31992D0608

31.12.1992 *EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA* L 407/29

NÕUKOGU OTSUS,

14. november 1992,

millega sätestatakse otseselt inimtoiduks ettenähtud kuumtöödeldud piima analüüsi- ja kontrollmeetodid

(92/608/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE NÕUKOGU,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 5. augusti 1985. aasta direktiivi 85/397/EMÜ ühendusesisest kuumtöödeldud piimaga kauplemist mõjutavate tervishoiu- ja loomatervishoiu probleemide kohta [1] ja eriti selle artikli 11 lõiget 6,

võttes arvesse komisjoni ettepanekut,

ning arvestades, et:

nõukogu peab vastavalt direktiivi 85/397/EMÜ artikli 11 lõikele 6 sätestama artikli 11 lõikes 2 ettenähtud kontrolli üksikasjaliku korra; ametiasutuste järelvalve ja vastutuse all ning nende poolt korrapäraselt kontrollitavate ettevõtete poolt läbiviidavate kontrollide eesmärk on tagada direktiivi 85/397/EMÜ ja eelkõige selle artikli 3 punkti A alapunkti 3 nõuete järgimine;

kontrollide korra sätestamise raames tuleb kindlaks määrata ka nende rakendamisel kasutatavad meetodid;

tuleb kindlaks määrata otseselt inimtoiduks ettenähtud kuumtöödeldud piima kuivaine üldsisalduse, rasvasisalduse, rasvavaba kuivaine sisalduse, lämmastiku kogusisalduse, valkude sisalduse ning tiheduse määramise meetod;

tehnilistel põhjustel on esmaseks nõudeks kehtestada analüüsi ja kontrolli standardmeetodid, et tagada direktiivi 85/397/EMÜ artikli 3 punkti A alapunktis 3 kirjeldatud standardite järgmine; eriti oluline on uurida tingimusi, mille alusel analüüsi ja kontrolli standardmeetodeid kasutatakse; kuni uurimise tulemuste saamiseni peavad pädevad asutused tagama nimetatud standardite järgmiseks standardmeetodite kasutamise;

eespool nimetatud meetodite määramine hõlmab tulemuste ühtse tõlgendamise tagamiseks eelkõige analüüside määramist ja usaldusväärsuse kriteeriumite kinnitamist,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA OTSUSE:

Artikkel 1

Kuumtöödeldud piima analüüsi- ja kontrollmeetodid on:

— kuivaine üldsisalduse määramine,

— rasvasisalduse määramine,

— rasvavaba kuivaine üldsisalduse määramine,

— lämmastiku üldsisalduse määramine,

— proteiinisisalduse määramine,

— erikaalu määramine.

[1] EÜT L 226, 24.8.1985, lk 13. Viimati muudetud direktiiviga 89/662/EMÜ (EÜT L 395, 30.12.1989, lk 13).

Artikkel 2

Analüüsi ja kontrolli standardmeetodite rakendamine, usaldusväärsuse kriteeriumite kindlaksmääramine ja proovide võtmine tuleb läbi viia I lisas kehtestatud korras.

Artikkel 3

Artiklis 1 osutatud meetodid on sätestatud II lisas.

Artikkel 4

Käesolev otsus on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 14. november 1992

Nõukogu nimel
eesistuja
J. GUMMER

I LISA

I. ÜLDSÄTTED

1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatakse reaktiivide, seadmete, tulemuste väljendamise, täpsuse ja analüüsiprotokollide suhtes kohaldatavaid üldsätteid. Liikmesriikide pädevad asutused ja piimast proovide võtmise ning nende kontrollimise eest vastutavad laboratooriumid peavad neid sätteid täitma.

2. REAKTIIVID

2.1. **Vesi**

2.1.1. Kui seoses lahuse valmistamise, lahjendamise või loputamisega nimetatakse vett, kasutatakse destilleeritud, deioniseeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega demineraliseeritud vett, kui ei ole sätestatud teisiti.

2.1.2. Kui "lahusele" või "lahjendamisele" viidatakse ilma täiendava märkuseta, peetakse silmas "vees lahustamist" või "veega lahjendamist".

2.2. **Kemikaalid**

Kui ei ole ette nähtud teisiti, peavad kõik kasutatud kemikaalid olema analüütiliselt puhtad.

3. SEADMED

3.1. **Seadmete loetelu**

Erinevates standardmeetodites toodud seadmete loetelu sisaldab üksnes spetsiaalseks kasutuseks mõeldud ja erinõuetele vastavaid vahendeid.

3.2. **Analüütilised kaalud**

"Analüütilised kaalud" on kaalud mõõtmiseks 0,1 mg täpsusega.

4. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

4.1. **Tulemused**

Kui ei ole ette nähtud teisiti, märgitakse analüüsiprotokolli (6) vastava meetodi korratavuse kriteeriumile (5.1.1.) vastava kahe katse tulemuse aritmeetiline keskmine. Kui korratavuse kriteeriumit ei täideta, tuleb analüüsi võimaluse korral korrata või see kehtetuks tunnistada.

4.2. **Protsendi arvutamine**

Kui ei ole sätestatud teisiti, arvutatakse tulemus proovi massiprotsendina.

5. TÄPSUSE KRITEERIUMID: KORRATAVUS JA REPRODUTSEERITAVUS

5.1. Iga meetodi täpsuse kriteeriumid määratletakse järgmiselt:

5.1.1. Korratavus r on näitaja, millest allpoole jääb samal meetodil, sama katsematerjaliga, samadel tingimustel (sama sooritaja, samad seadmed, sama laboratoorium, lühike ajavahemik) läbi viidud kahe üksikkatse tulemuste absoluutne erinevus.

5.1.2. Reprodutseeritavus R on näitaja, millest allpoole jääb samal meetodil, sama katsematerjaliga, eri tingimustel (eri sooritaja, eri seadmed, eri laboratooriumid ja/või eri aeg) läbi viidud kahe teineteisele vahetult järgneva üksikkatse tulemuste absoluutne erinevus.

5.1.3. Kui iga meetod ei sätesta teisiti, väljendavad iga analüüsimeetodi korratavuse- ja reprodutseeritavuse kriteeriumid 95 % usaldusvahemikku nagu ISO 5725, 2. trükk 1986, määratletud.

5.1.4. Vajalikud koostöökatsed ja uurimused tuleb kavandada ja läbi viia kooskõlas rahvusvaheliste suunistega.

6. ANALÜÜSIPROTOKOLL

Analüüsiprotokollis täpsustakse kasutatud meetod ja saadud tulemused. Lisaks märgitakse analüüsimeetodis täpsustamata või valikulised üksikasjad ning saadud tulemusi mõjutada võinud asjaolud. Analüüsiprotokollis on kõik proovi täielikuks tuvastamiseks vajalikud andmeid.

II. PROOVIDE VÕTMINE KUUMTÖÖDELDUD PIIMAST

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Käesoleva standardmeetodiga täpsustatakse proovivõtu, transpordi ja proovide ladustamise meetod kuumtöödeldud piima puhul.

2. ÜLDOSA

Tsisternis jne olevast kuumtöödeldud piimast võtab proove kogenud isik, kes on enne piimast proovide võtmist saanud vastava koolituse.

Kui pädevad asutused või katselabor seda asjakohaseks peavad, juhendavad nad proovide võtjaid proovivõtumeetodite osas, et tagada proovide tüüpilisus ja vastavus kogu partiile.

Kui pädevad asutused või katselabor seda asjakohaseks peavad, juhendavad nad proovide võtjaid proovide märgistamise osas, et tagada proovi ühtne identifitseerimine.

