidá 5 ml ethanolu (4.2). Použije se ethanol, kterým se oplachuje vnitřek hrdla baňky, a promíchá se tak, jak je popsáno v bodu 6.5.2.

6.5.10. Provede se druhá extrakce a zopakují se při tom operace popsané v bodech 6.5.3 až 6.5.8. Ale použije se pouze 15 ml diethyletheru (4.4) a 15 ml petroletheru (4.5); k opláchnutí vnitřku hrdla extrakční baňky se použije diethylether. Pokud je to nutné, zvedne se přechod vrstev doprostřed hrdla baňky, aby byla konečná dekantace rozpouštědel co nejúplnější.

6.5.11. Provede se třetí extrakce a znovu se zopakují operace popsané v bodech 6.5.3 až 6.5.8. Ale použijese pouze 15 ml diethyletheru (4.4) a 15 ml petroletheru (4.5); k opláchnutí vnitřku hrdla extrakční baňky se použije diethylether. Pokud je to nutné, zvedne se přechod vrstev doprostřed hrdla baňky, aby byla konečná dekantace rozpouštědel co nejúplnější.

V případě odstředěného mléka se třetí extrakce nemusí provádět.

6.5.12. Rozpouštědla (včetně ethanolu) se odstraní, pokud možno beze zbytků, z baňky destilací a z kádinky nebo misky (5.3) odpařováním, přičemž se před začátkem destilace opláchne vnitřek hrdla baňky malým množstvím směsi rozpouštědel (4.6).

6.5.13. Nádoba na sběr tuku se zahřívá (baňka se nakloní, aby se umožnilo unikání par rozpouštědel) 1 hodinu v sušárně (5.4). Potom se nádoba na sběr tuku ze sušárny vyjme, nechá se zchladnout (ne v exsikátoru, ale v bezprašném prostředí) na teplotu váhovny (skleněné nádoby alespoň jednu hodinu, kovové misky alespoň 30 minut) zváží se s přesností na 0,1 mg.

Těsně před vážením se nádoba neosušuje. Pomocí kleští se nádoba umístí na váhy, aby se zabránilo zejména změnám teploty.

6.5.14. Operace popsané v bodu 6.5.13 se opakují, dokud se hmotnost nádoby na sběr tuku nesníží nebo nezvýší mezi dvěma po sobě následujícími váženími o nejméně 0,5 mg. Nejnižší hmotnost se zaznamená jako hmotnost nádoby na sběr tuku a extrahovaných látek.

6.5.15. Do extrakční nádoby na tuku se přidá 25 ml petroletheru, aby se ověřilo, zda je vyextrahovaný materiál zcela rozpustný. Rozpouštědlo se lehce zahřívá a protřepává rotačními pohyby, dokud se všechen tuk nerozpustí.

Pokud je vyextrahovaný materiál v petroletheru zcela rozpustný, se hmotnost tuku se zaznamená jako rozdíl mezi konečnou hmotností baňky s extraktem (6.5.14) a počáteční hmotností (6.4).

6.5.16. Pokud vyextrahovaný materiál není v petroletheru zcela rozpustný nebo pokud existují pochybnost, tuk z nádoby se zcela vyextrahuje opakovaným promýváním teplým petroletherem.

Nerozpuštěné látky se nechají usadit a petrolether se pomalu dekantuje, aniž by s sebou odnesl nerozpuštěné látky. Tato operace se opakuje třikrát, přičemž se použije petrolether, kterým se oplachuje vnitřek hrdla nádoby.

Nakonec se vnější vrchol nádoby opláchne směsí rozpouštědel tak, aby se rozpouštědlo nedostalo na vnější část nádoby. Páry z petroletheru se odstraní jednohodinovým zahříváním nádoby v sušárně. Potom se nádoba nechá zchladnout a váží se, jak je popsáno v bodech 6.5.13 a 6.5.14.

Hmotnost tuku je dána jako rozdíl mezi hmotností stanovenou v bodu 6.5.14 a touto konečnou hmotností.

