31992D0608

TARYBOS SPRENDIMAS

1992 m. lapkričio 14 d.

nustatantis termiškai apdoroto pieno, skirto tiesioginiam žmonių vartojimui, tyrimų ir analizės metodus

(92/608/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ TARYBA,

atsižvelgdama Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1985 m. rugpjūčio 5 d. Tarybos direktyvą 85/397/EEB dėl sveikatos ir gyvūnų sveikatos problemų, turinčių įtakos Bendrijos vidaus prekybai termiškai apdorotu pienu [1], ir ypač į jos 11 straipsnio 6 dalį,

atsižvelgdama į Komisijos pasiūlymą,

kadangi, pagal Direktyvos 85/397/EEB 11 straipsnio 6 dalį, Taryba privalo detaliai apibrėžti 11 straipsnio 2 dalyje numatytus patikrinimus; kadangi tokių patikrinimų, kuriuos atlieka įmonės, prižiūrimos bei periodiškai tikrinamos atsakingos oficialiosios valstybės institucijos, tikslas yra užtikrinti atitikimą Direktyvos 85/397/EEB ir ypač jos 3 straipsnio 3 dalies 3 punkto reikalavimams;

kadangi norint nustatyti patikrinimų taisykles, reikia nustatyti jų įgyvendinimo būdus;

kadangi turi būti numatyti metodai pieno bendrajam sausosios medžiagos, riebalų, sausosios neriebalinės medžiagos, bendrojo azoto ir baltymų kiekiui, taip pat termiškai apdoroto pieno, skirto tiesioginiam žmonių vartojimui lyginamajai masei (tankiui) nustatyti;

kadangi norint įvykdyti Direktyvos 85/397/EEB 3 straipsnio A dalies 3 paragrafo reikalavimus dėl techninių priežasčių pirmiausia reikia nustatyti pamatinius tyrimų ir analizės metodus; kadangi ypač svarbu išstudijuoti sąlygas, kuriose yra naudojami įprastiniai tyrimų ir analizės metodai; kadangi iki šios studijos rezultatų atsakingos valstybės institucijos privalo pasirūpinti, kad siekiant užtikrinti minėtų reikalavimų įvykdymą, būtų naudojami tinkami įprastiniai metodai;

kadangi siekiant užtikrinti vienodą rezultatų interpretavimą, minėtų metodų nustatymas turi susidaryti iš tyrimo procedūrų ir patikimumo kriterijų apibrėžimo,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

1 straipsnis

Turi būti naudojami šie termiškai apdoroto pieno tyrimų ir analizės metodai:

— bendrojo sausosios medžiagos kiekio nustatymo,

— riebalų kiekio nustatymo,

— bendrojo sausosios neriebalinės medžiagos kiekio nustatymo,

— bendrojo azoto kiekio nustatymo,

— baltymų kiekio nustatymo,

— lyginamosios masės nustatymo.

[1] OL L 226, 1985 8 24, p. 3, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 89/662/EEB (OL L 395, 1989 12 30, p. 13).

2 straipsnis

Pamatinių tyrimų ir analizės metodų atlikimas, jų tikslumo kriterijų nustatymas ir mėginių identifikavimas turi būti atliekamas, kaip nurodyta 1 priede.

3 straipsnis

1 straipsnyje nurodyti metodai yra pateikti II priede.

4 straipsnis

Šis sprendimas skirtas valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1992 m. lapkričio 14 d.

Tarybos vardu

Pirmininkas

J. GUMMER

I PRIEDAS

I. BENDROSIOS NUOSTATOS

1. ĮVADAS

Aprašomos bendrosios nuostatos, susijusios su reagentais, įranga, rezultatų pateikimu, tikslumu ir tyrimų protokolais. Šių nuostatų privalu laikytis valstybių narių atsakingoms įstaigoms ir laboratorijoms, atliekančioms mėginių ėmimą ir tyrimą.

2. REAGENTAI

2.1. **Vanduo**

2.1.1. Jeigu nenurodyta kitaip, tirpinimui, skiedimui, plovimui turi būti naudojamas distiliuotas, dejonizuotas arba bent jau ekvivalentiško grynumo demineralizuotas vanduo.

2.1.2. Jeigu nenurodyta kitaip, „tirpinimas“ arba „praskiedimas“ suprantama kaip „tirpinimas vandenyje“ arba „praskiedimas vandeniu“.

2.2. **Reagentai**

Visi naudojami reagentai turi būti analizinio grynumo, išskyrus tuos atvejus, kai nurodoma kitaip.

3. ĮRANGA

3.1. **Įrangos sąrašai**

Pamatinių metodų, įrangos sąrašuose nurodyta tik specialios paskirties arba ypatinga įranga naudojama pagal konkrečius techninius reikalavimus.

3.2. **Analizinės svarstyklės**

Analizinės svarstyklės – svarstyklės, kuriomis galima pasverti 0,1 mg tikslumu.

4. REZULTATŲ PATEIKIMAS

4.1. **Rezultatai**

Nesant kitų nurodymų, tyrimų protokole (6 p.), turi būti pateikti rezultatai, išreikšti aritmetiniu vidurkiu dviejų tyrimų, kurie atitinka tam metodui nurodytą pakartojamumo kriterijų (5.1.1 p.). Jeigu pakartojamumo kriterijus nepatenkinamas, tyrimą, esant galimybei, reikia pakartoti, arba rezultatas vertinamas kaip neteisingas.

4.2. **Procentų skaičiavimas**

Išskyrus tuos atvejus, kai nurodyta kitaip, rezultatas turi būti skaičiuojamas mėginio masės procentais.

5. TIKSLUMO KRITERIJAI: REZULTATŲ PAKARTOJAMUMAS IR ATKURIAMUMAS

5.1. Kiekvieno metodo tikslumo kriterijai yra šie:

5.1.1. *Pakartojamumas (r)* tai reikšmė, mažesnė už dviejų atskirų tyrimų, atliktų per trumpą laiko tarpą su tuo pačiu mėginiu, naudojant tą pačią procedūrą, tomis pačiomis sąlygomis (to paties analitiko, ta pačia įranga, toje pačioje laboratorijoje) absoliutų rezultatų skirtumą;

5.1.2. *Atkuriamumas (R)* – tai reikšmė, mažesnė už dviejų atskirų tyrimų, atliktų su tuo pačiu mėginiu, tuo pačiu metodu, skirtingomis sąlygomis (skirtingo analitiko, skirtinga įranga, laboratorija, ir (arba) skirtingu laiku), absoliutų rezultatų skirtumą;

5.1.3. Jeigu nenurodyta kitaip, pakartojamumo ir atkuriamumo kriterijų reikšmės kiekvieno metodo kiekvienai procedūrai nurodytos su 95 % tikimybe pagal ISO 5725: 1986 2 leidimą;

5.1.4. Būtini palyginamieji tyrimai ir analizė turi būti planuojami ir atliekami pagal tarptautines rekomendacijas.

6. TYRIMŲ PROTOKOLAS

Tyrimų protokole turi būti nurodytas taikytas analizės metodas ir gauti rezultatai. Be to, jame turi būti nurodytos visos procedūros detalės, jei jos nenurodytos analizės metode arba yra pasirinktinos, taip pat bet kurios kitos aplinkybės, kurios galėjo paveikti gautus rezultatus. Tyrimų protokole turi būti pateikta visa pilna mėginio identifikavimui būtina informacija.

II. TERMIŠKAI APDOROTO PIENO MĖGINIŲ ĖMIMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Ši procedūra apibrėžia termiškai apdoroto pieno mėginių paėmimo, jų pervežimo ir saugojimo pamatinį metodą.

2. BENDROSIOS NUOSTATOS

Termiškai apdoroto pieno mėginius iš didelių talpyklų turi imti kvalifikuotas, tinkamai prieš atliekant pieno mėginių ėmimą apmokytas asmuo.

Jei atsakingos valstybės institucijos ar laboratorijos laiko būtina, jos turi apmokyti mėginius imantį personalą mėginių paėmimo technikos, siekiant užtikrinti, kad mėginys būtų reprezentatyvus bei atitiktų visą partiją.

Jeigu atsakingos valstybės institucijos ar tyrimų laboratorijos laiko būtina, jos turi apmokyti mėginius imantį personalą, kaip ženklinti mėginį, kad būtų užtikrintas mėginio identiškumas.