3. PROOVIVÕTUSEADMED

3.1. **Üldjuhised**

Proovivõtuseadmed peavad olema roostevabast terasest või muust sobivast piisava tugevusega materjalist ning sihtotstarbeks sobiva ehitusega (segamiseks, proovivõtuks, jne.). Varbkolvid ja segajad mahutites vedeliku segamiseks on vedeliku korralikuks segamiseks piisava ulatusega, kuid ei põhjusta räästunud maitse tekkimist. Kulpidel peab olema piisava pikkusega tugev käepide, et oleks võimalik võtta proovi kogu mahuti sügavuse ulatuses. Kulbi maht on vähemalt 50 ml.

Proovivõtuanumad ja korgid peaksid olema klaasist, sobivast metallist või plastmassist.

Proovivõtuseadmete materjal (sealhulgas mahutid ja korgid) ei tohi põhjustada proovides muutusi, mis võivad mõjutada katsete tulemusi. Kõik proovivõtuseadmete ja proovinõude pinnad on puhtad ja kuivad, siledad ja ilma pragudeta ning ümarate nurkadega.

4. PROOVIVÕTUMEETOD

4.1. **Üldjuhised**

Sõltumata teostatavate analüüside liigist segatakse piima enne proovivõttu korralikult kas käsitsi või masinaga.

Proov võetakse vahetult pärast segamist kui piim veel liigub.

Proovi maht on analüüsi nõetele kohane. Proovinõude maht peab olema selline, et proov neid peaaegu tervenisti täidaks ja võimaldaks seega sisu korralikult enne analüüsimist segada, kuid hoiaks ära kokkulöömise transpordi ajal.

4.2. **Käsitsi proovivõtmine**

4.2.1. *Proovi võtmine jaotatud kogusest*

Kui piim, millest proov võetakse on rohkem kui ühes mahutis, võetakse igast mahutist tüüpiline kogus ja märgitakse üles piima kogus, millest proov võeti. Välja arvatud juhul kui mahutite proove tuleb eraldi analüüsida, segatakse võetud proovid kogusteks, mis on võrdelised vastavas mahutis oleva kogusega. Proov(id) võetakse pärast segamist nende proportsionaalsete koguste kogumist.

4.2.2. *Proovide võtmine suurtest nõudest -mahutitest, paakvagunitest ja -autodest*

4.2.2.1. Piim segatakse ettenähtud korras enne proovi võtmist.

Suurte nõude või mahutite, paakvagunite või -autode sisu segamiseks soovitatakse masinaga segamist (4.2.2.2.).

Segamise kestus sõltub sellest, kui kaua piim on seisnud. Ettenähtud analüüsi jaoks igal konkreetsel juhul kasutatava segamisprotseduuri tõhusus peab vastama asjaomastele nõuetele; segamise tõhusus mõjutab eelkõige partiide erinevatest osadest või paagi ava kaudu võetud proovide analüüside tulemusi. Piima (töötlemata või täispiima) segamine on tõhus kui eespool nimetatud tingimustel võetud kahe proovi rasvasisalduse erinevus on alla 0,1 %.

Suures põhjakraaniga anumas võib äravooluavas olla väike kogus piima, mis ei ole esinduslik kogu sisu osas isegi pärast segamist. Seetõttu tuleks proovid eelistatult võtta läbi vaatluskaevu. Kui proovid võetakse põhjakraanist tuleb selleks, et proovid esindaksid tervikut, piisav kogus välja valada.

4.2.2.2. Suurte anumate või mahutite, paakvagunite või -autode sisu võib segada:

— paakidesse ehitatud ja elektrimootoriga töötavate mehaaniliste segistitega,

— elektrimootoriga töötava propelleri või segistiga, mis asub vaatluskaevus ning mis pöörleb piima sees,

— paakvagunite või -autode puhul piima retsirkuleerimise teel läbi ümberpumpamisvooliku, mis on kinnitatud paagi pumpade külge ja sisestatud vaatluskaevu,

— puhtaks filtreeritud suruõhuga; sellisel juhul tuleks räästunud maitse tekkimise vältimiseks kasutada minimaalset õhusurvet ja ruumala.

4.3. **Proovide võtmine müügipakendites olevast otseselt inimtoiduks mõeldud kuumtöödeldud piimast**

Müügipakendites olevast otseselt inimtoiduks mõeldud kuumtöödeldud piima puhul võetakse proove tervetest, avamata pakenditest. Võimaluse korral tuleb proovid võtta pakkemasinast või töötlemishoone külmhoonest võimalikult ruttu pärast töötlemist (pastöriseeritud piima puhul töötlemise päeval).

Igat tüüpi kuumtöödeldud piimast (pastöriseeritud, kõrgkuumutatud, steriliseeritud) võetakse kooskõlas katselabori või muu pädeva asutuse poolt sätestatud juhiste alusel tehtavatele analüüsidele vastav arv proove.

5. PROOVI IDENTIFITSEERIMINE

Selleks, et proovi oleks võimalik katselabori või pädeva asutuse poolt antud juhiste alusel lihtsalt identifitseerida, märgitakse proovile tunnuskood.

6. PROOVIDE SÄILITAMINE, TRANSPORT JA LADUSTAMINE

Kooskõlas riikliku pädeva asutusega koostab katselabor vastavalt piima tüübile ja kasutatavale analüüsimeetodile juhised proovide säilitamise (keemiline, temperatuuriline), transpordi, ladustamise ja proovivõtu ja piima analüüsi vahele jääva aja kohta.

Juhised sisaldavad järgmisi punkte:

— Transpordi ja ladustamise ajal võetakse ettevaatusabinõud, et proovid ei puutuks kokku saastunud lõhnade ja otsese päikesevalgusega. Kui proovid on läbipaistvas mahutis, hoitakse seda pimedas kohas.

II LISA

I. KUIVAINE ÜLDSISALDUSE MÄÄRAMINE

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Käesoleva meetodiga täpsustatakse piima kuivaine üldsisalduse määramise standardmeetod.

2. MÄÄRATLUS

Kuivainete üldsisaldus: Mass pärast spetsiaalset kuivatusprotseduuri väljendatuna massiprotsendina.

3. PÕHIMÕTE

Vee aurumine katsekogusest kuivatuskapis temperatuuril 102 ± 2 °C.

4. VAHENDID JA KLAASTARVIKUD

Tavalised, eelkõige järgmised laboratooriumiseadmed:

4.1 **Analüütilised kaalud**

4.2 Tõhusa kuivatusainega (nt hiljuti kuivatatud silikageel millel on veesisalduse indikaator) varustatud **eksikaator**.

4.3 Ventileeritav **kuivatuskapp**, mida saab seada temperatuurile 102 ± 2 °C.

4.4 **Lamedapõhjalised sobivast materjalist anumad**, kõrgus 20–25 mm, diameeter 50–75 mm, millel on tihedalt suletavad ja lihtsalt eemaldatavad kaaned.

4.5 **Keeva vee vann**

4.6 **Homogenisaator**

5. ANALÜÜSITAVA PROOVI ETTEVALMISTAMINE

Piima proov reguleeritakse temperatuurile 20–25 °C. Proovi segatakse põhjalikult, et oleks tagatud rasva ühtlane jaotumine proovis. Segada ei tohi liiga tugevalt põhjustades sellega piima vahustumise ja rasva kokkulöömise. Kui koorekihti on raske hajutada, soojendatakse seda temperatuurini 25–40 °C ning seejärel lahustatakse mahuti külge kinnitunud koor hoolikalt segades. Proov jahutatakse kiiresti temperatuurini 20–25 °C.

Soovi korral võib rasva hajutamiseks kasutada homogenisaatorit.