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

7.1. **Výpočet a vzorec**

Obsah tuku v hmotnostních procentech se vypočítá pomocí tohoto vzorce:

$$F = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100$$

kde:

F = obsah tuku

m_0 = hmotnost zkušebního vzorku v gramech (6.2)

m_1 = hmotnost, v gramech, nádoby na sběr tuku a extrahovaných látek stanovená v bodu 6.5.14

m_2 = hmotnost, v gramech, nádoby na sběr tuku, nebo v případě nerozpustných látek, nádoby na sběr tuku a nerozpustného zbytku, stanoveného v bodu 6.5.16

m_3 = hmotnost, v gramech, nádoby na sběr tuku použité k pokusu naslepo (6.3) a hmotnost extrahovaných látek stanovená v bodu 6.5.14

m_4 = hmotnost, v gramech, nádoby na sběr tuku (6.4) použité k pokusu naslepo (6.3) nebo, v případě nerozpuštěných látek, hmotnost nádoby na sběr tuku a nerozpustného zbytku stanovená v bodu 6.5.16.

Výsledek se zaokrouhluje na 0,01 %.

7.2. **Spolehlivost**

7.2.1. *Opakovatelnost (r)*:

— u plnotučného mléka a částečně odstředěného mléka: 0,02 g tuku na 100 g výrobku,

— u odstředěného mléka: 0,01 g tuku na 100 g výrobku.

7.2.2. *Reprodukovatelnost (R)*:

— u plnotučného mléka: 0,04 g tuku na 100 g výrobku,

— u částečně odstředěného mléka: 0,03 g tuku na 100 g výrobku,

— u odstředěného mléka: 0,025 g tuku na 100 g výrobku.

III. STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU TUKUPROSTÉ SUŠINY

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční metodu pro stanovení celkové obsahu tukuprosté sušiny v tepelně ošetřeném mléce.

2. DEFINICE A VÝPOČET

Celkový obsah tukuprosté sušiny se vyjadřuje v hmotnostních procentech.

Představuje rozdíl mezi celkovým obsahem sušiny (kapitola I) a obsahem tuku (kapitola II).

IV. STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU DUSÍKU V MLÉCE

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční metodu pro stanovení celkového obsahu dusíku v plnotučném mléce, v částečně odstředěném mléce a v odstředěném mléce.

2. DEFINICE

Celkovým obsahem dusíku v mléce se rozumí obsah dusíku vyjádřený v hmotnostních procentech, získaný pomocí Kjeldahlovy metody.

3. PRINCIP

Zvážené množství vzorku mléka se mineralizuje pomocí koncentrované kyseliny sírové a síranu draselného, za přítomnosti síranu měďnatého (II), který působí jako katalyzátor, s cílem přeměnit dusík organických sloučenin na síran amonný. Amoniak uvolněný přidání hydroxidu sodného je destilován a absorbován roztokem kyseliny borité. Tento roztok je potom titrován roztokem kyseliny.

4. ČINIDLA

4.1. **Síran draselný** (K_2SO_4)

4.2. **Roztok síranu měďnatého.** Ve vodě se rozpustí 5,0 g síranu měďnatého (II) pentahydrátu ($CuSO_4$, $5H_2O$) a doplní se na 100 ml (ve 20 °C) v odměrné baňce.

4.3. **Kyselina sírová**, alespoň 98,0 % (hmotnost/hmotnost), H_2SO_4.

4.4. **Roztok hydroxidu sodného**, 47 % (hmotnost/hmotnost) 704 g NaOH/1 (ve 20 °C).

Poznámka: Je rovněž možné použít méně koncentrovaný roztok hydroxidu sodného, například 40 % (hmotnost/hmotnost) 572 g/1,20 °C, nebo 30 % (hmotnost/hmotnost) 399 g/1, 20 °C.

4.5. **Roztok kyseliny borité.** v jednom litru teplé vody se rozpustí 40 g kyseliny borité (H_3BO_3), nechá se zchladnout a uchová se v láhvi z borosilikátového skla.