3. MĖGINIŲ ĖMIMO ĮRANGA

3.1. **Bendrosios nuostatos**

Mėginių ėmimo įranga, turi būti pagaminta iš nerūdijančio plieno ar kitos tinkamos, tokio pat tvirtumo medžiagos, ir tokios konstrukcijos, kad tiktų numatomiems tikslams (maišymui, mėginių ėmimui ir kt.). Skysčiams maišyti didelėse talpyklose skirtos nardinamosios maišyklės ir maišytuvai turi būti tokio dydžio, kad sukeltų pakankamą skysčio judėjimą, bet dėl maišymo neatsirastų gaižus kvapas. Samčiai privalo turėti standžią, pakankamo ilgio rankeną, leidžiančią paimti mėginį iš bet kurio talpyklos gylio. Samčio talpa turi būti ne mažesnė nei 50 ml.

Mėginių tara ir jos dangčiai turi būti pagaminti iš stiklo, tinkamų metalų ar plastikų.

Medžiagos, iš kurių pagaminta mėginių įranga (įskaitant indus ir dangčius), turi nesukelti jokių pokyčių mėginyje, galinčių paveikti tyrimų rezultatus. Visi mėginių paėmimo priemonių paviršiai turi būti švarūs, sausi, lygūs, be įtrūkimų, visi kampai turi būti užapvalinti.

4. MĖGINIŲ ĖMIMO METODIKA

4.1. **Bendrosios nuostatos**

Nepriklausomai nuo to, kokie turi būti atlikti tyrimai, prieš paimant mėginius, pienas turi būti kruopščiai išmaišytas rankiniu ar mechaniniu būdu.

Mėginys turi būti paimtas iš kart po išmaišymo, iš dar judančio pieno.

Mėginio dydis privalo atitikti tyrimo metodo reikalavimus. Mėginių taros talpa turi būti tokia, kad mėginys ją beveik pilnai užpildytų bei leistų tinkamai išmaišyti turinį prieš atliekant tyrimą, tačiau neleistų turiniui susiplakti pervežant.

4.2. **Mėginių ėmimas rankiniu būdu**

4.2.1. *Mėginių ėmimas iš pieno siuntos, esančios daugiau nei vienoje talpykloje*

Jeigu pieno mėginys imamas iš daugiau nei vienos talpyklos, iš kiekvienos jų reikia paimti reprezentatyvų pieno kiekį, pažymint pieno kiekį talpykloje, iš kurios imtas mėginys. Jeigu nereikia analizuoti pieno mėginių iš kiekvienos talpyklos atskirai, sudaromas sudėtinis mėginys sumaišant reprezentatyvius pieno mėginius santykiu, atitinkančiu pieno kiekius talpyklose, iš kurių jie buvo paimti. Mėginys tyrimui turi būti imamas iš šio sudėtinio mėginio jį išmaišius.

4.2.2. *Mėginių ėmimas iš didelių talpų – laikymo rezervuarų, geležinkelių ir automobilių cisternų*

4.2.2.1. Prieš imant mėginius pieną kruopščiai išmaišyti tinkamu būdu.

Didelių talpyklų arba laikymo rezervuarų, geležinkelio ir autocisternų turinio maišymui rekomenduojamas mechaninis būdas (4.4.2.2 p.).

Maišymo intensyvumas priklauso nuo laiko, kurį pienas buvo ramybės būklėje. Konkrečiu atveju taikomų maišymo metodų efektyvumas turi atitikti numatomas atlikti analizes. Maišymo efektyvumas turi didelės įtakos mėginių, paimtų iš skirtingų siuntos vietų, arba iš rezervuaro išleidimo angos, analizės rezultatų tikslumui. Pieno (neapdoroto pieno arba nenugriebto pieno) maišymo procedūra yra efektyvi, jeigu dviejų, skirtingomis sąlygomis paimtų mėginių riebalų kiekio tyrimo rezultatų skirtumas yra ne didesnis kaip 0,1 %.

Didelėje talpykloje su dugne esančia išpylimo anga išleidimo vietoje gali būti nedidelis pieno kiekis, kuris netgi po sumaišymo neatitinka viso kiekio. Todėl mėginius geriau imti per užpildymo liuką. Jei mėginiai imami per išleidimo angą, išleidžiamas pakankamas pieno kiekis norint užtikrinti, kad tie mėginiai atitiktų visą pieną.

4.2.2.2. Didelėse talpyklose, laikymo rezervuaruose, geležinkelio ar automobilių cisternose pieną galima maišyti:

— cisternose įmontuotu mechaniniu maišytuvu su elektros variklio pavara,

— elektros variklio varoma sparnuote ar maišytuvu, įleistomis per užpildymo angą taip, kad maišyklė būtų panardinta piene,

— recirkuliuojant pieną per perpylimo žarną, prijungtą prie geležinkelių ir autocisternų išleidimo siurblių ir įleistą per užpildymo angą,

— švariu filtruotu suspaustu oru. Šiuo atveju, siekiant išvengti gaižaus kvapo, reikėtų naudoti minimalų oro slėgį ir tūrį.

4.3. **Termiškai apdoroto pieno, skirto tiesiogiai vartoti žmonėms, mėginių ėmimas iš mažmeninės prekybos pakuotės**

Tiesioginiam vartojimui skirto termiškai apdoroto pieno prekinėje pakuotėje mėginį sudaro visa nepažeista pakuotė. Jeigu galima, mėginys turi būti imamas iš pakavimo mašinos arba šaldymo patalpos kaip galima greičiau po perdirbimo (pasterizuotas pienas – pagaminimo dieną).

Termiškai apdoroto pieno (pasterizuoto, apdoroto ultra aukšta temperatūra, sterilizuoto) imamas mėginių kiekis turi atitikti atliekamų tyrimų skaičių ir laboratorijos ar atsakingos institucijos nustatytas metodikas.

5. MĖGINIO IDENTIFIKAVIMAS

Mėginys turi būti ženklinamas tokiu identifikaciniu kodu, kad laboratorija ar atsakinga institucija galėtų lengvai jį identifikuoti.

6. MĖGINIŲ KONSERVAVIMAS, GABENIMAS IR LAIKYMAS

Pagal kompetentingos nacionalinės institucijos nurodymus tyrimų laboratorija turi parengti instrukcijas dėl pieno mėginių konservavimo sąlygų (cheminių medžiagų, temperatūros), gabenimo, laikymo ir laiko tarpo tarp mėginių ėmimo ir tyrimo, atsižvelgiant į pieno rūšį ir naudojamą tyrimo metodą.

Instrukcijoje turi būti akcentuota, kad:

— gabenimo ir laikymo metu turi būti imamasi apsaugos priemonių, siekiant apsaugoti mėginį nuo užteršimo pašaliniais kvapais ir tiesioginio saulės šviesos poveikio. Jei mėginio tara yra peršviečiama, ji turi būti laikomas tamsioje vietoje.

II PRIEDAS

I. BENDROJO SAUSOSIOS MEDŽIAGOS KIEKIO NUSTATYMAS.

1. TAIKYMO SRITIS

Numatyta procedūra yra sausosios medžiagos kiekio piene nustatymo pamatinis metodas.

2. APIBRĖŽIMAS

Bendrasis sausųjų medžiagų kiekis – masė, likusi atlikus nurodytą džiovinimo procedūrą ir išreikšta masės procentu.

3. METODO ESMĖ

Vandens išgarinimas iš mėginio džiovinimo krosnelėje, esant 102 ± 2 °C temperatūrai.

4. ĮRANGA

Naudojama įprastinė ir ši laboratorinė įranga:

4.1. **Analizinės svarstyklės**

4.2. **Eksikatorius** su efektyviu desikantu (pavyzdžiui, šviežiai išdžiovintu silicio geliu su vandens kiekio indikatoriumi).

4.3. Ventiliuojama ir termostatu valdoma **džiovinimo krosnelė**, kurios visoje darbinėje aplinkoje nustatoma 102 ± 2 °C temperatūra.

4.4. **Biuksai plokščiais dugnais**, kurių aukštis nuo 20 iki 25 mm, skersmuo nuo 50 iki 75 mm, pagaminti iš atitinkamos medžiagos, su gerai priglundančiais ir lengvai nuimamais dangčiais.

4.5. **Verdančio vandens vonelė**

4.6. **Homogenizatorius**

5. MĖGINIO PARUOŠIMAS

Pieno mėginys pašildomas iki 20–25 °C. Kruopščiai išmaišomas, kad riebalai vienodai pasiskirstytų visame mėginyje. Energingas maišymas, kuris galėtų sukelti pieno putojimą ar riebalų grūdelių susidarymą, vengtinas. Jeigu yra sunku išmaišyti susidariusį grietinėlės sluoksnį, pienas lėtai pašildomas iki 25–40 °C temperatūros ir atsargiai maišoma, įmaišant visą, prie mėginio taros sienelių prilipusią, grietinėlę. Mėginys greitai atšaldomas iki 20–25 C temperatūros.

