31992D0608

31.12.1992 *DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH* L 407/29

DECYZJA RADY

z dnia 14 listopada 1992 r.

ustanawiająca metody analizy i badania mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do bezpośredniego spożycia przez ludzi

(92/608/EWG)

RADA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 85/397/EWG z dnia 5 sierpnia 1985 r. w sprawie zdrowia i problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na handel wewnątrzwspólnotowy mlekiem poddanym obróbce termicznej [1], w szczególności jej art. 11 ust. 6,

uwzględniając wniosek Komisji,

a także mając na uwadze, co następuje:

na podstawie art. 11 ust. 6 dyrektywy 85/397/EWG, Rada ma ustanowić szczegółowe regulacje w zakresie kontroli przewidzianej w art. 11 ust. 2; celem takiej kontroli przeprowadzanej przez zakłady znajdujące się pod nadzorem i w ramach odpowiedzialności urzędowego organu i z okresową kontrolą przeprowadzaną przez ten urzędowy organ, jest zapewnienie zgodności z wymaganiami dyrektywy 85/397/EWG, w szczególności z wymaganiami ustanowionymi w jej art. 3 A ust. 3;

ustanowienie procedur w zakresie kontroli obejmuje określenie metod, które mają być zastosowane do jej realizacji;

muszą być ustanowione metody oznaczania ogólnej zawartości substancji stałych, zawartości tłuszczu, zawartości beztłuszczowych substancji stałych, ogólnej zawartości azotu, zawartości białka oraz gęstość mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do bezpośredniego spożycia przez ludzi;

z przyczyn technicznych wstępnym wymaganiem jest ustanowienie wzorcowych metod dla analiz i badań, aby zapewnić, że spełnione są normy opisane w art. 3 A ust. 3 dyrektywy 85/397/EWG; szczególnie ważne jest przeprowadzenie badania warunków, w jakich przeprowadza się rutynowe metody analiz i badań; do czasu wyniku tego badania jest sprawą właściwych organów dopilnowanie, czy odpowiednie wzorcowe metody stosowane są w celu zapewnienia, aby te normy były spełnione;

określenie wspomnianych powyżej metod obejmuje, w szczególności, określenie procedur analitycznych oraz ustalanie kryteriów wiarygodności celem zapewnienia jednolitej interpretacji wyników,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

Artykuł 1

Stosuje się następujące metody analizy i badania mleka poddanego obróbce termicznej:

— oznaczanie ogólnej zawartości substancji stałych,

— oznaczanie zawartości tłuszczu,

— oznaczanie ogólnej zawartości beztłuszczowych substancji stałych,

— oznaczanie ogólnej zawartości azotu,

— oznaczanie zawartości białka,

— oznaczanie masy właściwej.

[1] Dz.U. L 226 z 24.8.1985, str. 13, ostatnio zmieniona dyrektywą 89/622/EWG (Dz.U. L 395 z 30.12.1989, str. 13).

Artykuł 2

Wprowadzenie w życie wzorcowych metod dla analiz i badań, określanie kryteriów wiarygodności i pobierania próbek musi być wykonywane zgodnie z zasadami ustalonymi w załączniku I.

Artykuł 3

Metody określone w art. 1 są wymienione w załączniku II.

Artykuł 4

Niniejsza decyzja skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 14 listopada 1992 r.

W imieniu Rady

J. GUMMER

Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK I

I. PRZEPISY OGÓLNE

1. WPROWADZENIE

Opisano przepisy ogólne odnoszące się do odczynników, sprzętu, formułowania wyników, dokładności i sprawozdań z testu. Właściwe organy Państw Członkowskich oraz laboratoria, odpowiedzialne za pobieranie próbek i badanie mleka, muszą przestrzegać przepisów ogólnych.

2. ODCZYNNIKI

2.1. **Woda**

2.1.1. W każdym przypadku, gdy jest mowa o wodzie służącej do przygotowywania roztworów, rozcieńczania i płukania, należy przyjąć, że chodzi o wodę destylowaną, dejonizowaną lub wodę zdemineralizowaną o co najmniej równoważnym stopniu czystości, chyba że ustalono inaczej.

2.1.2. W każdym przypadku odniesienie się do określeń „roztwór" lub „rozcieńczenie", bez dalszego wskazania, oznacza odpowiednio „roztwór wodny" lub „rozcieńczenie wodą".

2.2. **Chemikalia**

Wszystkie użyte chemikalia powinny mieć uznaną jakość odczynników analitycznych, chyba że ustalono inaczej.