4.6. **Roztok Indikátoru.** Ve 100 ml ethanolu se rozpustí 0,01 g methylčerveně, 0,02 g bromthymoloví modři a 0,06 g bromkresolové zeleně. Roztok se uchová v uzavřené hnědé láhvi na chladném a tmavém místě.

4.7. Odměrný roztok

C (1/2 H_2SO_4) nebo c (HCl) = 0,05 mol/1, titrované s přesností na 0,0001 mol/1.

4.8. **Sacharóza bez dusíkatých sloučenin**

4.9. **Amonná sůl,** čistá**,** jako ammonium $(NH_4)_2C_2O_4$. H_2O, nebo síran amonný $(NH_4)_2SO_4$.

4.10. **Tryptofan** ($C_{11}H_{12}N_2O_2$), phenacetin ($C_{10}H_7CH_2CONH_2$), nebo lysin mono- nebo dichlorhydrochlorid ($C_6H_{14}N_2O_2$. HCl, nebo $C_6H_{14}N_2O_2$.2HCl).

Poznámka: *Stupeň* čistoty činidel uvedených v bodech 4.9 a 4.10 by měl být vyšší než analytická jakost. Pro bod 4.9 se, pokud je to možné, použije osvědčený roztok amonných solí.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY ZE SKLA

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

5.1. **Kjdehlovy baňky** o objemu 500 ml.

5.2. **Regulátory varu**, například skleněné kuličky o průměru přibližně 5 mm, Hengarovy granule, pemza.

5.3. **Byreta nebo automatická pipeta** k odměření 1,0 ml.

5.4. **Skleněné odměrné válce** o objemu 50, 100 a 250 ml.

5.5. **Kjedahlova aparatura** (5.1) v nakloněné poloze (přibližně 45 °), s elektrickým topením nebo nastavitelným plynovým hořákem, aby obsah baňky nestoupal výše než do třetiny hrdla, a se zařízením na odsávání výparů.

5.6. **Destilační přístroj** z borosiličitého skla, ke kterému může být připojena Kjeldahlova baňka (5.1), skládající se z účinné přikapávací nálevky připojené k účinnému chladiči s rovnou vnitřní trubicí, který je na spodním konci připojen na výstupní trubici. Spojovací trubice a uzávěr (uzávěry) musí těsnit a přednostně by měl (měly) být z neoprénu.

5.7. **Pipeta nebo automatická pipeta** k odměření 0,10 ml.

5.8. **Erlenmeyerovy baňky** o objemu 500 ml, s dělením na 200 ml.

5.9. **Byreta** o objemu 50 ml, s dělením 0,1 ml, s maximální chybou ± 0,05 ml.

5.10. **Zvětšovací lupa** pro přesný odečet z byrety (5.9).

5.11. **pH-metr**.

5.12. **Automatická byreta**.

6. POSTUP

6.1. Do Kjeldahlovy baňky (5.1) se postupně vkládají regulátory varu (5.2) (například 3 skleněné kuličky), 15 g síranu draselného (4.1), 1,0 ml roztoku síranu měďnatého (4.2), přibližně 5 g mléka (váženého s přesností na 0,001 g) a 25 ml kyseliny sírové (4.3). Ke spláchnutí zbytků roztoku síranu měďnatého, síranu draselného nebo mléka ulpívajících na hrdle baňky se použije kyselina a obsah baňky se promíchá.

Poznámka: *Vzhledem k tomu, že organické látky absorbují* při varu kyselinu sírovou, doporučuje se používat pro Kjehdalovu metodu 30 a ne 25 ml H2SO4 (4.3), pokud mléko obsahuje více než 5,0 % (hmotnost/hmotnost) tuku. To samé platí i pro pokus naslepo.