Geresniam riebalų išsimaišymui galima naudoti homogenizatorių.

Negalima tikėtis teisingų rezultatų, jeigu mėginyje yra išsiskyrusių skystų riebalų ar prie indo sienelių prikibusių atskirų, netaisyklingos formos baltų dalelių.

6. TYRIMO PROCEDŪRA

6.1. **Biuksų paruošimas:**

Biuksas (4.4 p.) ir šalia jo padėtas dangtelis pakaitinami džiovinimo krosnelėje, (4.3 p.) 102 ± 2 °C temperatūroje, ne trumpiau kaip 30 minučių. Biuksas uždengiamas dangteliu ir tuoj pat perkeliamas į eksikatorių (4.2 p.), leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros (trumpiausiai per 30 minučių) ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.2. **Mėginys**

Į paruoštą biuksą (6.1 p.) 0,1 mg tikslumu pasveriama 3–5 g paruošto mėginio (5 p.).

6.3. **Nustatymas**

6.3.1. Biuksas 30 minučių pašildomas verdančio vandens vonioje (4.5 p.).

6.3.2. Biuksas kaitinamas su greta jo padėtu dangčiu džiovinimo krosnelėje (4.3 p.), nustatytoje 102 ± 2 °C temperatūroje dvi valandas. Biuksas uždengiamas dangteliu ir išimamas iš džiovinimo krosnelės.

6.3.3. Biuksas atvėsinamas eksikatoriuje (4.2 p.) iki kambario temperatūros (mažiausiai 30 min.) ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.3.4. Biuksas su greta jo padėtu dangčiu vėl kaitinamas 1 val. džiovinimo krosnelėje. Biuksas uždengiamas dangteliu,ir išimamas iš džiovinimo krosnelės. Vėsinama eksikatoriuje apytikriai 30 min. ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.3.5. Kartojami 6.3.4 punkte nurodyti veiksmai, kol masės skirtumas tarp dviejų vienas po kito atliktų svėrimų neviršys 0,5 mg. Užrašoma žemiausia masės vertė.

7. REZULTATŲ PATEIKIMAS

7.1. **Apskaičiavimas ir formulė**

Bendrasis sausosios medžiagos kiekis, skaičiuojamas masės procentais, pagal formulę:

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

kurioje:

WT = bendrasis sausosios medžiagos kiekis gramais 100 g produkto;

m_0 = biukso ir dangtelio masė gramais (6.1 p.),

m_1 = biukso, dangtelio ir mėginio masė gramais (6.2 p.),

m_2 = biukso, dangtelio ir išdžiovinto mėginio masė gramais (6.3.5 p.).

Rezultatas apvalinamas 0,01 % (masės procentais) tikslumu.

7.2. **Tikslumas:**

7.2.1. *Pakartojamumas (r)* – 0,10 g sausosios medžiagos 100 g produkto.

7.2.2. *Atkuriamumas (R)* – 0,20 g sausosios medžiagos 100 g produkto.

II. **RIEBALŲ KIEKIO NUSTATYMAS**

1. TAIKYMO SRITIS

Numatyta procedūra yra riebalų kiekio nustatymo žaliame, nenugriebtame, iš dalies nugriebtame ir nugriebtame piene pamatinis metodas.

2. APIBRĖŽIMAS

Pieno riebalų kiekis – visos medžiagos, nustatytos naudojant nurodytą metodą. Jis yra išreiškiamas masės procentu.

3. METODO ESMĖ

Mėginys, ištirpintas amoniako ir etanolio tirpale, yra ekstrahuojamas su dietileteriu ir petroleteriu, tirpikliai pašalinami distiliacijos ar išgarinimo būdu, ir nustatoma ekstrahuotos medžiagos, ištirpusios petroleteryje, masė. (Šis metodas yra žinomas kaip Rosse-Gottlieb metodas).

4. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti analizinio grynumo ir turi nepalikti pastebimų nuosėdų atliekant tuščiąjį tyrimą.

Siekiant išbandyti reagentų kokybę, reikia atlikti 6.3 punkte nurodytas procedūras. Svėrimui naudojama tuščia kolba, menzūra ar metalinis indas (5.8 p.), paruošti kaip nurodyta 6.4 p., (tai leidžia patikslinti dėl aplinkos sąlygų poveikio netikslius svėrimo rezultatus). Jeigu tuščiojo tyrimo likutis (nuosėdos), pakoreguotas dėl taros masės tariamo pokyčio, yra didesnis už 2,5 mg, tuomet reikia nustatyti tirpiklių nuosėdas atskirai, išgarinant atitinkamai 100 ml dietilo eterio (4.4 p.) ir 100 ml petroleterio (4.5 p.). Masės kontrolei taip pat naudojamas tuščias kontrolės indas. Jei nuosėdos viršija 2,5 mg, tirpiklis išgryninamas distiliacijos būdu arba jis pakeičiamas.

4.1. **Amoniako skiedinys**, turintis apie 25 % (m/m) NH3. Gali būti taip pat naudojamas aukštesnės koncentracijos amoniako tirpalas (žr. 6.5.1 ir A.1.5.1 p.).

4.2. **Etanolis** min. 94 % koncentracijos. Įsitikinus, kad tai neturės įtakos analizės rezultatams, gali būti naudojamas metanoliu denatūruotas etanolis.

4.3. **Kongo arba Kresol raudonųjų dažų tirpalas.**

1 g Kongo arba Kresol raudonųjų dažų ištirpinama vandenyje ir atskiedžiama iki 100 ml.

Pastaba. Šio skiedinio, leidžiančio aiškiau pamatyti tarpfazinę ribą tarp tirpiklio ir vandens sluoksnių, naudojimas yra pasirinktinis (žr. 6.5.2 p.). Gali būti naudojami kiti spalvoti vandens skiediniai, jeigu jie neturi įtakos nustatomam rezultatui.

4.4. **Dietileteris** be peroksidų, turintis ne daugiau nei 2 mg/kg antioksidantų ir atitinkantis tuščiojo tyrimo (6.3 p.) reikalavimus.

4.5. **Petroleteris**, kurio virimo temperatūra tarp 30!!! error character !!! B!!! error character !!! Ί ir 60 °C.

4.6. **Tirpiklių mišinys**, paruoštas prieš pat naudojimą sumaišius vienodus dietilo eterio (4.4 p.) ir petroleterio (4.5 p.) tūrius.

5. ĮRANGA

Įspėjimas! Kadangi tyrimui naudojami lakūs degūs tirpikliai, visi naudojami elektros prietaisai turi atitikti norminių dokumentų, susijusių su šių tirpiklių naudojimu, saugos reikalavimus.

Naudojama įprastinė ir ši laboratorinė įranga:

5.1. **Analizinės svarstyklės**

5.2. **Centrifuga**, kurioje riebalų ekstrakcijos kolbos ar mėgintuvėliai (5.6 p.) sukasi nuo 500 iki 600 aps. per minutę greičiu, ir labiausiai nutolusiame kolbų ir mėgintuvėlių gale sukuriamas 80–90 g gravitacinis laukas.

Pastaba. Centrifugos naudojama pasirinktinai (6.5.5 p.).

5.3. **Distiliacijos ar garinimo aparatas**, leidžiantis tirpiklius ir etilo alkoholį išdistiliuoti iš kolbų ar riebalų surinkimo indų bei išgarinti iš menzūrų ar lėkštelių (6.5.12 ir 6.5.15 p.) ne aukštesnėje nei 100 °C temperatūroje.

5.4. Elektrinė džiovinimo **krosnelė** su visiškai atidaromomis ventiliacijos angomis, kurios visoje darbo erdvėje palaikoma 102 ± 2 °C temperatūra. Krosnelėje turi būti įmontuotas atitinkamas termometras.

5.5. **Vandens vonia**, kurioje palaikoma 35–40 °C temperatūra.

5.6. ***Majonnier* tipo riebalų ekstrakcijos kolbos**

Pastaba. Taip pat galima naudoti riebalų ekstrakcijos mėgintuvėlius su sifonu ar plovyklės jungiamosiomis dalimis, bet tuomet skiriasi procedūra. Ji yra aprašyta priede.