Proovi tulemused ei ole õiged kui proovis on näha vedela rasva laike või valgeid ebaregulaarse kujuga mahuti seintele kinnitunud osakesi.

6. TÖÖ KÄIK

6.1 **Anuma ettevalmistamine**

Anumat (4.4) koos selle kõrvale asetatud kaanega kuumutatakse kuivatuskapis (4.3) temperatuuril 102 ± 2 °C vähemalt 30 minutit. Kaas asetatakse anumale, anum pannakse kohe eksikaatorisse (4.2), lastakse jahtuda toatemperatuurini (s.o vähemalt 30 minutit) ja kaalutakse täpsusega 0,1 mg.

6.2 **Analüüsitav kogus**

Ettevalmistatud anumasse (6.1) kaalutakse kohe 0,1 m täpsusega 3–5 g ettevalmistatud proovi (5).

6.3 **Määramine**

6.3.1 Anumat kuivatatakse enne kuuma vee vanni kohal (4.5) kuumutades 30 minutit.

6.3.2 Anumat kuumutatakse koos selle kõrvale asetatud kaanega kuivatuskapis (4.3) temperatuuril 102 ± 2 °C kaks tundi. Kaan asetatakse anumale ja see võetakse kuivatuskapist välja.

6.3.3 Jahutatakse eksikaatoris (4.2) toatemperatuurini (s.t vähemalt 30 minutit) ja kaalutakse täpsusega 0,1 mg.

6.3.4 Anumat koos selle kõrval oleva kaanega kuumutatakse uuesti kuivatuskapis tund aega. Kaan asetatakse anumale ja see võetakse kuivatuskapist välja. Lastakse eksikaatoris umbes 30 minutit jahtuda ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega.

6.3.5 Korratakse punktis 6.3.4 kirjeldatud toimingut kuni kahe järjestikuse kaalumise erinevus ei ületa 0,5 mg. Väiksem kaal märgitakse üles.

7. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

7.1 **Arvutamine ja valem**

Kuivaine üldsisaldus arvutatakse massiprotsendina järgmise valemi alusel:

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

kus

W_T = on kuivaine üldsisaldus grammides 100 g kohta,

m_0 = anuma ja kaane (vt 6.1) mass grammides,

m_1 = anuma, kaane ja katsekoguse mass grammides (vt 6.2),

m_2 = anuma, kaane ja katsekoguse mass grammides (vt 6.3.5).

Saadud väärtus ümardatakse täpsusega 0,01 % (massiprotsent).

7.2 **Täpsus**

7.2.1 *Korratavus (r)*: 0,10 g kuivainet 100 g toote kohta.

7.2.2 *Reprodutseeritavus (R)*: 0,20 g kuivainet 100 g toote kohta.

II. **RASVASISALDUSE MÄÄRAMINE**

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Käesoleva standardmeetodiga täpsustatakse toor ja täispiima, osaliselt kooritud ja kooritud piima rasvasisalduse määramise meetod.

2. MÄÄRATLUS

Piima rasvasisaldus: kõik kindlaksmääratud meetodil määratud ained. Seda väljendatakse massiprotsendina.

3. PÕHIMÕTE

Uuritava proovi ammoniakaalne etanooli lahus ekstraheeritakse dietüüleetri ja petrooleetriga, destilleerimise või aurutamisega eemaldatakse lahus ja määratakse petrooleetris lahusest ekstraheeritud materjali mass. (Menetlust on tavaliselt tuntud kui Röse-Gottliebi meetod).

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad ega tohi anda pimekatse käigus märgatavaid jääke.

Reaktiivide puhtuse kontrollimiseks viiakse läbi punktis 6.3 kirjeldatud protseduur. Kaalumiseks kasutatakse tühja kolbi, keeduklaasi või metallist kaussi (5.8), mis on ette valmistatud pakendina vastavalt punktile 6.4 (et parandada ilmastikuolude muutustest põhjustatud mõju kaalumise tulemustele). Kui jääk, mida on korrigeeritud muutuste tõttu pakendi kaalus, on suurem kui 2,5 mg määratakse jääk või lahustid eraldi, aurustades selleks vastavalt 100 ml dietüüleetrit (4.4) ja 100 ml petrooleetrit (4.5). Kaalumiseks kasutatakse samuti pakendit. Kui jääk on suurem kui 2,5 mg, puhastatakse lahusti destilleerimise teel või asendatakse.

4.1 **Ammoniaagilahus**, mis sisaldab umbes 25 % (m/m) NH_3. Võib kasutada ka suurema kontsentratsiooniga ammoniaagilahust (vt 6.5.1 ja A.1.5.1).

4.2 **Etanool**, vähemalt 94 % (v/v). Metanooliga denatureeritud etanooli võib kasutada juhul, kui on kindel, et see ei mõjuta määramise tulemusi.

4.3 **Kongo punane või kresoolpunane lahus**

1 g kongo punast või kresoolpunast lahustatakse vees ja lahjendatakse 100 milliliitrini.

Märkus: Selle lahuse kasutamine, mis võimaldab lahuse ja veekihi piiri selgemalt näha, ei ole kohustuslik (vt 6.5.2). Võib kasutada ka teisi värvi vesilahuseid tingimusel, et need ei mõjuta määramise tulemusi.

4.4 **Dietüüleeter**, ilma peroksiidideta ja mis ei sisalda antioksüdante rohkem kui 2 mg/kg ja vastab pimekatse (6.3) nõuetele.

4.5 **Petrooleeter**, mille keemistemperatuuri vahemik on 30 ja 60 °C.

4.6 **Segatud lahus**, valmistatud vahetult enne kasutamist dietüüleetri (4.4) ja petrooleetri (4.5) võrdsete koguste segamisel.

5. VAHENDID JA KLAASTARVIKUD

Ettevaatust: Kuna määramise käigus kasutatakse lenduvaid tuleohtlikke lahuseid, peavad kõik elektriseaded vastama selliste lahuste kasutamist käsitlevate õigusaktide nõuetele.

Tavalised, eelkõige järgmised laboratooriumiseadmed:

5.1 **Analüütilised kaalud**

5.2 **Tsentrifuug**, millesse on rasva ekstraheerimise kolbi või katseklaasi võimalik pöörlema panna pöörlemissagedusega 500–600 pööret minutis, et saavutada pudeli või katseklaasi välimises servas gravitatsiooniväli 80–90 g.

Märkus: Tsentrifuugi kasutamine ei ole kohustuslik (6.5.5).

5.3 **Destilleerimise või aurutamise seade**, mis võimaldab lahuseid ja etanooli kolbist destilleerida või keeduklaasist ja anumatest aurutada (vt 6.5.1.2 ja 6.5.1.5) temperatuuril kuni 100 °C.

5.4 Avatud ventilatsiooniava(de)ga elektriline **kuivatuskapp**, mida on võimalik seada temperatuurile 102 ± 2 °C. Kuivatuskappi pannakse sobiv termomeeter.

5.5 **Veevann**, mida on võimalik hoida temperatuuril 35–40 °C.

5.6 **Mojonnier–tüüpi rasva ekstraheerimise kolbid**

Märkus : Võib kasutada ka sifooni või pesupudeliga rasva ekstraheerimise katseklaasi, kuid protseduur on siis teistsugune ja on määratletud liites.

Kolvid (või katseklaasid) varustatakse lihvkorkide või hea kvaliteediga korgist korkidega või teiste korkidega, mida kasutatud reaktiivid ei mõjuta. Korgist korgid ekstraheeritakse vähemalt 15 minutit 60 °C või rohkema juures vees hoitud dietüüleetriga (4.4) ja lastakse siis jahtuda jahedas vees nii, et nad on kasutamisel küllastunud.