6.2. Každá Kjeldahlova baňka se na začátku velmi opatrně zahřeje pomocí Kjedahlovy aparatury (5.5) tak, aby veškerá černá pěna zůstala v baňce. Když počáteční pěna zmizí a je vystřídána intenzivními bílými párami, obsah baňky se uvede do intenzivního varu (kyselé páry se kondenzují v půli cesty směrem k hrdlu baňky), dokud černé částice zcela nezmizí a dokud se obsah baňky nestane průzračný a nezíská světlou modrozelenou barvu. Poté se pokračuje v mírně intenzívním varu po dobu nejméně 1,5 hodiny. Je třeba dodržovat tyto požadavky:

a) doba projasňování nesmí přesáhnout 1 hodinu a celková doba mineralizace nesmí být kratší než dvě a půl hodiny. Pokud je doba potřebná pro projasnění delší než jedna hodina, musí být v důsledku toho prodloužena doba mineralizace;

b) síran draselný usnadňuje mineralizaci vzhledem k tomu, že zvyšuje teplotu varu směsi. Pokud je objem zbytku H2SO4 na konci doby pro mineralizaci menší než přibližně 15 ml, mohlo by dojít ke ztrátě dusíku v důsledku nadměrného zahřívání. V případě zahřívání plynem se použije deska z izolačního materiálu a s kruhovým otvorem o takovém průměru, který nedocházelo ke styku volného plamene s částí baňky, která leží pod povrchem kapalného obsahu (5.5);

c) pokud černé částice proniknou do hrdla baňky a nejsou v průběhu počáteční fáze intenzivního varu smyty zpět dovnitř baňky proudící kyselinou (zpětné proudění se může usnadnit otáčením baňky), baňka se nechá dostatečně zchladit a částice se pomalu spláchnou minimálním množstvím vody. Poté se pokračuje v mineralizaci podle výše uvedeného popisu.

6.3. Po zchlazení Kjeldahlovy baňky se přidá do každé nádoby 300 ml vody (viz poznámku) tak, aby se smyly všechny částice ulpívající na hrdle baňky. Obsah se pečlivě promíchá, dokud nedojde k rozpuštění jednotlivých krystalů. Pro získání rovnoměrného varu se přidá několik regulátorů varu (5.2). Poté se do každé baňky přidá 70 ml roztoku hydroxidu sodného (4.4) (viz poznámku), přičemž je baňka nakloněná tak, aby roztok hydroxidu sodného vytvořil v baňce spodní vrstvu. Uvedený roztok by neměl potřísnit horní část hrdla.

Poznámka: Kombinovaný objem vody a hydroxidu sodného musí být 370 ml, aby bylo možné získat přibližně 150 ml destilátu předtím, než dojde uvnitř baňky k probublávání (6.4). Pokud se přidá větší množství roztoku hydroxidu sodného koncentrovaného na méně než 47 % (hmotnost/hmotnost), objem přidané vody musí být poměr snížen. Pokud se tedy přidá 85 ml 40 % roztoku (hmotnost/hmotnost) nebo 125 ml 30 % roztoku (hmotnost/hmotnost), příslušný objem přidané vody musí být 282 ml, respektive 245 ml.

6.4. Každá Kjeldahlova baňka ihned připojí k destilačnímu přístroji (5.6). Dbá se na to, aby byl konec trubice chladiče ponořen do 50 ml roztoku kyseliny borité (4.5) a 0,20 ml (5 až 6 kapek) indikátoru (4.6) obsažených v Erlenmeyerově baňce. Obsah každé Kjeldahlovy baňky se protřepe, aby se dobře promíchal, a přivede se do varu, nejprve na mírném plameni, aby se zabránilo nadměrnému tvoření pěny. Po získání přibližně 100 až 125 ml destilátu se každá Erlenmeyerova baňka umístí níže, aby se konec trubice chladiče nacházel přibližně 40 mm nad ryskou 200 ml. Každá destilace pokračuje až do okamžiku, kdy obsah baňky začne bublat, poté se ihned zastaví zdroj tepla. Každá Kjeldahlova baňka se odejme a konec každé výstupní trubice chladiče se opláchne malým množstvím vody. Voda použitá k opláchnutí se shromáždí v Erlenmeyerově baňce. Je třeba dodržovat tyto požadavky:

a) rychlost destilace musí být taková, aby se získalo přibližně 150 ml destilátu před začátkem probublávání, což odpovídá celkovému objemu Erlenmeyerovy baňky přibližně 200 ml;

b) účinnost každého chladiče musí být taková, aby teplota kapaliny v každé baňce nepřesáhla v průběhu destilace 25 °C.