Kolbos ar mėgintuvėliai privalo turėti šlifuoto stiklo ar geros kokybės kamštmedžio kamščius ar kitus kaiščius, kurių nepaveiktų naudojami reagentai. Kamštmedžio kamščiai turi būti ekstrahuojami su dietileteriu (4.4), laikomi, esant 60 ar daugiau °C, vandenyje 15 min., ir, po to, vandenyje jiems turi būti leidžiama atvėsti, kad naudojant jie būtų prisotinti vandeniu.

5.7. **Stovelis** riebalų ekstrakcijos kolboms (ar mėgintuvėliams) laikyti (žr. 5.6 p.).

5.8. **Plautuvas**, tinkamas naudoti su tirpiklių mišiniu (4.6 p.). Neturi būti naudojamas plastikinis plautuvas.

5.9. **Riebalų surinkimo indai**, pavyzdžiui, virinimo kolbos (su plokščiu dugnu), Erlenmeyerio kolbos, kurių talpa 125–250 ml ar metaliniai indai. Jei naudojamos metalinės lėkštelės, pageidautina, kad jos būtų iš nerūdijančio plieno, turėtų plokščią dugną. Pageidautina, kad jie būtų su snapeliu ir jų skersmuo būtų nuo 80 iki 100 mm, o aukštis apie 50 mm.

5.10. Virinimą reguliuojančios **pagalbinės priemonės**, nuriebalinti, beporio porceliano, silicio karbido ar stiklo karoliukai (nebūtini naudojant metalines lėkšteles.

5.11. 5 ir 25 ml talpos **matavimo cilindrai**.

5.12. 10 ml talpos graduotos **pipetės**.

5.13. Metalinės **žnyplės** kolboms, menzūroms ar lėkštelėms laikyti.

6. TYRIMO PROCEDŪRA

Pastaba. Alternatyvi procedūra, naudojant riebalų ekstrakcijos mėgintuvėlius su sifonu ar plautuvo jungiamosiomis dalimis (5.6 p.), aprašyta priedo papildyme.

6.1. **Mėginio paruošimas**

Mėginys pašildomas 15 min. 35–40 °C temperatūros vandens vonelėje. Kruopščiai, bet atsargiai, sumaišomas keliskart vartant indą su mėginiu tokiu būdu, kad nesusidarytų putos ar riebalų kruopelės, ir greitai ataušinama iki 20 °C.

6.2. **Mėginys**

Mėginys (6.1 p.) sumaišomas atsargiai vartant butelį 3 ar 4 kartus ir nedelsiant pasveriamas tiesiogiai ar iš skirtumo 1 mg tikslumu 10 iki 11 g mėginį į vieną iš ekstrahavimo kolbų (5.6 p.).

Mėginys turi kiek galint pilniau užpildyti ekstrahavimo kolbos apatinį (mažąjį) rutuliuką.

6.3. **Tuščiasis tyrimas**

Šis tyrimas atliekamas kartu su tikruoju tyrimu, naudojant tą pačią procedūrą ir tuos pačius reagentus, tik pakeitus mėginį 10–11 ml vandens.

Riebalų surinkimo indo tariamas masės pokytis, pakoreguotas pagal kontrolinio indo masės tariamą masės pokytį, neturėtų būti didesnis už 2,5 mg.

6.4. **Riebalų surinkimo indo parengimas**

Indas (5.9 p.) kartu su keliomis virinimą reguliuojančiomis priemonėmis (5.10 p.), naudojamomis palaikyti lengvą virimą pašalinant tirpiklį, kaitinamas 1 val. džiovinimo krosnelėje (5.4 p.). Indui leidžiama atvėsti (ne eksikatoriuje, bet apsaugant nuo dulkių) iki svėrimo kambario temperatūros (stikliniai indai mažiausiai 1 val., metalinės lėkštelės – mažiausiai 30 min.). Siekiant išvengti temperatūros svyravimų, indas žnyplėmis padedamas ant svarstyklių ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

6.5. **Analizė**

6.5.1. Į ekstrahavimo kolbą pridedama 2 ml amoniako tirpalo (4.1 p.) ar ekvivalentiškas tūris didesnės jo koncentracijos, kruopščiai sumaišoma su mėginiu kolbos mažajame rutuliuke ir nedelsiant atliekama analizė.

6.5.2. Pridedama 10 ml etanolio (4.2 p.) ir kruopščiai, bet atsargiai, sumaišoma, leidžiant kolbos turiniui tekėti pirmyn ir atgal tarp dviejų rutuliukų; stengiamasi, kad skystis nepriartėtų per arti prie kolbos kaklelio. Galima įlašinti du lašus Kongo ar Kresolio raudonų dažų skiedinio (4.3 p.).

6.5.3. Pridedama 25 ml dietileterio (4.4 p.), kolba užkemšama vandenyje išmirkytu kamščiu ar vandeniu sudrėkintu kaiščiu (5.6 p.) ir energingai purtoma vieną minutę laikant ją horizontalioje padėtyje, o mažąjį rutuliuką į viršų, tačiau ne per smarkiai (kad nesusidarytų stabili emulsija). Skysčiui, esančiam didžiajame rutuliuke, leidžiama periodiškai nubėgti į mažąjį rutuliuką. Reikalui esant, kolba ataušinama tekančiu vandeniu, po to, atsargiai ištraukiamas kamštis ar kaištis ir jis bei kolbos kaklelio vidinė dalis nuplaunami nedideliu tirpiklių mišinio (4.6 p.) kiekiu, naudojant plautuvo jungiamąją dalį (5.8 p.), tokiu būdu, kad nuoplovos subėgtų į kolbą.

6.5.4. Pridedama 25 ml petroleterio (4.5 p.), kolba užkemšama iš naujo prisotintu vandens kamščiu ar kaiščiu (iš naujo sušlapinama, panardinant į vandenį) ir kolba atsargiai kratoma 30 sek., kaip aprašyta 6.5.3 p.

6.5.5. Uždaryta kolba centrifuguojama nuo 1 iki 5 min. 500–600 aps./min greičiu (5.2 p.). Jei centrifugos nėra (žr. 5.2 p. pastabą), uždaryta kolba stovelyje (5.7 p.) laikoma 30 min. kol viršutinis sluoksnis nuskaidrės ir ryškiai atsiskirs nuo vandeninio sluoksnio. Reikalui esant, kolba atvėsinama tekančiame vandenyje.

6.5.6. Kamštis ar kaištis atsargiai ištraukiamas, jis ir kolbos kaklelio vidinė dalis nuplaunami nedideliu tirpiklių mišinio kiekiu (4.6 p.), tokiu būdu, kad nuoplovos subėgtų į kolbą.

Jeigu skiriamasis paviršius yra žemiau kolbos kaklelio apačios, jis pakeliamas truputį virš šio lygio, atsargiai pilant vandenį indo sienele, kad palengvėtų tirpiklio dekantavimas.

6.5.7. Laikant ekstrahavimo kolbą už mažojo rutuliuko, kiek galint daugiau viršutinio sluoksnio atsargiai perpilama į parengtą riebalų surinkimo kolbą (6.4 p.), kurioje yra keletas virinimo reguliavimo priemonių (5.10 p.) (metalinėse lėkštelėse jų naudoti nebūtina) vengiant vandeninio sluoksnio išsipylimo.

6.5.8. Išorinė ekstrakcijos kolbos kaklelio pusė nuplaunama nedideliu tirpiklių mišinio (4.6 p.) kiekiu, surenkant nuoplovas į riebalų surinkimo indą prižiūrint, kad tirpiklių mišinys nenutekėtų išorine ekstrahavimo kolbos puse.

Esant reikalui, tirpiklis ar jo dalis gali būti pašalinta iš indo distiliacijos ar garinimo būdu kaip aprašyta 6.5.12 p.

6.5.9. Į ekstrahavimo kolbos turinį pridedama 5 ml etanolio (4.2 p.), juo apiplaunant kolbos kaklelio vidinę pusę ir sumaišant kaip nurodyta 6.5.2 p.

6.5.10. Ekstrahuojama antrą kartą, pakartojant 6.5.3–6.5.8 p. imtinai nurodytas procedūras, bet naudojant tik 15 ml dietileterio (4.4 p.) ir 15 ml petroleterio (4.5 p.); ekstrahavimo kolbos kaklelio vidinė pusė praskalaujama eteriu. Reikalui esant, skiriamasis paviršius pakeliamas virš kolbos kaklelio vidurio, kas leidžia pasiekti kiek galima pilnesnę tirpiklio galutinę dekantaciją.