5.7 **Statiiv** rasva ekstraheerimise kolbide (või katseklaaside) (vt 5.6) hoidmiseks.

5.8 **Pesupudel**, mis sobib kasutamiseks koos segatud lahusega (4.6). Plastmassist pesupudelit ei kasutata.

5.9 **Rasvakogumisnõud**, näiteks keemiskolvid (seisukolb), või Erlenmeyeri kolvid mahuga 125–250 ml või metallkausid. Metallkausside kasutamisel peaksid need eelistatult olema roostevabast terasest ning lamedapõhjalised ja nokaga, diameetriga 80–100 mm ja kõrgusega umbes 50 mm.

5.10 Rasvata **keedukivid**, mis on valmistatud mitte-poorsest portselanist või ränikarbiidist või klaaskuulidest (metallanumate puhul ei ole kohustuslikud).

5.11 **Mõõtesilindrid**, mahuga 5 ja 25 ml.

5.12 Gradueeritud **pipetid**, mahuga 10 ml.

5.13 Metallist **tangid**, sobivad kolbide, keeduklaaside või anumate hoidmiseks.

6. TÖÖ KÄIK

Märkus : Alternatiivmenetlust, mille käigus kasutatakse rasva ekstraheerimise klaasi koos sifooni ja pesupudeliliidesega (vt 5.6) kirjeldatakse liites.

6.1 **Analüüsitava proovi ettevalmistamine**

Laboriproovi temperatuur seatakse 15 minutiks umbes 35–40 °C juurde kasutades vajaduse korral veevanni. Proovi segatakse põhjalikult kuid õrnalt, pudelit korduvalt üles-alla pöörates, kuid ilma et see põhjustaks vahustumist või kokkulöömist ning jahutatakse siis kiiresti temperatuurile umbes 20 °C.

6.2 **Analüüsitav kogus**

Proovi (6.1) segatakse õrnalt pudelit kolm või neli korda üles-alla keerates ja kaalutakse kohe 1 mg täpsusega 10–11 g proovi otse või kaalumisnõu kaudu ekstraheerimispudelisse (5.6).

Ekstraheerimiskolbi madalamasse (väiksesse) reservuaari pannakse võimalikult palju katsekogust.

6.3 **Pimekatse**

Pimekatse viiakse läbi rasvasisalduse määramise ajal samas korras ja samade reaktiividega, kuid katsekogus asendatakse 10–11 ml veega.

Ilmsed muutused rasvakogumisnõu kaalus, mida on korrigeeritud koos kontrollanuma muutustega, ei tohiks ületada 2,5 mg.

6.4 **Rasvakogumisnõu ette valmistamine**

Kuivatuskapis (5.4) läbiviidava üks tund kestva lahuse eraldamise ajal kuivatatakse anum (5.9), milles on keedukivid (5.10) tasase keemise saavutamiseks. Anumal lastakse jahtuda (mitte eksikaatoris, kuid tolmu eest kaitstult) kaalukoja temperatuurini (klaasanumate puhul vähemalt tund aega, metallnõude puhul vähemalt 30 minutit). Temperatuurist tingitud muutuste vältimiseks kasutatakse anuma kaalule panemiseks tange ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega.

6.5 **Rasvavaba kuivaine sisalduse määramine**

6.5.1 Lisatakse 2 ml ammoniaagilahust (4.1) või samaväärne kogus kontsentreeritumat ammoniaagilahust ja segatakse põhjalikult katsekogusega kolbi väikses reservuaaris. Pärast ammoniaagi lisamist tuleb viivitamatult määrata rasvasisaldus.

6.5.2 Lisatakse 10 ml etanooli (4.2) ja segatakse kergelt, kuid hoolikalt nii, et sisu kahe reservuaari vahel edasi-tagasi liiguks; tuleks vältida vedeliku liikumist kolvi kaelale liiga lähedale. Soovi korral lisatakse kaks tilka kongo punast või kresoolpunase lahust (4.3).

6.5.3 Lisatakse 25 ml dietüüleetrit (4.4), kolb suletakse veega küllastunud korgiga või märjaks tehtud punniga (vt 5.6), ja loksutatakse tugevalt, kuid mitte liialt (vältimaks püsiva emulsiooni teket) minut aega nii, et kolb on horisontaalselt ja väiksem reservuaar ulatub ülespoole. Vedelikul lastakse korrapäraselt suuremast reservuaarist väiksemasse reservuaari voolata. Vajaduse korral jahutatakse kolb jooksva vee all, siis eemaldatakse ettevaatlikult kork või punn ning loputatakse koos kolbi kaelaga vähese koguse segatud lahusega (4.6) kasutades selleks pesupudelit (5.8) nii, et lahus voolab kolbi.

6.5.4 Lisatakse 25 ml petrooleetrit (4.5), kolb sulgetakse uuesti niisutatud korgi või punniga (uuesti niisutatud vette kastmisega), ja loksutatakse kolbi õrnalt 30 sekundit nagu punktis 6.5.3 kirjeldatud.

6.5.5 Suletud kolbi tsentrifuugitakse üks kuni viis minutit pöörlemissagedusel 500–600 pööret minutis (5.2). Kui tsentrifuug ei ole käepärast (vaata märkust 5.2) lastakse suletud kolbil seista statiivil (5.7) vähemalt 30 minutit kuni supernatandi kiht on selge ja veekihist selgelt eraldunud. Vajaduse korral jahutatakse kolbi jooksva vee all.

6.5.6 Kork või punn eemaldatakse ettevaatlikult ja loputatakse koos kolbi kaelaga vähese koguse segatud lahusega (4.6) nii, et lahus voolab kolbi.

Kui vedelike vaheline piir on kolbi kaela alumisest osast madalamal tõstetakse see sellest pisut kõrgemale lisades selleks kaela kaudu vett, et hõlbustada lahusti dekanteerimist.

6.5.7 Ekstraheerimiskolbi väiksemast reservuaarist hoides dekanteeritakse ettevaatlikult võimalikult palju supernatantkihti ettevalmistatud rasvakogumisnõusse (6.4), mis sisaldab natuke keedukivisid (5.10) kolbi puhul (metallnõude puhul ei ole kohustuslik), vältides veekihi dekanteerimist.

6.5.8 Ekstraheerimiskolbi kaela väline külg loputatakse väikese koguse segatud lahusega (4.6), nii et vedelik kogutakse rasvakogumisnõusse ja tagades, et segatud lahus ei voolaks väljapoole ekstraheerimiskolbi.

Soovi korral võib lahusti osaliselt või täielikult destilleerimise või aurutamise teel nõust eemaldada nagu punktis 6.5.12 kirjeldatud.

6.5.9 Ekstraheerimiskolbi lisatakse 5 ml etanooli (4.2) kasutades seda kolbi kaela seestpoolt loputamiseks ja segatakse nagu punktis 6.5.2 kirjeldatud.

6.5.10 Viiakse läbi teine ekstraktsioon korrates punktides 6.5.3 kuni 6.5.8 kaasa arvatud kirjeldatud toiminguid, kuid kasutades ainult 15 ml dietüüleetrit (4.4) ja 15 ml petrooleetrit (4.5); eetriga loputatakse ekstraheerimiskolbi kael seestpoolt. Vajaduse korral tõstetakse vedelike kokkupuutepiir kolbi keskosani, et lahusti lõplik dekanteerimine oleks võimalikult täielik.

6.5.11 Viiakse läbi teine ekstraktsioon korrates veel kord punktides 6.5.3 kuni 6.5.8 kirjeldatud toiminguid, kuid kasutades ainult 15 ml dietüüleetrit (4.4) ja 15 ml petrooleetrit (4.5). eetriga loputatakse ekstraheerimiskolbi kael seestpoolt. Vajaduse korral tõstetakse vedelike kokkupuutepiir kolbi keskosani, et lahusti lõplik dekanteerimine oleks võimalikult täielik.