6.5. Každý destilát se titruje odměrným roztokem (4.7) až do pH 4,6 ± 0,1, za použití pHmetru a automatické byrety. Přidání indikátoru umožňuje zkontrolovat, zda titrace probíhá správně. Údaje z každé byrety se zaznamenávají s přesností na 0,01 ml pomocí zvětšovací lupy (5.10), aby se zamezilo všem chybám paralaxy.

Titrace se může provést pouze pomocí jednoho indikátoru. Titruje se, dokud barva destilátu odpovídá barvě roztoku, který je čerstvě připravený pomocí 150 ml vody, do které se přidá 50 ml roztoku kyseliny borité a 0,20 ml indikátoru obsažených v Erlenmeyerově baňce (5.8).

6.6. Podle bodů 6.1 až 6.5 včetně se provede pokus naslepo s 5 ml destilované vody a přibližně s 0,1 g sacharózy (4.8) místo vzorku mléka.

Poznámka: K titraci destilátu při pokusu naslepo se použije pouze malé množství odměrného roztoku (4.7).

6.7. Správnost výsledků se pravidelně ověřuje pomocí dvou rekuperačních pokusů podle bodů 6.1 až 6.5.

6.7.1. K ujištění, že v průběhu destilace nedošlo k žádné ztrátě dusíku vyvolané nadměrnou teplotou nebo mechanickými ztrátami, se použije vzorek složený z 0,15 g oxalátu amonného nebo síranu amonného (4.9) zváženého s přesností na 0,001 g a 0,1 g sacharózy (4.8).

Procentuální podíl získaného dusíku musí činit 99 % až 100 %.

Nižší nebo vyšší výsledky svědčí o chybném postupu a/nebo o chybné koncentraci odměrného roztoku (4.7).

6.7.2. Rovněž se ověří, zda se postupem mineralizace může uvolnit všechen proteinový dusík, a to pomocí zkušebního vzorek složeného z 0,20 g čistého tryptofanu, 0,35 g fenacetinu, nebo 0,20 g lysinu chlorhydrátu (4.10). Vše se musí zvážit s přesností na 0,001 g. Podíl získaného dusíku musí činit nejméně 98 až 99 %.

7. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Během manipulace s koncentrovanou kyselinou sírovou, koncentrovaným hydroxidem sodným a Kjeldahlovými baňkami se musí používat laboratorní pracovní plášť, ochranné brýle a rukavice odolné proti kyselinám.

V průběhu destilace se stále kontrolují Kjeldahlovy baňky. Když dojde k příliš intenzivnímu bublání obsahu nádoby, destilace se musí z bezpečnostních důvodů okamžitě ukončit. Pokud nastane porucha systému zahřívání destilace trvající déle než 2–3 minuty, baňka se umístí níže, aby se konec chladiče vynořil z kapaliny.

8. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

8.1. **Výpočet a vzorec**

Obsah dusíku v gramech dusíku na 100 g výrobku se vypočítá podle tohoto vzorce:

$$\frac{W_N = 1{,}40\ (V - V_O)\ c}{m}$$

kde:

WN = obsah dusíku

V = objem, v ml, odměrného roztoku normalizované kyseliny, použité při stanovení

Vo = objem, v ml, odměrného roztoku normalizované kyseliny použité při pokusu na naslepo

c = koncentrace, v mol/l, odměrného roztoku normalizované kyseliny (4.7)

m = hmotnost dávky, v gramech, zkušební dávky.

Výsledek na 100 g se zaokrouhluje s přesností na 0,001 g.

8.2. **Spolehlivost**

8.2.1. *Opakovatelnost (r):* 0,007 g na 100 g

8.2.2. *Reprodukovatelnost (R):* 0,015 g na 100 g.