6.5.11. Atliekama trečia ekstrakcija kartojant 6.5.3–6.5.8 p. imtinai aprašytas procedūras, bet naudojant tik 15 ml dietileterio (4.4 p.) ir 15 ml petroleterio (4.5 p.); ekstrahavimo kolbos kaklelio vidinė pusė praplaunama eteriu. Reikalui esant,skiriamasis paviršius pakeliamas virš kolbos kaklelio vidurio, kas leistų kiek galima pilnesnę tirpiklio galutinę dekantaciją.

Trečios ekstrakcijos galima nedaryti nugriebtam pienui.

6.5.12. Iš kolbos kiek galima labiau pašalinami tirpikliai (įskaitant etanolį) distiliacijos, o iš menzūros ar lėkštelės – išgarinimo (5.3 p.) būdu, prieš pradedant distiliaciją praplovus kolbos kaklelio vidų nedideliu tirpiklių mišinio (4.6 p.) kiekiu.

6.5.13. Riebalų surinkimo indas krosnyje (5.4 p.) kaitinamas vieną valandą (kolbą padėjus ant šono, kad išgaruotų tirpikliai). Riebalai iš krosnies išimami į surinkimo indą, leidžiama atvėsti iki kambario, kuriame atliekamas svėrimas, temperatūros (ne eksikatoriuje, bet apsaugojus nuo dulkių), stiklo indams – ne trumpiau kaip 1 val., metaliniams indams – ne mažiau kaip 30 min., ir pasveriama 0,1 mg tikslumu.

Indas prieš pat svėrimą nešluostomas. Indas padedamas ant svarstyklių žnyplėmis, kad išvengtų temperatūros svyravimų.

6.5.14. Kartojamos 6.5.13 p. aprašytos procedūros, kol riebalų surinkimo indo paskutiniųjų dviejų vienas po kito sekančių svėrimų masės sumažėjimas arba padidėjimas neviršys 0,5 mg. Užregistruota mažiausia masė laikoma riebalų surinkimo indo ir ekstrahuotos medžiagos mase.

6.5.15. Siekiant patikrinti ar ekstrahuota medžiaga yra visiškai tirpi, į riebalų surinkimo indą pridedama 25 ml petroleterio. Lengvai pašildoma ir tirpiklis sukamas, kol ištirps visi riebalai.

Jei ekstrahuota medžiaga visiškai ištirpsta petroleteryje, riebalų mase laikomas skirtumas tarp surinkimo indo su išekstrahuotomis medžiagomis (6.5.14 p.) galutinės masės ir pradinės masės (6.4 p.).

6.5.16. Jei ekstrahuota masė ne pilnai ištirpsta petroleteryje ar esant abejonei, riebalai pilnai ekstrahuojami iš indo, pakartotinai plaunant šiltu petroleteriu.

Bet kokiam neištirpusios medžiagos pėdsakui leidžiama nusėsti ir petroleteris atsargiai perpilamas, nepašalinant neištirpusios medžiagos. Šis veiksmas pakartojamas dar tris kartus, petroleteriu praplaunant kaklelio vidų.

Galiausiai indo viršaus išorinė pusė tirpiklio mišiniu nuplaunama tokiu būdu, kad tirpiklis nenutekėtų per indo išorinę pusę. Petroleterio garai pašalinami iš indo pakaitinus jį vieną valandą džiovinimo krosnelėje, leidžiama atvėsti ir pasveriama, kaip aprašyta 6.5.13 ir 6.5.14 punktuose.

Riebalų mase laikomas skirtumas tarp 6.5.14 p. nustatytos masės ir šios galutinės masės.

7. REZULTATŲ PATEIKIMAS

7.1. **Apskaičiavimas ir formulė**

Riebalų kiekis, masės procentais:

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

kurioje

F = riebalų kiekis masės procentais,

m_0 = mėginio (6.2 p.) masė gramais,

m_1 = riebalų surinkimo indo ir išekstrahuotų medžiagų pagal 6.5.14 p. masė gramais,

m_2 = paruošto riebalų surinkimo indo arba neištirpus medžiagoms, riebalų surinkimo indo su netirpiomis medžiagomis, nustatytomis pagal 6.5.16 p. masė gramais,

m_3 = riebalų surinkimo indo, naudoto tuščiajam tyrimui (6.3 p.) ir išekstrahuotų medžiagų pagal 6.5.14 p. masė gramais,

m_4 = paruošto riebalų surinkimo indo (6.4 p.), naudoto tuščiajam tyrimui (6.3 p.) arba neištirpus medžiagoms, riebalų surinkimo indo ir netirpių medžiagų, nustatytų pagal 6.5.16 p. masė gramais.

Rezultatai apskaičiuojami 0,01 % (pagal masę) tikslumu.

7.2. **Tikslumas**

7.2.1. *Pakartojamumas (r)*::

— nenugriebtam pienui ir pusriebiam pienui: 0,02 g riebalų 100 g produkto,

— nugriebtam pienui: 0,01 g riebalų 100 g produkto;

7.2.2. *Atkuriamumas (R)*::

— nenugriebtam pienui: 0,04 g riebalų 100 g produkto,

— pusriebiam pienui: 0,03 g riebalų 100 g produkto,

— nugriebtam pienui: 0,025 g riebalų 100 g produkto.

III. BENDROJO SAUSOSIOS NERIEBALINĖS MEDŽIAGOS KIEKIO NUSTATYMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Numatyta procedūra yra termiškai apdoroto pieno bendrojo sausosios neriebalinės medžiagos kiekio nustatymo pamatinis metodas.

2. APIBRĖŽIMAS IR SKAIČIAVIMAS

Bendrasis sausosios neriebalinės medžiagos kiekis turi būti išreikštas masės procentu.

Neriebalinių sausųjų medžiagų kiekis yra lygus:

bendrajam sausosios medžiagos kiekiui (žr. I skyrių) minus riebalų kiekis (žr. II skyrių).

IV. BENDROJO AZOTO KIEKIO NUSTATYMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Tai pamatinis tyrimo metodas bendrajam azoto kiekiui nustatyti žaliame, nenugriebtame, dalinai nugriebtame ir nugriebtame piene.

2. APIBRĖŽIMAS

Bendrasis azoto kiekis piene – azoto kiekis, išreikštas masės procentu, nustatytas naudojant Kjeldalio metodą.

3. METODO ESMĖ

Pasvertas pieno mėginys mineralizuojamas koncentruota sieros rūgštimi, naudojant katalizatorius kalio sulfatą ir vario (II) sulfatą, siekiant paversti organinį azotą amonio sulfatu. Amoniakas yra išskiriamas pridėjus natrio hidroksido tirpalo, po to, distiliuojant ir absorbuojant boro rūgšties skiedinyje bei titruojant rūgšties tirpalu.

4. REAGENTAI

4.1. **Kalio sulfatas** (K_2SO_4).

4.2. **Vario sulfato tirpalas,** 5,0 g vario (II) sulfato ištirpinama pentahidrato ($CuSO_4, 5H_2O$) vandenyje 20 °C ir atskiedžiama iki 100 ml tūrio matavimo kolboje.

4.3. **Sieros rūgštis**, ne mažiau kaip 98 % (m/m) H_2SO_4.

4.4. **Natrio hidroksido tirpalas**, 47 % (m/m) 704 g NaHCl/l (20 °C).

Pastaba. *Gali b*ūti naudojamas mažesnės koncentracijos natrio hidroksido tirpalas, pavyzdžiui, 40 % (m/m) 572 g/l, 20 °C arba 30 % (m/m) 399 g/l 20 °C.

4.5. **Boro rūgšties tirpalas,** 40 g boro rūgšties (H_3BO_3) ištirpinama viename litre karšto vandens, leidžiama atvėsti ir laikoma boro silikato stiklo butelyje.

4.6. **Indikatorinis tirpalas,** 0,01 g metilo raudonųjų dažų, 0,02 g bromotimolio mėlynųjų dažų ir 0,06 g bromokrezolio žaliųjų dažų ištirpinama 100 ml etanolio. Skiedinys laikomas rudame uždarame butelyje vėsioje tamsioje vietoje.

4.7. **Titravimo tirpalas**

0,05mol/l sieros rūgšties H_2SO_4 tirpalas arba 0,1 molio/l druskos rūgšties (HCl) tirpalas standartizuojamas 0,0001 mol/l tikslumu.

4.8. **Sacharozė, kurioje nėra azoto**

4.9. **Gryna amonio druska**, tokia kaip amonio oksalatas (NH4)2C2O4, H2O ar amonio sulfatas (NH4)2SO4.

4.10. **Triptofanas** (C11H12N2O2), **fenacetinas** (C10H7CH2CONH2) ar lizino mono- ar di-hidrochloridas (C6H14N2O2 !!! error character !!! B· HCl ar C6H14N2O2 !!! error character !!! B· 2HCl).