Kolmanda ekstraheerimise võib kooritud piima puhul tegemata jätta.

6.5.12 Lahused (kaasa arvatud etanool) eemaldatakse võimalikult põhjalikult katseklaasist destilleerimise teel või keeduklaasist või nõust aurutamise (5.3) teel, katseklaasi kaela loputatakse enne destilleerimist seestpoolt väikese koguse segatud lahusega (4.6).

6.5.13 Rasvakogumisnõud kuumutatakse (koos katsekaasiga selle kõrval, et võimaldada lahuse aurul väljuda) tund aega kuivatuskapis (5.4). Rasvakogumisnõu võetakse kuivatuskapist ja lastakse jahtuda (mitte eksikaatoris, kuid tolmu eest kaitstult) kaalukoja temperatuurini (klaasanumate puhul vähemalt tund aega, metallnõude puhul vähemalt 30 minutit) ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega.

Anumat ei tohi vahetult enne kaalumist pühkida. Anum asetatakse tangidega kaalule ja välditakse eelkõige temperatuuri kõikumisi.

6.5.14 Punktis 6.5.13 kirjeldatud toiminguid korratakse kuni kahe üksteisele järgneva kaalumise vahel rasvakogumisanuma kaal väheneb kuni 0,5 mg või suureneb. Miinimumkaal märgitakse rasvakogumisnõu ja ekstraheeritud aine massina.

6.5.15 Rasvakogumisnõusse lisatakse 25 ml petrooleetrit, et kontrollida kas ekstraheeritud aine on täielikult lahustuv. Soojendatakse pisut ja segatakse kuni rasva lahustumiseni.

Kui ekstraheeritud aine lahustub petrooleetris täielikult, on rasva kaal ekstraheeritud ainet (6.5.14) sisaldava anuma lõpliku kaalu ja selle algse kaalu (6.4) vahe.

6.5.16 Kui ekstraheeritud aine ei lahustu petrooleetris täielikult või kahtluse korral ekstraheeritakse rasv anumast täielikult seda sooja petrooleetriga korduvalt pestes.

Lahustumatutel osakestel lastakse põhja vajuda ning petrooleeter dekanteeritakse ettevaatlikult ilma lahustumatuid osakesi eemaldamata. Korratakse kolm või enam korda, kasutades petrooleetrit anuma kaela loputamiseks seestpoolt.

Lõpuks loputatakse anuma ülaosa väljastpoolt segatud lahusega nii, et lahus ei valgu anumast väljapoole. Petrooleetri aur eemaldatakse anumast kuumutades selleks anumat tund aega kuivatuskapis, lastakse siis jahtuda ning kuumutatakse nagu punktides 6.5.13 ja 6.5.14 kirjeldatud.

Rasva kaaluks on punktis 6.5.14 määratud kaalu ja lõpliku kaalu vahe.

7. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

7.1 **Arvutamine ja valem**

Rasvasisaldus arvutatakse massiprotsendina:

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

kus

F = rasvasisaldus,

m_0 = uuritava proovi mass grammides (6.2),

m_1 = rasvakogumisnõu ja punktis 6.5.14 määratud ekstraheeritud aine mass grammides,

m_2 = katseks ette valmistatud rasvakogumisnõu või lahustumatu aine puhul rasvakogumisnõu ning punktis 6.5.16 määratud lahustumatu jäägi mass grammides,

m_3 = pimekatses (6.3) kasutatud rasvakogumisnõu ja punktis 6.5.14 määratud ekstraheeritud aine mass grammides,

m_4 = pimekatse (6.3) käigus kasutatud katseks ette valmistatud rasvakogumisnõu (6.4) või lahustumatu aine puhul rasvakogumisnõu ning punktis 6.5.16 määratud lahustumatu jäägi mass grammides.

Tulemus esitatakse 0,01 % täpsusega.

7.2 **Täpsus**

7.2.1 *Korratavus (r)*:

— täispiima ja osaliselt kooritud piima puhul: 0,02 g rasva 100 g toote kohta,

— lõssi puhul: 0,01 g rasva 100 g toote kohta.

7.2.2 *Reprodutseeritavus (R)*:

— täispiima puhul: 0,04 g rasva 100 g toote kohta,

— osaliselt kooritud piima puhul: 0,03 g rasva 100 g toote kohta,

— lõssi puhul: 0,025 g rasva 100 g toote kohta.

III. MITTERASVAINETE ÜLDSISALDUSE MÄÄRAMINE

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Käesoleva standardmeetodiga täpsustatakse kuumtöödeldud piimas mitterasvaine sisalduse määramise meetod.

2. MÄÄRATLUS JA ARVUTAMINE

Mitterasvaine üldsisaldus peab olema väljendatud massiprotsendina.

Rasvavaba kuivaine sisaldus on:

Kuivainete sisaldusest (vt I jagu) lahutatud rasvasisaldus (vt II jagu).

IV. LÄMMASTIKU ÜLDSISALDUSE MÄÄRAMINE

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Käesoleva standardmeetodiga täpsustatakse toor- ja täispiimas, osaliselt kooritud ja kooritud piimas lämmastiku üldsisalduse määramise meetod.

2. MÄÄRATLUS

Lämmastiku üldsisaldus piimas: lämmastikusisaldus, väljendatuna massiprotsendina, määratud Kjeldahli meetodiga.

3. PÕHIMÕTE

Kaalutud piimaproovi kogus lagundatakse kontsentreeritud väävelhappe ja kaaliumsulfaadiga, milles katalüsaatorina toimib vasksulfaat, et muundada orgaanilistes ühendites olev lämmastik ammooniumsulfaadiks. Ammoniaak vabastatakse naatriumhüdroksiidi lahuse lisamisega ja destilleeritakse ning absorbeeritakse boorhappe lahuses. Saadud lahus tiitritakse happelahuses.

4. REAKTIIVID

4.1 **Kaaliumsulfaat** (K_2SO_4).

4.2 **Vasksulfaadi lahus**. Lahustatakse 5,0 g vasksulfaatpentahüdraati ($CuSO_4$, $5H_20$) vees ja lahjendatakse mõõtekolbis (20 °C juures) nii, et maht on 100 ml.

4.3 **Väävelhape**, vähemalt 98,0 % (m/m) H_2SO_4.

4.4 **Naatriumhüdroksiidi lahus**, 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (20 °C).

Märkus: Võib kasutada väiksema kontsentratsiooniga naatriumhüdroksiidi lahust, näiteks: 40 % (m/m) 572 g/l, 20 °C; või 30 % (m/m) 399 g/l, 20 °C.

4.5 **Boorhappe lahus**. 40 g boorhapet (H_3BO_3) lahustatakse ühes liitris kuumas vees, lastakse jahtuda ning pannakse boorsilikaatklaasist pudelisse.

4.6 **Indikaatorlahus**. 100 ml etanoolis lahustatakse 0,01 g metüülpunast, 0,02 g broomtümoolsinist ja 0,06 g bromokresoolrohelist. Lahust hoitakse pruunis suletud pudelis, jahedas ja pimedas kohas.

4.7 **Tiitrimislahus**

c (1/2 H_2SO_4) või c (HCl) = 0,1 mol/l standarditud 0,0001 mol/l täpsusega.

4.8 **Lämmastikuvaba sahharoos.**

4.9 **Ammooniumsool**, puhas nagu ammooniumoksalaat $(NH_4)_2C_2O_4$, H_2O või ammooniumsulfaat $(NH_4)_2SO_4$.