9. UPRAVENÝ POSTUP

9.1. Místo Kjeldahlovy aparatury podle 5.5 a Kjeldahlovy baňky podle 5.1 se použije Kjeldahlova aparatura s válcovitými nádobami V tomto případě je třeba ke zjištění případných chyb individuálně ověřit každý bod (6.7).

9.2. Místo přímého zahřívání baněk (6.4) se použije destilační přístroj na vodní páru. Pokud přístroj nedovoluje použít destilovanou vodu, je třeba se ujistit, že voda neobsahuje kyseliny nebo těkavé alkalické látky.

9.3. Místo zkušební dávky 5 g (6.1) se může použít vzorek 1 g mléka (semi-makro Kjeldahlova metoda), pokud:

— množství činidel použitých k mineralizaci (6.1): H_2SO_4, $CuSO_4$, 5 H_2O, 5 K_2SO_4 se sníží ve stejném poměru (1/5),

— celková doba mineralizace (6.2) se sníží na 75 minut,

— množství hydroxidu sodného (6.3) se sníží ve stejném poměru (1/5),

— standardní roztok kyseliny (4.7) o nižší koncentraci (0,02–0,03 mol/l).

Poznámka: Použití jedné nebo druhé z těchto možností je přijatelné pouze v případě, že opakovatelnost (8.2.1) a výsledky dvou vyšetření kontroly přesnosti (6.7) odpovídají hodnotám uvedeným v normě.

V. STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční metodu pro stanovení obsahu bílkovin tepelně ošetřeného mléka (čl. 3 část A odst. 3 směrnice 85/379/EHS).

2. DEFINICE

Obsah bílkovin: hodnota získaná vynásobením celkového obsahu dusíku, vyjádřeného v hmotnostních procentech a stanoveného metodou popsanou v kapitole IV, vhodným faktorem (3).

3. VÝPOČET

Obsah bílkovin v mléce = 6,38 x celkový obsah dusíku v mléce v procentech.

VI. STANOVENÍ OBJEMOVÉ HMOTNOSTI

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční metodu pro stanovení objemové hmotnosti při 20 °C syrového mléka, plnotučného mléka, částečně odstředěného mléka a odstředěného mléka.

2. DEFINICE

Objemová hmotnost mléka je koeficient hmotnosti určitého objemu mléka při 20 °C a hmotnost stejného objemu vody při stejné teplotě.

3. PRINCIP

Objemová hmotnost při 20 °C se stanoví areometrem.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY ZE SKLA

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

4.1. **Areometr**

Areometr pro stanovení objemové hmotnosti je přístroj, který se skládá ze skleněného plováku, jehož spodní konec je široký a těžký, a z cylindrické skleněné tyčinky přivařené k horní části plováku, s nímž má společnou osu; horní část tyčinky je uzavřená.

Skleněný plovák obsahuje zátěž (olovo, rtuť, atd.) určenou k úpravě hmotnosti areometru. Na tyčince je stupnice od 1,025 do 1,035 g/ml.

Areometr musí být zkontrolován pyknometrickou metodou, a to za použití pyknometru o objemu přibližně 100 ml, vybaveného přesným teploměrem.

4.2. **Odměrné válce** (skleněné nebo z nerezové oceli), které mají alespoň tyto rozměry:

— vnitřní průměr válce: přibližně 35 mm,

— vnitřní výška válce: přibližně 225 mm.

4.3. **Vodní lázeň** nastavená na 20 ± 0,1 °C.

4.4. **Vodní lázeň** nastavená na 40 ± 2 °C.

4.5. **Teploměr** odstupňovaný po nejméně 0,5 °C.

5. POSTUP

5.1. K rozptýlení tuku se vzorek promíchá otáčením. Vzorek se umístí do vodní lázně (4.4) a zahřeje se až na 40 °C, poté se po dobu 5 minut udržuje na této teplotě. Důkladně se postupným otáčením promíchá, aby došlo k homogennímu rozložení tuku. Poté se ve druhé vodní lázni zchladí na 20 °C (4.3).