Pastaba. *4.9 ir 4.10 p. nurodytų* reagentų grynumas turi būti aukštesnis už „analizinį grynumą“. Jei galima, reikėtų naudoti sertifikuotą amonio druską (4.9 p.).

5. PRIETAISAI IR STIKLINIAI INDAI

Naudojama įprastinė ir ši laboratorinė įranga:

5.1. 500 ml talpos **Kjeldalio kolbos**

5.2. **Virinimą reguliuojančios priemonės**, pavyzdžiui, 5 mm skersmens stiklo karoliukai, Hengaro granulės, pemza.

5.3. **Biuretė ar automatine pipetė**, graduota po 1 ml.

5.4. **Graduoti matavimo cilindrai**, 50, 100 ir 250 ml talpos stiklinės.

5.5. **Mineralizavimo aparatas**, kuriame Kjeldalio kolbos laikomos nuožulnioje padėtyje (apie 45°), su elektriniais kaitintuvais ar dujiniais degikliais, kurie nekaitina kolbų virš jų turinio lygio, ir su garų ištraukimo sistema.

5.6. **Distiliavimo įranga**, pagaminta iš boro silikatinio stiklo, prie kurio gali būti prijungta Kjeldalio kolba (5.1 p.), susidedanti iš efektyvaus lašų gaudytuvo, sujungto su efektyviu kondensatoriumi su tiesiu vidiniu vamzdeliu, o išėjimo vamzdelis, prijungtas prie jo apatinio kondensatoriaus galo; sujungimo vamzdeliai ir kaištis (s) turi būti glaudžiai priglundantys ir pageidautina, kad būtų pagaminti iš neopreno gumos.

5.7. **Paprasta ar automatine pipetė,** graduota po 0,10 ml;

5.8. Kūginės 500 ml talpos **kolbos**, turinčios 200 ml graduotę.

5.9. 50 ml **biuretė**, graduota po 0,1 ml, maksimali paklaida ± 0,05 ml.

5.10. **Didinamasis stiklas** biuretės (5.9 p.) parodymams skaityti.

5.11. **pH-metras**

5.12. **Automatinė biuretė**

6. TYRIMO PROCEDŪRA

6.1. Į Kjeldalio kolbą (5.1 p.) įdedama virinimą reguliuojančių priemonių (5.2 p.) (pav., tris stiklinius karoliukus), 15 g kalio sulfato (4.1 p.), 1,0 ml vario sulfato tirpalo (4.2 p.), apie 5 g pieno mėginio (pasverto 0,001 g tikslumu) ir 25 ml sieros rūgšties (4.3 p.). Pilant rūgštį žemyn nuplaunami vario sulfato tirpalo kalio sulfato ar pieno likučiai, esantys ant kolbos kaklelio, kolbos turinys atsargiai sumaišomas.

Pastaba. *Jeigu pieno riebumas didesnis nei 5,0 %, mineralizavimui vietoj 25 ml H2SO4 (4.3 p.) naudojama 30 ml, kadangi organinės* medžiagos virimo metu sunaudoja daugiau sieros rūgšties. Tą patį sieros rūgšties kiekį reikia naudoti ir tuščiajame tyrime.

6.2. Kiekviena Kjeldalio kolba kaitinama mineralizavimo aparate (5.6 p.), iš pradžių labai silpnai, tokiu būdu, kad visa juoda puta pasiliktų rutuliuke. Kai pasibaigia pirminis putojimas ir pasirodo gausūs balti garai, virinama stipriai (rūgšties garai susikondensuos pusiaukelėje į viršų iki kolbos kaklelio), kol nelieka jokių juodų dalelių ir mineralizatas tampa skaidriu, melsvai žalios spalvos. Po to lengvai kaitinama mažiausiai 1,5 val. Atkreiptinas dėmesys į šiuos reikalavimus:

a) laikas, per kuri nuskaidrėja mineralizatas, turi būti ne ilgesnis nei viena valanda, o visa mineralizavimo trukmė turi būti ne trumpesnė nei 2,5 val. Jeigu skaidrumui pasiekti reikia daugiau nei valandos, visas mineralizavimo laikas turi būti atitinkamai prailgintas;

b) kalio sulfato pridėjimas skatina mineralizavimą, kadangi pakelia mišinio virimo temperatūrą. Jei mineralizavimo laikui baigiantis likutinis H2SO4 tūris yra mažesnis už apytikriai 15 ml, dalį azoto galima prarasti dėl per didelio kaitinimo. Kaitinimui naudojant dujas, kolba kaitinama ant plokštės, pagamintos iš šilumą izoliuojančios medžiagos, su tokio skersmens apvalia anga, kad laisva ugnis liestų tiktai kolbos dalį, esančią žemiau skysčio paviršiaus (5.5 p.);

c) jeigu juodos dalelės prilimpa prie kolbos kaklelio ir nenusiplauna, rūgščiai tekant atgal į kolbą pradinėje smarkaus kaitinimo periodo stadijoje (šį procesą galima palengvinti, pasukiojant kolbą), kolba atšaldoma ir juodos dalelės atsargiai nuplaunamos su minimaliu vandens kiekiu. Paskui mineralizavimas tęsiamas aukščiau aprašytu būdu.

6.3. Atvėsus Kjeldalio kolboms, į kiekvieną pridedama 300 ml vandens (6.3 pastaba), kruopščiai nuplaunant kolbos kaklelį ir gerai sumaišomas turinys, kad ištirptų išsiskyrę kristalai, įdedama virinimo reguliavimo priemonės (5.2 p.), užtikrinančios tolygų virimą. Po to, į kiekvieną kolbą pridedama 70 ml natrio hidroksido tirpalo (4.4 p.) (žr. pastabą), atsargiai pilant tirpalą, kad jis tekėtų žemyn nuožulniai palenktos kolbos sienele, kad rutuliuke susiformuotų apatinis sluoksnis; nesušlapinant tirpalu kolbos kaklelio viršaus.

Pastaba. Būtina, kad viso 370 ml vandens ir natrio hidroksido tirpalo pakaktų, kad būtų surinkta apytikriai 150 ml kondensato dar prieš prasidedant netolygiam „kunkuliuojančiam“ virimui (6.4 p.). Tokiu būdu, jeigu yra pridedama natrio hidroksido tirpalo, kurio koncentracija yra mažesnė nei 47 % (m/m), ekvivalentinio tūrio, turi būti atitinkamai sumažintas pridedamo vandens tūris. Pavyzdžiui, jeigu reikia pridėti 85 ml 40 % (m/m) ar 126 ml 30 % (m/m) natrio hidroksido tirpalo, pridedamo vandens tūris privalo būti 285 ml ar 245 ml.

6.4. Nedelsiant kiekviena Kjeldalio kolba prijungiama prie distiliacijos įrangos (5.6 p.). Įsitikinama, kad kondensatoriaus išėjimo vamzdelio galiukas būtų pamerktas į kūginę kolbutę (5.8 p.) su 50 ml boro rūgšties tirpalo (4.5 p.), kartu su 0,20 ml (5–6 lašais) indikatoriaus tirpalo (4.6 p.). Siekiant gerai sumaišyti, kiekviena Kjeldalio kolba sukama su jos turiniu ir virinama, pradžioje atsargiai, kad neputotų. Susirinkus 100–125 ml distiliato, kiekviena kūginė kolbutė nuleidžiama taip, kad kondensoriaus išėjimo vamzdelio galiukas atsirastų apytikriai 40 mm virš 200 ml atžymos. Kiekviena distiliacija tęsiama, kol prasideda nevienodas „kunkuliuojantis“ virimas ir tada iš karto nustojama kaitinti. Kiekviena Kjeldalio kolba atjungiama ir kiekvieno kondensoriaus išėjimo vamzdelio galiukas praplaunamas nedideliu kiekiu vandens, surenkant nuoplovas į kūginę kolbą. Įsidėmėtini šie reikalavimai:

a) distiliacijos greitis turi būti toks, kad prieš prasidedant nevienodam „kunkuliuojančiam“ virimui būtų surinkta apie 150 ml distiliato, tuomet kiekvienos konusinės kolbos tūris bus apie 200 ml;

b) distiliacijos įranga turi būti tokia, kad kiekvienos kūginės kolbos turinio temperatūra distiliacijos metu neviršytų 25 °C.