4.10 **Trüptofaan** ($C_{11}H_{12}N_2O_2$), **fenatsetiin** ($C_{10}H_7CH_2CONH_2$) või lüsiin mono või di-vesinikkloriid ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ või $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$).

Märkus : Punktides 4.9 ja 4.10 märgitud reaktiivide puhtus peaks olema kõrgema kvaliteediga kui analüütiliselt puhas. Võimaluse korral tuleks kasutada ammooniumsoola lahust (4.9).

5. VAHENDID JA KLAASTARVIKUD

Tavalised, eelkõige järgmised laboratooriumiseadmed:

5.1 500 ml **Kjeldahli** kolb.

5.2 **Sobivad keedukivid**, näiteks umbes 5 mm diameetriga klaashelmed, Hengari graanulid, pimsskivi.

5.3 **Bürett** või **automaatpipett**, 1,0 ml mõõtmiseks.

5.4 **Mõõtesilindrid**, klaasist, mahuga 50, 100 ja 250 ml.

5.5 **Mineraliseerimisaparaat** kaldasendis (umbes 45°), auru eemaldamise süsteemiga elektrisoojendaja või gaasipõletiga, mis ei kuumuta kolbe nende sisust kõrgemalt.

5.6 Boorsilikaatklaasist **destilleerimisaparaat**, millesse on võimalik paigutada Kjeldahli kolbi (5.1), mis koosneb tõhusast kaitseotsakust, mis on sirge sisendtoru abil ühendatud võimsa kondensaatoriga ning alumise osa külge kinnitatud äravoolutorust. Ühendustoru ja punn(id) peavad tihkelt istuma ning olema eelistatult neopreenist.

5.7 **Pipett või automaatpipett**, 0,10 ml mõõtmiseks.

5.8 500 ml **Erlenmeyeri kolbid**, gradueeritud 200 ml.

5.9 50 ml **bürett**, gradueeritud 0,1 ml, suurim lubatud viga ± 0,05 ml.

5.10 **Luup** büreti lugemiseks (5.9).

5.11 **pH-meete**r

5.12 **Automaatpipett.**

6. TÖÖ KÄIK

6.1 Kjeldahli kolbi (5.1) lisatakse keedukivisid (5.2) (nt kolm klaashelmest), 15 g kaaliumsulfaati (4.1), 1,0 ml vasksulfaadi lahust (4.2), umbes 5 g piimaproovi (kaalutud 0,001 g täpsusega) ja 25 ml väävelhapet (4.3). Happega pestakse maha kolbi kaelal olev vasksulfaadi lahus, kaaliumsulfaat või piim ning kolbi sisu segatakse õrnalt.

Märkus : Kuna orgaanilised ained imevad keemise ajal väävelhapet, kasutatakse 25 ml asemel 30 ml H_2SO_4 (4.3) kui piim sisaldab rohkem kui 5,0 % (m/m) rasva. Seda tuleks korrata ka pimekatsel.

6.2 Kheldahli kolbi kuumutatakse mineraliseerimisaparaadil (5.5) alguses väga õrnalt nii, et must vaht püsib reservuaaris. Kui alguses esile kerkinud vaht kaob ning tekib paks valge aur, tuleb kolbi sisu intensiivselt keeta (happeaur kondenseerub kolbi kaela keskosas) kuni mustad osakesed kaovad ja kuni tekib selge kahvatu sinakasroheline värv. Siis keedetakse vaikselt vähemalt 1,5 tundi. Tähelepanu tuleb pöörata järgmistele nõuetele:

a) Segu selginemisaeg ei tohiks ületada ühte tundi ning kogu põlemisaeg ei tohiks olla vähem kui 2,5 tundi. Kui selginemiseks kulub rohkem kui tund, suureneb vastavalt ka kogu põlemisaeg.

b) Lisatud kaaliumsulfaat soodustab segu keemistemperatuuri tõstmisega mineraliseerimist. Kui H_2SO_4 lõppruumala on mineraliseerimisaja lõpuks alla 15 ml, võib lämmastik ülemäärase keetmise tõttu olla hävinud. Kui kuumutatakse gaasiga, kuumutatakse kolbi soojusisolatsiooniga kaetud materjaliga plaadil, tingimusel et sellel on sellise diameetriga ümmargune ava, mis võimaldab leegil ainult kolbi vedelikuga (5.5) täidetud osa puudutada.

c) Kui mustad osakesed pääsevad kolbi kaela ja neid ei uhuta intensiivse keemise algstaadiumis happega reservuaari (seda võib hõlbustada kolbi pööramine), tuleb kolbil lasta piisavalt jahtuda ning loputada see siis võimalikult vähese veega. Siis jätkatakse põletamist nagu eespool kirjeldatud.

6.3 Kui Kjeldahli kolbid on jahtunud, lisatakse igale 300 ml vett (vaata märkus), et pesta lahus kolbi kaelalt maha ning segatakse põhjalikult koostisosad, tagades et eraldatud kristallid lahustuvad. Ühtse keemise tagamiseks lisatakse keedukivisid (5.2). Siis lisatakse igasse kolbi 70 ml naatriumhüdroksiidi lahust (4.4) (vt märkus) valades lahust aeglaselt kolbi kaldus kaelast alla nii, et see moodustaks reservuaari alumise kihi; kaela ülemist osa ei tohi naatriumhüdroksiidi lahusega märjaks teha.

Märkus: *See on vajalik selleks, et vee ja naatriumhüdroksiidi lahuse kogumaht oleks 370 ml, mis võimaldaks enne ebakorrapärast (pulseerivat) keemist (6.4) saada 150 ml destillaati. Kui lisatakse suurem osa väiksema kontsentratsiooniga kui 47 % (m/m) naatriumhüdroksiidi lahust, vähendatakse vastavalt vee mahtu. Näiteks kui tuleb lisada 85 ml 40 % (m/m) või 125 ml 30 % (m/m) naatriumhüdroksiidi lahust, on vee maht vastavalt 285 ml või 245 ml.*

6.4 Iga Kjeldahli kolb ühendatakse viivitamatult destilleerimisaparaatiga (5.6). Kondensaatori äravoolutoru peab olema Erlenmeyeri kolbis 50 ml sügavuses boorhappe lahuses (4.5.), milles on 0,20 ml (5–6 tilka) indikaatorlahust (4.6). Kolbide sisu põhjalikuks segamiseks loksutatakse neid ja keedetakse, alguses nõrgalt suure vahu tekkimise vältimiseks. Kui on kogutud 100–125 ml destillaati, lastakse igat Erlenmeyeri kolbi allapoole kuni kondensaatori äravoolutoru on umbes 40 mm 200 ml märgist kõrgemal. Destilleerimist jätkatakse kuni ebakorrapärase (*pulseeriva*) keemise tekkimiseni ning kuumutamine lõpetatakse viivitamatult. Kõik Kjeldahli kolbid eraldatakse ning iga kondensaatori äravoolutoru ülaosa loputatakse vähese veega nii, et loputusvedelik voolab Erlenmeyeri kolbi. Tähelepanu tuleb pöörata järgmistele nõuetele:

a) Destilleerimise kiirus peab olema selline, et ebakorrapärase (*pulseeriva*) keemise ajal koguneb umbes 150 ml destillaati, iga Erlenmeyeri kolbi sisu maht on sellisel juhul umbes 200 ml.

b) Iga kondensaatori efektiivsus peaks olema selline, et iga Erlenmeyeri kolbi sisu temperatuur ei ületa destilleerimise ajal 25 °C.