5.2. Vzorek se opatrným otáčením řádně promíchá, aby přitom nedošlo k proniknutí vzduchu. Mléko se nalije do odměrného válce (4.2), který se udržuje v nakloněné poloze, aby se zabránilo tvorbě pěny nebo bublin. Je třeba použít dostatečné množství mléka, aby při vložení areometru (4.1) do válce došlo k vylití kapaliny. Areometr se opatrně ponoří do mléka a nechá se volně plavat, dokud nedosáhne rovnováhy. Válec se umístí do vertikální polohy. Areometr musí být umístěn doprostřed sloupce kapaliny a nesmí se dotýkat stěn válce.

5.3. Když areometr dosáhne rovnováhy, odečtení se provede v horní části menisku.

5.4. Ihned po odečtení z areometru se do vzorku vloží teploměr (4.5) a teplota se odečte s přesností na 0,5 °C. Teplota se od 20 °C nesmí lišit o více než ± 2 °C.

6. OPRAVA TEPLOTY

6.1. Pokud teplota vzorku mléka při stanovení objemové hmotnosti není přesně 20 °C, získaný výsledek musí být opraven tak, že se ke stanovené objemové hmotnosti pro každý stupeň Celsia nad 20 °C přičte 0,0002 a pro každý stupeň Celsia pod 20 °C odečte 0,0002. Tato oprava je platná pouze tehdy, pokud se teplota vzorku od 20 °C liší maximálně o 5 °C.

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Výpočet objemové hmotnosti vzorku vyjádřené v g/ml odstředěného mléka o teplotě 20 °C se provede podle tohoto vzorce:

$$\frac{1000 \times mv - MG \times mv}{1000 - \frac{MG \times mv}{0{,}92}} = \frac{0{,}92\ mv\ (1000 - MG)}{920 - MG \times mv}$$

kde:

mv = objemová hmotnost vzorku odečtená na areometru (5.4) v g/l

MG = obsah tuku ve vzorku (g/l)

0,92 = hustota tuku.

8. SPOLEHLIVOST

8.1. **Opakovatelnost (r)**: 0,0003 g/ml

8.2. **Reprodukovatelnost (R)**: 0,0015 g/ml

Dodatek

(k příloze II)

ALTERNATIVNÍ POSTUP ZA POUŽITÍ EXTRAKČNÍCH ZKUMAVEK NA TUK VYBAVENÝCH SIFONEM NEBO ZAŘÍZENÍM NA UMÝVÁNÍ LAHVÍ

A.1. **POSTUP**

A.1.1. **Příprava zkušebního vzorku**

Viz bod 6.1.

A.1.2. **Zkušební dávka**

Postupuje se podle bodu 6.2, ale použijí se extrakční zkumavky na tuk (5.6).

Zkušební vzorek musí být přemístěn, pokud možno co nejúplněji, na dno extrakční zkumavky.

A.1.3. **Pokus naslepo**

Viz bod 6.3.

A.1.4. **Příprava nádoby na sběr tuku**

Viz bod 6.4.

A.1.5. **Stanovení**

A.1.5.1. Přidá se 2 ml roztoku hydroxidu amonného (4.1) nebo stejný objem koncentrovanějšího roztoku hydroxidu amonného a rádně se promíchají s předem ošetřenou zkušební dávkou na dně zkumavky. Po přidání hydroxidu amonného se ihned provede stanovení.

A.1.5.2. Přidá se 10 ml ethanolu (4.2) a pomalu ale řádně se promíchá na dně zkumavky. Případně se přidají dvě kapky kongočerveně nebo kresolčerveně (4.3).

A.1.5.3. Přidá se 25 ml diethyletheru (4.4), zkumavka se uzavře korkovou zátkou nasycenou vodou nebo navlhčenou zátkou z jiného materiálu (5.6) a zkumavka se řádně, ale ne příliš silně protřepává (aby se nevytvořila trvalá emulze) po dobu 1 minuty. Pokud je to nutné, zkumavka se zchladí pod tekoucí vodou, potom se pomalu odejme korková zátka nebo uzávěr z jiného materiálu, opláchne se stejně jako hrdlo zkumavky malým množstvím směsi rozpouštědel (4.6)a za pomoci promývací láhve (5.8) tak, aby oplachovací kapalina natekla do zkumavky.