6.5. Kiekvienas distiliatas titruojamas standartiniu titravimo tirpalu (4.7 p.) kol pH bus 4,6 ± 0,1, naudojant pH-metrą ir, jei norima, automatinę biuretę. Pridėjus indikatoriaus, galima patikrinti ar teisingai vyksta titravimas. Kiekvienas biuretės parodymas užregistruojamas 0,01 ml tikslumu. Kad būtų išvengta paklaidos, naudojamasi didinamuoju stiklu (5.10 p.).

Titravimas atliekamas tik su indikatoriumi. Titruojama tol, kol distiliato spalva susivienodins su su ką tik iš 150 ml vandens, 50 ml boro rūgšties tirpalo ir 0,20 ml indikatoriaus, įpilto į konusinę kolbą (5.8 p.) pagaminto tirpalo spalva.

6.6. Tuščiasis tyrimas atliekamas pagal 6.1–6.5 punktų, imtinai, procedūras, naudojant 5 ml distiliuoto vandens kartu su 0,1 g sacharozės (4.8 p.) vietoje pieno mėginio.

Pastaba. Tuščiojo mėginio distiliato titravimui prireiks tik labai mažo kiekio standartinio titravimo tirpalo (4.7 p.).

6.7. Procedūros tikslumą reikia reguliariai tikrinti, naudojant du regeneracijos tyrimus, kurie atliekami pagal 6.1–6.5 p. apibūdintą metodiką.

6.7.1. Naudojant mėginį iš 0,15 g amonio oksalato ar sulfato (4.9 p.), pasverto 0,001 g tikslumu kartu su 0,1 g sacharozės (4.8 p.), patikrinamas azoto praradimas dėl per didelio kaitinimo ar mechaninio nutekėjimo distiliacijos metu.

Regeneruoto azoto kiekis turi būti tarp 99,0 ir 100,0 %.

Jei gautas rezultatas didesnis arba mažesnis, gali būti neteisingai atlikta procedūra arba/ir netiksli standartinio titravimo tirpalo (4.7 p.) koncentracija;

6.7.2. Patikrinti ar mineralizavimo metu išlaisvintas visas baltymų azotas galima naudojant mėginį iš 0.20 g gryno triptofano, 0,35 g fenacetino ar 0,20 g lizino hidrochlorido (4.10 p.). Viskas turi būti atsveriama 0,001 g tikslumu. Turi būti regeneruota mažiausiai 98–99 % azoto.

7. SAUGOS PRIEMONĖS

Dirbant su koncentruota sieros rūgštimi ir natrio hidroksidu ir tvarkant Kjeldalio kolbas, visada būtina dėvėti laboratorinį chalatą, apsauginius akinius ir mūvėti rūgščiai atsparias pirštines.

Distiliacijos metu niekad nepalikti Kjeldahlo kolbų be priežiūros. Dėl galimo pavojaus, nedelsiant sustabdyti distiliaciją, jei kolbos turinys verda labai smarkiai „kunkuliuodamas“. Jei energijos tiekimas nutrūksta daugiau nei 2–3 minutėms, surinkimo kolba nuleidžiama tokiu būdu, kad distiliacijos vamzdelio galas nesiektų skysčio.

8. REZULTATŲ PATEIKIMAS

8.1. **Skaičiavimas ir formulė**

Azoto kiekis (WN), išreikštas azoto gramais 100 g produkto, apskaičiuojama pagal formulę:

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

kurioje:

WN = azoto kiekis gramais 100 g produkto,

V = standartinio titravimo tirpalo tūris, sunaudotas analizei, mililitrais,

V_0 = standartinio titravimo tirpalo tūris, sunaudotas tuščiajam mėginiui, mililitrais,

c = standartinio titravimo tirpalo (4.7 p.) koncentracija moliais litre,

m = mėginio masė gramais.

Rezultatas apskaičiuojamas 0,001 g 100 g produkto tikslumu.

8.2. **Tikslumas:**

8.2.1. *Pakartojamumas (r)* – 0,007 g 100 g produkto.

8.2.2. *Atkuriamumas (R)* – 0,015 g 100g produkto.

9. MODIFIKUOTOS PROCEDŪROS

9.1. Vietoje distiliavimo įrangos ir Kjeldalio kolbų, apibūdintų 5.5 ir 5.1 p. galima naudoti mineralizavimo bloką su cilindrinėmis kolbomis (mėgintuvėliais). Šiuo atveju norint nustatyti galimus trikdžius, turi būti individualiai patikrinta kiekviena procedūros vieta (6.7 p.).

9.2. Vietoje tiesioginio kolbų kaitinimo naudojama distiliacija garais (6.4 p.). Kai aparatas neleidžia naudoti distiliuoto vandens, pasirūpinama, kad vandenyje nebūtų rūgšties ar šarmo lakiųjų medžiagų.

9.3. 1 g pieno mėginys vietoje 5 g (6.1 p.) (pusiau makroKjeldalio metodas gali būti panaudotas su sąlyga, kad:

— tokia pat proporcija (1/5) bus sumažinti H2SO4, CuSO4 !!! error character !!! B· 5H2O, K2SO4 kiekiai (6.1 p.):

— bendras mineralizavimo laikas bus sumažintas iki 75 min,

— natrio hidroksido tirpalo (6.3) kiekis bus sumažintas ta pačia proporcija (1/5),

— bus naudojamas žemesnės koncentracijos (0,02–0,03 mol/l) standartinis titravimo tirpalas (4.7 p.).

Pastaba. *Galima naudoti vieną* ar daugiau šių modifikavimų, jeigu rezultatų pakartojamumo reikšmė (8.2.1 p.) ir dviejų tyrimų tikslumo (6.7 p.) rezultatai atitinka šio metodo reikalavimus.

V. **BALTYMŲ KIEKIO NUSTATYMAS**

1. TAIKYMO SRITIS

Numatyta procedūra yra baltymų kiekio nustatymo termiškai apdorotame piene pamatinis metodas (Direktyvos 85/397/EEB 3A straipsnio 3 dalis).

2. APIBRĖŽIMAS

Baltymų kiekis – vertė, gauta padauginus bendrąjį azoto kiekį, išreikštą masės procentu, nustatytą pagal (IV 3) skyriuje aprašytą metodą, iš atitinkamo koeficiento (3).

3. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Pieno baltymų kiekis masės procentais lygus: 6,38 x bendrojo azoto N kiekio piene proc.

VI. LYGINAMOSIOS MASĖS NUSTATYMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Tai žalio pieno, nenugriebto pieno, dalinai nugriebto ir nugriebto pieno lyginamosios masės 20 °C temperatūroje nustatymo pamatinis metodas.

2. APIBRĖŽIMAS

Pieno lyginamoji masė (tankis) yra tam tikro tūrio pieno masės santykis su to paties tūrio vandens mase 20 °C temperatūroje.

3. METODO ESMĖ

Lyginamoji masė 20 °C temperatūroje nustatoma areometru.

4. ĮRANGA IR PRIEMONĖS.

Naudojama įprastinė ir ši laboratorinė įranga:

4.1. **Areometras**

Lyginamojo svorio areometras yra prietaisas, susidedantis iš stiklinės plūdės, su plačia ir sunkia savo apatine dalimi. Cilindrinės formos stiklinis strypas, kurio ašis, bendra su plūde, yra pritvirtintas prie viršutinio plūdės galo; viršutinis strypo galas yra uždaras.

Stiklinės plūdės viduje yra apkrova (švinas, gyvsidabris, kt.), skirta koreguoti areometro masę. Strype yra graduota skalė nuo 1,025 iki 1,035 g/ml.

Areometras turi būti tikrinamas naudojant apie 100 ml talpos piknometrą su tiksliu termometru.

4.2. **Cilindrai** (iš stiklo ar nerūdijančio plieno).

Jų minimalūs matmenys:

— vidinis skersmuo apie 35 mm,

— vidinis aukštis apie 225 mm.

4.3. **Vandens vonia**, kurios temperatūra 20 ± 01 °C.

4.4. **Vandens vonia**, kurios temperatūra 40 ± 2 °C.

4.5. **Termometras**, graduotas po 0,5 °C.

5. TYRIMO PROCEDŪRA

5.1. Mėginys sumaišomas jį vartant, kad būtų išsklaidyti riebalai, ir įdedamas į vandens vonią (4.4 p.). Mėginiui leidžiama pasiekti 40 °C temperatūrą ir laikoma tokioje temperatūroje 5 min. Kruopščiai sumaišoma, atsargiai vartant, kad riebalai pasiskirstytų tolygiai. Ataušinama iki 20 °C antroje vandens vonioje (4.3 p.).