6.5 Iga destillaat tiitritakse standardse tiitrimislahusega (4.7) kuni pH on 4,6 ± 0,1, kasutades pH meetrit ja vajaduse korral automaatbüretti. Indikaatori lisamine aitab kontrollida kas tiitrimine toimub nõuetekohaselt. Luubiga (5.10) loetakse iga büreti näit 0.01 ml täpsusega, vältides parallaksi vigu.

Tiitrimist võib läbi viia ainult indikaatoriga. Tiitritakse kuni destillaadi värv vastab Erlenmeyeri kolbis oleva lahuse värvile, mis valmistati varem 150 ml veest, millele lisati 50 ml boorhappelahust ja 0,20 ml indikaatorit.

6.6 Viiakse läbi pimekatse kooskõlas punktidega 6.1 kuni 6.5 kaasa arvatud, kasutades selleks piimaproovi asemel 5 ml destilleeritud vett ja 0,1 g sahharoosi (4.8).

Märkus : *Pimekatse puhul vajatakse destillaadi tiitrimiseks väga väike kogus standardset tiitrimislahust (4.7).*

6.7 Protseduuri nõuetekohasust tuleb korrapäraselt kontrollida, kasutades selleks kahte paralleelproovi vastavalt punktidele 6.1 kuni 6.5 kaasa arvatud.

6.7.1 Tuleb kontrollida, et destilleerimise ajal ei tekiks ülemäärase kuumuse või lekkekao tagajärjel lämmastiku kadu, kasutades selleks 0,15 g ammooniumoksalaadi või sulfaadi (4.9) katsekogust, mis on mõõdetud 0,001 g täpsusega ja 0,1 g sahharoosi (4.8).

Kogutud lämmastiku protsent peab olema 99,0–100,0 %.

Madalamad või kõrgemad tulemused viitavad vigadele protseduuris ja/või võrdlusainete töölahuses (4.7).

6.7.2 Tuleb kontrollida, et protseduur võimaldab kogu valgulist lämmastikku eraldada, kasutades selleks 0,20 g puhta trüptofaani, 0,35 g fenatsetiini või 0,20 g lüsiin vesinikkloriidi (4.10) katsekogust. Kõik kaalumised peavad olema 0,001 g täpsusega. Alles peaks jääma vähemalt 98–99 % lämmastikku.

7. ETTEVAATUSABINÕUD

Kontsentreeritud väävelhappe ja naatriumhüdroksiidiga töötamisel ja Kjeldahli kolbi kasutamisel tuleb alati kanda laboripõlle, kaitseprille ja happekindlaid kindaid.

Destilleerimise ajal ei tohi Kjeldahli kolbi kunagi jätta järelvalveta. Kui kolbi sisu pulseerib liiga tugevasti tuleb destilleerimine võimaliku ohu tõttu kohe lõpetada. Kui elektrikatkestus kestab rohkem kui kaks-kolm minutit, tuleb kogumiskolbi lasta madalamale, et tipp on vedelikust väljas.

8. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

8.1 **Arvutamine ja valem:**

Lämmastikusisaldus (W_N), väljendatuna lämmastiku grammides 100 g toote kohta arvutatakse valemiga:

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

kus:

W_N = lämmastikusisaldus.

V = määramisel kasutatud happe standardse tiitrimislahuse maht milliliitrites.

V_O = pimekatsel kasutatud happe standardse tiitrimislahuse maht milliliitrites.

c = kontsentratsioon, väljendatuna moolidena happe standardse tiitrimislahuse (4.7) liitri kohta.

m = katsekoguse mass grammides.

Tulemus ümardatakse 0,001 g täpsusega 100 g kohta.

8.2 **Täpsus**

8.2.1 *Korratavus (r)*: 0,007 g 100 g kohta.

8.2.2 *Reprodutseeritavus (R)*: 0,015 g 100 g kohta.

9. MUUDETUD PROTSEDUURID

9.1 Punktides 5.5 ja 5.1 kirjeldatud mineraliseerimisaparaadi ja Kjeldahli kolbi asemel kasutada silinderkolbidega plokkmineraliseerimisaparaati. Võimalike probleemide tuvastamiseks tuleb iga etappi eraldi kontrollida (6.7).

9.2 Kolbide (6.4) otsese kuumutamise asemel kasutada aurdestillatsiooni. Kui aparaat ei võimalda destilleeritud vee kasutamist, tuleks tagada, et vesi ei sisalda lenduvaid happelisi või leeliselisi aineid.

9.3 Ette nähtud 5 g (6.1) asemel võib kasutada katsekogust, milles on 1 g piima (pool-makro Kjeldahl):

— mineraliseerimisel (6.1)kasutatud reaktiivide: H_2SO_4, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, K_2SO_4, koguste vähendamise suhe on sama (1/5),

— mineraliseerimisaega (6.2) vähendatakse 75 minutini,

— naatriumhüdroksiid lahuse kogust (6.3) vähendatakse samas suhtes (1/5),

— tuleb kasutada madalama kontsentratsiooniga (0,02–0,03 mol/l) happe standardlahust (4.7).

Märkus : Muudetud protseduuride kasutamine on lubatud ainult juhul kui korratavuse väärtus (8.2.1) ja kahe täpsuse kontrollproovi tulemused (6.7) on kooskõlas käesolevas meetodis esitatud nõuetega.

V. PROTEIINISISALDUSE MÄÄRAMINE

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Käesoleva standardmeetodiga täpsustatakse kuumtöödeldud piimas valkude sisalduse määramise meetod (Direktiivi 85/397/EMÜ artikli 3 osa A3).

2. MÄÄRATLUS

Proteiinisisaldus: on väärtus, mis saadakse lämmastiku üldsisalduse korrutamisel (väljendatuna massiprotsendina ja määratud kooskõlas IV(3) jaos kirjeldatud meetodiga) asjaomase faktoriga (3).

3. ARVUTAMINE

Piima valgusisaldus massiprotsendina = 6,38 × lämmastiku kogusisaldus piimas protsentides.

VI. ERIKAALU MÄÄRAMINE

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Käesoleva standardmeetodiga täpsustatakse toor- ja täispiimas, osaliselt kooritu ja kooritud piimas 20 °C juures erikaalu määramise meetod.

2. MÄÄRATLUS

Piima erikaal on temperatuuril 20 °C teatud piimakoguse kaalu suhe sama veekoguse kaalu.

3. PÕHIMÕTE

Erikaal 20 °C juures määratakse hüdromeetriga.

4. VAHENDID JA KLAASTARVIKUD

Tavalised, eelkõige järgmised laboratooriumiseadmed:

4.1 **Hüdromeeter**

Erikaalu hüdromeeter on instrument, mis koosneb laia ja raske alumise osaga klaasujukist. Ujuki ülemise osa külge on kinnitatud ujuki poole kaldu asetsev klaaspulk; klaaspulga ülemine osa on kinni.

Klaasujukis on hüdromeetri kaalu kohandamiseks raskus (plii, elavhõbe, jne). Klaaspulgas on olemas skaalajaotus 1,025–1,035 g/ml.

Hüdromeetrit tuleks püknomeetrilise meetodiga kontrollida, kasutades selleks 100 ml mahuga püknomeetrit, mis on varustatud täpsustermomeetriga.

4.2 **Silindrid** (klaasist või roostevabast terasest).

Miinimummõõtmed peaksid olema:

— sisediameeter umbes 35 mm,

— sisekõrgus umbes 225 mm.

4.3 **Veevann** reguleeritud temperatuuril 20 ± 0,1 °C.

4.4 **Veevann** reguleeritud temperatuuril 40 ± 2 °C.

4.5 **Termomeeter**, mille skaalajaotus on 0,5 °C vahemikega.