A.1.5.4. Přidá se 25 ml petroletheru (4.5), zkumavka se uzavře znovu navlhčenou korkovou zátkou (nové navlhčení se provede namočením do vody) nebo zátkou z jiného materiálu, zkumavka se po dobu 30 vteřin pečlivě protřepává, a to podle popisu v bodu A.1.5.3.

A.1.5.5. Uzavřená zkumavka se odstřeďuje 1 až 5 minut při rotační rychlosti 500–600 ot./min^{-1} (5.2). Pokud není k dispozici odstředivka (viz poznámka v bodu 5.2), uzavřená zkumavka se nechá stát ve stojánku nejméně 30 minut, dokud se vrstva supernatantu neprojasní a zcela se neoddělí od vodné vrstvy. Pokud je to nutné, zkumavka se zchladí pod tekoucí vodou.

A.1.5.6. Korková zátka nebo uzávěr z jiného materiálu se pomalu odejmou a opláchnou se stejně jako hrdlo zkumavky malým množstvím směsi rozpouštědel tak, aby oplachovací kapalina natekla do zkumavky.

A.1.5.7. Na zkumavku se nasadí sifon nebo zařízení na umývání lahví a dlouhá trubicová část se zavede dovnitř tak, aby se otvor nacházel přibližně 3 mm nad přechodem obou vrstev. Vnitřní trubice musí být umístěna paralelně k ose extrakční zkumavky.

Vrstva supernatantu se pomalu přelije ze zkumavky do připravené nádoby na sběr tuku (6.4), která v případě, že se jedná o baňky (volitelně s kovovými miskami), obsahuje několik varných tělísek (5.10). Přitom nesmí dojít k přelití jakékoli části vodné vrstvy. Otvor se opláchne malým množstvím směsi rozpouštědel. Oplachovací kapalina se shromáždí do nádoby na sběr tuku.

A.1.5.8. Zařízení hrdla zkumavky se uvolní, potom se lehce nadzvedne a spodní část dlouhé vnitřní trubice se opláchne malým množstvím směsi rozpouštědel. Uvedené zařízení se umístí níže, znovu se zavede do zkumavky a oplachovací kapalina se přelije do nádoby na sběr tuku.

Vnější otvor zařízení se opláchne malým množstvím směsi rozpouštědel a oplachovací kapalina se shromáždí do nádoby. Rozpouštědlo může být případně částečně nebo zcela odstraněno z nádoby destilací nebo odpařením, jak je to popsáno v bodu 6.5.12.

A.1.5.9. Uvedené zařízení se znovu uvolní z hrdla, lehce se nadzvedne a do zkumavky se přidá 5 ml ethanolu. Použije se ethanol, kterým se oplachuje vnitřní dlouhé trubice, a poté se promíchá tak, jak je to popsáno v bodu A.1.5.2.

A.1.5.10. Provede se druhá extrakce a zopakují se při tom operace popsané v bodech A.1.5.3 až A.1.5.8. Ale použije se pouze 15 ml diethyletheru (4.4) a 15 ml petroletheru (4.5). K opláchnutí dlouhé vnitřní trubice během odebírání uvedeného zařízení ze zkumavky po první extrakci se použije diethylether.

A.1.5.11. Provede se třetí extrakce a znovu se zopakují operace popsané v bodech A.1.5.3 až A.1.5.8. Použije se 15 ml diethyletheru a 15 ml petroletheru. Opláchnutí dlouhé vnitřní trubice zařízení se provede podle popisu v bodu A.1.5.10.

V případě odstředěného mléka se třetí extrakce nemusí provádět.

A.1.5.12. Postupuje se podle operací popsaných v bodech 6.5.12 až 6.5.16.