5.2. Mėginys kruopščiai sumaišomas, atsargiai vartant ir vengiant įplakti oro. Pienas supilamas į cilindrą (4.2 p.), laikant jį pasvirusį, kad nesusidarytų putų ar oro burbuliukai. Cilindras užpildomas taip, kad dedant į jį areometrą (4.1 p.), truputis pieno išsilietų. Aerometras atsargiai nuleidžiamas į pieną ir leidžiama laisvai plūduriuoti, kol nusistovės pusiausvyra. Cilindras turi būti vertikalioje padėtyje. Areometras turi būti skysčio stulpelio viduryje, kad nesiliestų su cilindro kraštais.

5.3. Areometrui pasiekus pusiausvyrą, skalės parodymai nuskaitomi ties viršutiniu menisku.

5.4. Užregistravus hidrometro rodmenis, iš karto į mėginį įdedamas termometras (4.5 p.) ir 0,5 °C tikslumu nustatoma temperatūra. Temperatūra neturi skirtis nuo 20 °C daugiau nei ± 2 °C.

6. TEMPERATŪROS KOREGAVIMAS

6.1. Jei matuojamo pieno temperatūra nėra lygi 20 °C, tuomet gautas rezultatas turi būti koreguojamas, pridedant prie nustatytos lyginamosios masės 0,0002 kiekvienam Celsijaus laipsniui virš 20 °C arba atimant 0,0002 kiekvienam Celsijaus laipsniui žemiau 20 °C. Šis koregavimas yra taikytinas, jei pieno mėginio temperatūra skiriasi nuo 20 °C ne daugiau kaip 5 °C.

7. REZULTATŲ PATEIKIMAS

Apskaičiavimo metodas ir formulė. Mėginio lyginamoji masė yra išreiškiama nugriebto pieno g/ml 20 °C temperatūroje pagal šią formulę:

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

kurioje:

mv = mėginio lyginamasis svoris pagal areometro (5.4 p.) parodymą g/ml,

MG = riebalų kiekis mėginyje g/l,

0,92 = riebalų tankis.

8. Tikslumas:

8.1. **Pakartojamumas (r)** – 0,0003 g/ml.

8.2. **Atkuriamumas (R)** – 0,0015 g/ml.

Priedėlis

(II priedo papildymas)

ALTERNATYVI PROCEDŪRA NAUDOJANT RIEBALŲ EKSTRAHAVIMO MĖGINTUVĖLIUS SU SIFONU AR INDŲ PLOVYKLĘ

A.1. **TYRIMO PROCEDŪRA**

A.1.1. **Mėginio paruošimas**

Žr. 6.1 p.

A.1.2. **Mėginys**

Atliekama tai, kas nurodyta 6.2 p., tačiau naudojant riebalų ekstrahavimo mėgintuvėlius (žr. 5.6 p.).

Kaip galima daugiau mėginio supilama ant ekstrahavimo mėgintuvėlio dugno.

A.1.3. **Tuščiasis tyrimas**

Žr. 6.3 p.

A.1.4. **Riebalų surinkimo indo parengimas**

Žr. 6.4 p.

A.1.5. **Tyrimo procedūra**

A.1.5.1. Pridedama 2 ml amoniako tirpalo (4.1.1 p.), ar ekvivalentiškas didesnės koncentracijos amoniako tirpalo tūris ir kruopščiai sumaišoma su iš anksto apdorotu mėginiu, esančiu mėgintuvėlio dugne. Pridėjus amoniako, iš karto atliekamas tyrimas.

A.1.5.2. Pridedama 10 ml etanolio (4.2 p.) ir atsargiai, tačiau kruopščiai, turinys sumaišomas mėgintuvėlio dugne. *Jei reikia*, pridedami 2 lašai Kongo ar Kresolio raudonųjų dažų tirpalo (4.3 p.).

A.1.5.3. Pridedama 25 ml dietileterio (4.4 p.), mėgintuvėlis užkemšamas vandenyje išmirkytu kamščiu ar vandeniu sušlapintu kaiščiu (5.6 p.), mėgintuvėlis energingai purtomas, tačiau ne per stipriai (kad nesusidarytų stabili emulsija), keliskart kas 1 min. mėgintuvėlį apverčiant. Jei reikia, mėgintuvėlis ataušinamas tekančiame vandenyje, po to atsargiai ištraukiamas kamštis ar kaištis ir jis nuplaunamas, taip pat nedideliu tirpiklių mišinio (4.6 p.) kiekiu, naudojant plovyklę, nuplaunama mėgintuvėlio kaklelio vidinė dalis, tokiu būdu, kad nuoplovos subėgtų į mėgintuvėlį.

A.1.5.4. Pridedama 25 ml petroleterio (4.5 p.), mėgintuvėlis užkemšamas su iš naujo prisotintu vandens kamščiu ar kaiščiu (sušlapintu panardinus vandenyje) ir mėgintuvėlis atsargiai purtomas 30 s, kaip aprašyta A.1.5.3 p.

A.1.5.5. Centrifuguojamas užkimštas mėgintuvėlis nuo 1 iki 5 min. 500–600 apsisukimų per $min.^{-1}$ greičiu (5.2 p.). Jei centrifugos nėra (žr. 5.2 p. pastabą), užkimštas mėgintuvėlis palaikomas stovelyje (5.7 p.). 30 min., kol nuskaidrės, ir nuo vandeninio sluoksnio aiškiai atsiskirs viršutinis sluoksnis. Reikalui esant, mėgintuvėlis ataušinamas tekančiame vandenyje.

A.1.5.6. Atsargiai ištraukiamas kamštis ar kaištis ir jis bei mėgintuvėlio kaklelio vidinė dalis nuplaunami nedideliu tirpiklių mišinio kiekiu, tokiu būdu, kad nuoplovos subėgtų į mėgintuvėlį.

A.1.5.7. Į ekstrahavimo mėgintuvėlį įstatomas sifonas arba plovyklės vamzdeliai, ilgąjį vidinį vamzdelį spaudžiant žemyn, kol jo galas pasiekia vidutiniškai 3 mm virš sluoksnių ribos lygį. Ilgasis vidinis vamzdelis turi būti lygiagretus ekstrahavimo mėgintuvėlio ašiai.

Viršutinis skysčių sluoksnį iš ekstrahavimo mėgintuvėlio nupilamas į paruoštą riebalų surinkimo indą (6.4 p.), į kurį įdedama virimą reguliuojančių priedų (5.10 p.) (metalinėse lėkštelėse jų naudoti nebūtina), vengiant vandeninio sluoksnio išsipylimo. Sifono ištekėjimo vamzdelio galas apiplaunamas mažu tirpiklių mišinio kiekiu, nuoplovas surenkant į riebalų surinkimo indą.

A.1.5.8. Išlaisvinus sifoną ar plovyklės įtaisą iš ekstrahavimo mėgintuvėlio kaklelio, įtaisas truputį pakeliamas ir jo ilgo vidinio strypo apatinė dalis nuplaunama nedideliu tirpiklių mišinio kiekiu. Nuleidžiama ir iš naujo įvedamas įtaisas ir nuoplovos perpilamos į riebalų surinkimo indą.

Įtaiso išėjimo anga išplaunama nedideliu tirpiklių mišinio kiekiu, surenkant nuoplovas į indą. Jei reikia, tirpiklį ar jo dalį galima pašalinti iš indo distiliacijos ar išgarinimo būdu, kaip aprašyta 6.5.12 p.

A.1.5.9. Pakartotinai įtaisai išlaisvinami iš ekstrahavimo mėgintuvėlio kaklelio, truputį pakeliami ir į mėgintuvėlio turinį pridedama 5 ml etanolio, juo nuplaunant ilgąjį vidinį sifono vamzdelį. Sumaišoma, kaip aprašyta A.1.5.2 p.

A.1.5.10. Atliekama *antra ekstrakcija*, kartojant A.1.5.3–A.1.5.8 punktuose aprašytus veiksmus, bet naudojant tik 15 ml dietileterio (4.4 p.) ir 15 ml petroleterio (4.5 p.). Ištraukus įtaisus iš mėgintuvėlio, po pirminės ekstrakcijos įjgasis vamzdelis apiplaunamas eteriu.

A.1.5.11. Atliekama *trečia ekstrakcija* vėl pakartojant A.1.5.3–A.1.5.8 punktuose aprašytus veiksmus ir panaudojant 15 ml dietileterio ir 15 ml petroleterio nuplaunamas įtaiso ilgojo vamzdelio galas kaip aprašyta A.15.10 punkte.

Nugriebtam pienui galima nedaryti trečios ekstrakcijos.

A.1.5.12. Atliekamos procedūros, aprašytos 6.5.13–6.5.16 punktuose.