5. TÖÖ KÄIK

5.1 Proov segatakse ümberpööramise teel, et rasv seguneks ning asetatakse veevanni (4.4). Proovil lastakse saavutada temperatuur 40 °C ja hoitakse sellel temperatuuril viis minutit. Segatakse põhjalikult hoolika ümberpööramise teel, et rasv oleks ühtlaselt jagunenud. Jahutatakse teises veevannis (4.3) temperatuurini 20 °C.

5.2 Proovi segatakse põhjalikult seda hoolikalt ümber pöörates nii, et õhk sisse ei pääseks. Piim valatakse silindrisse (4.2), mis on kaldus, et vältida vahu või mullide teket. Piimaproov peab olema piisav, et osa sellest voolaks silindrist välja kui hüdromeeter (4.1) selle sisse asetatakse. Hüdromeeter lastakse aeglaselt piima sisse ning kui see on tasakaalu saavutanud, lastakse sellel vabalt piimas hõljuda. Silinder asetatakse vertikaalselt. Hüdromeeter tuleb asetada vedelikkolonni keskele ja see ei tohiks puudutada silindri külgi.

5.3 Kui hüdromeeter on saavutanud tasakaalu märgitakse üles näit meniski ülaosas.

5.4 Kohe pärast hüdromeetri näidu lugemist pannakse proovi termomeeter (4.5) ja märgitakse 0,5 °C täpsusega üles temperatuur. Temperatuur ei tohi 20 kraadist erineda rohkem kui ± 2 °C.

6. TEMPERATUURI KORRIGEERIMINE

6.1 Kui piima temperatuur ei ole erikaalu mõõtmise hetkel täpselt 20 °C, tuleb saadud tulemust korrigeerida, lisades määratud erikaalule 0,0002 iga 20 °C ületava kraadi kohta, või lahutatakse 0,0002 iga 20 °C allapoole jääva kraadi kohta. Selliselt võib korrigeerida ainult siis kui piima temperatuur ei erine 20 °C rohkem kui 5 °C.

7. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Proovi erikaalu määramise meetod ja valem on väljendatud kooritud piima g/ml temperatuuril 20 °C ja arvutatakse järgmise valemi alusel:

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

kus

mv = hüdromeetri (5.4) näidult loetud proovi erikaal g/l

MG = rasvasisaldus proovis g/l

0,92 = rasva tihedus.

8. TÄPSUS

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

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

Liide

(II lisale)

ALTERNATIIVNE PROTSEDUUR, MILLES KASUTATAKSE SIFOONIGA VÕI PESUPUDELIGA RASVA EKSTRAHEERIMISE KOLBI

A.1. TÖÖ KÄIK

A.1.1. **Analüüsitava proovi ettevalmistamine**

Vaata 6.1.

A.1.2. **Analüüsitav kogus**

Toimitakse nagu punktis 6.2 kirjeldatud, kuid kasutades rasva ekstraheerimise kolbi (vt 5.6.).

Ekstraheerimiskolbi põhja pannakse võimalikult palju katsekogust.

A.1.3. **Pimekatse**

Vaata 6.3.

A.1.4. **Rasvakogumisnõu ette valmistamine**

Vt 6.4.

A.1.5. **Määramine**

A.1.5.1. Lisatakse 2 ml ammoniaagilahust (4.1.) või samaväärne kogus kontsentreeritumat ammoniaagilahust ja segatakse põhjalikult eelnevalt töödeldud katsekogusega kolbi põhjas. Pärast ammoniaagi lisamist tuleb viivitamatult määrata rasvasisaldus.

A.1.5.2. Lisatakse 10 ml etanooli (4.2.) ja segatakse ettevaatlikult kuid põhjalikult katseklaasi põhjas. Soovi korral lisatakse kaks tilka kongo punast või kresoolpunase lahust (4.3.).

A.1.5.3. Lisatakse 25 ml dietüüleetrit (4.4.), sulgetakse katseklaas vees küllastunud korgiga või vees niisutatud punniga (5.6.) ja loksutatakse katseklaasi tugevalt kuid mitte liiga (et vältida püsivate emulsioonide tekkimist) katseklaasi minuti jooksul korduvalt üles-alla pöörates. Vajaduse korral jahutatakse katseklaas jooksva vee all, siis eemaldatakse ettevaatlikult kork või punn ning loputatakse katseklaasi kaela segatud lahusega (4.6.) kasutades pesupudelit (5.8.) nii et loputatud vedelik voolaks katseklaasi.

A.1.5.4. Lisatakse 25 ml petrooleetrit (4.5.), sulgetakse katseklaas uuesti niisutatud korgi või punniga (mis on vettekastmise teel uuesti märjaks tehtud) ja raputatakse õrnalt 30 sekundit nagu punktis A.1.5.3. kirjeldatud.

A.1.5.5. Suletud kolbi tsentrifuugitakse üks kuni viis minutit pöörlemissagedusel 500–600 pööret minutis (5.2.). Kui tsentrifuug ei ole käepärast (vaata märkust 5.2.) lastakse suletud kolbil seista statiivil (5.7.) vähemalt 30 minutit kuni supernatandi kiht on selge ja veekihist selgelt eraldunud. Vajaduse korral jahutatakse katseklaasi jooksva vee all.

A.1.5.6. Kork või punn eemaldatakse ettevaatlikult ja loputatakse koos kolbi kaelaga vähese koguse segatud lahusega nii, et lahus voolab kolbi.

A.1.5.7. Klaasi sisestatakse sifoon või pesupudel ning surutakse mööda imitoru kuni ava on umbes 3 mm kihtidevahelisest piirist ülalpool. Imitoru on paralleelselt ekstraheerimistoru teljega.

Supernatantkiht viiakse ettevaatlikult torust välja ettevalmistatud rasvakogumisnõusse (6.4.), mis sisaldab natuke keedukivisid (5.10.) kolbi puhul (metallnõude puhul ei ole kohustuslik), vältides veekihi üleviimist. Ava loputatakse väikese koguse segatud lahusega, nii et vedelik kogutakse rasvakogumisnõusse.

A.1.5.8. Toru kaela ümber olev liitmik võetakse lahti, seda tõstetakse pisut ning selle imitoru loputatakse väikese koguse segatud lahusega. Toru lastakse allapoole, liitmik kinnitatakse uuesti loputusvedelik viiakse rasvakogumisnõusse.

Ava loputatakse väikese koguse segatud lahusega, nii et vedelik kogutakse nõusse. Soovi korral võib lahuse või osa sellest nõust destilleerimise või punktis 6.5.12. kirjeldatud aurutamise teel eemaldada.

A.1.5.9. Toru kaela ümber olev liitmik võetakse uuesti lahti, seda tõstetakse pisut ning torusse lisatakse 5 ml etanooli, kasutades etanooli imitoru loputamiseks. mix as described in A.1.5.2.

A.1.5.10. Viiakse läbi teine ekstraktsioon korrates punktides A.1.5.3. kuni A.1.5.8. kirjeldatud toiminguid ja kasutades ainult 15 ml dietüüleetrit (4.4.) ja 15 ml petrooleetrit (4.5.). Eelmise ekstraktsiooni ajal katseklaasist eemaldatud imitoru loputatakse eetriga.

A.1.5.11. Viiakse läbi kolmas ekstraktsioon korrates punktides A.1.5.3. kuni A.1.5.8. kirjeldatud toiminguid ja kasutades 15 ml dietüüleetrit ja 15 ml petrooleetrit ning loputades imitoru nagu punktis A.15.10. kirjeldatud.

Kooritud piima puhul võib kolmanda ekstraktsiooni ära jätta.

A.1.5.12. Toimitakse nagu punktides 6.5.12 kuni 6.5.16. kirjeldatud.