3. SPRZĘT

3.1. **Wykazy sprzętu**

Wykazy sprzętu podane przy różnych wzorcowych metodach obejmują jedynie pozycje o przeznaczeniu specjalistycznym oraz pozycje posiadające szczególną specyfikację.

3.2. **Waga analityczna**

„Waga analityczna" oznacza wagę umożliwiającą dokonanie pomiaru z dokładnością do 0,1 mg.

4. PREZENTACJA WYNIKÓW

4.1. **Wyniki**

Wyniki podawane w sprawozdaniu z testu (6) powinny mieć wartość średniej arytmetycznej uzyskanej z dwóch testów, które spełniają kryterium powtarzalności (ppkt 5.1.1) określone dla danej metody, chyba że ustalono inaczej. Jeśli kryterium powtarzalności nie zostanie spełnione, test musi zostać powtórzony lub wynik uznany za nieważny.

4.2. **Obliczanie procentów**

Wynik obliczany jest jako procent masy próbki, chyba że ustalono inaczej.

5. KRYTERIA DOKŁADNOŚCI: POWTARZALNOŚĆ I ODTWARZALNOŚĆ

5.1. Kryteria dokładności pod ane w każdej metodzie określane są następująco:

5.1.1. *Powtarzalność (r)* jest to wartość, poniżej której znajduje się bezwzględna różnica wyników między dwoma niezależnymi wynikami, uzyskanymi przy zastosowaniu tej samej procedury, na tym samym materiale badawczym oraz w takich samych warunkach (ten sam laborant, ta sama aparatura, to samo laboratorium oraz krótki odstęp czasu).

5.1.2. *Odtwarzalność (R)* jest to wartość, poniżej której znajduje się bezwzględna różnica wyników między dwoma niezależnymi wynikami testów, uzyskanymi przy zastosowaniu tej samej procedury, na tym samym materiale badawczym, w różnych warunkach (przez różnych laborantów, przy użyciu różnej aparatury, w różnych laboratoriach i/lub w różnym czasie).

5.1.3. Dla każdej indywidualnej metody wartości kryteriów powtarzalności i odtwarzalności dla każdej procedury reprezentują przedziały 95 % poziomu wiarygodności, jak to określono w normie ISO 5725: 2 wyd. 1986, chyba że ustalono inaczej.

5.1.4. Konieczne próby i badania zespołowe powinny być zaplanowane i przeprowadzone zgodnie z międzynarodowymi wskazówkami.

6. SPRAWOZDANIE Z TESTU

Sprawozdanie z testu precyzuje zastosowane metod analizy, jak również uzyskane wyniki. Ponadto podaje szczegóły dotyczące procedur stosowanych opcjonalnie lub niesprecyzowanych w metodzie analizy, a także wszelkie inne okoliczności mogące mieć wpływ na uzyskane wyniki Sprawozdanie z testu podaje wszystkie informacje konieczne do pełnej identyfikacji próbki.

II. POBIERANIE PRÓBEK MLEKA PODDAWANEGO OBRÓBCE TERMICZNEJ

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura określa wzorcową metodę pobierania próbek, transportu i składowania próbek mleka poddawanego obróbce termicznej.

2. PRZEPISY OGÓLNE

Pobieranie próbek mleka poddawanego obróbce termicznej, znajdującego się w zbiornikach itp., przeprowadzane jest przez wykwalifikowanego laboranta, który przeszedł uprzednio odpowiednie szkolenie przed podjęciem się pobierania próbek mleka.

Właściwe organy lub laboratorium badawcze, jeśli uznają to za stosowne, instruują personel pobierający próbki o technikach ich pobierania, aby zapewnić reprezentacyjność i zgodność próbki z całością partii.

Właściwe organy lub laboratorium badawcze, jeśli uznają za stosowne, instruują personel pobierający próbki w zakresie znakowania próbek, aby zapewnić jednoznaczną identyfikację próbki.

3. SPRZĘT DO POBIERANIA PRÓBEK

3.1. **Przepisy ogólne**

Sprzęt do pobierania próbek jest wykonany ze stali nierdzewnej, lub innego odpowiedniego materiału o dostatecznej trwałości i konstrukcji stosownej do przeznaczenia (mieszanie, pobieranie próbek itp). Bełtaki zanurzeniowe i mieszadła do mieszania cieczy w pojemnikach są odpowiedniej wielkości, aby spowodować wystarczające wymieszanie produktu, ale bez powodowania rozwoju posmaku jełkości. Próbniki muszą posiadać dostatecznie długi, mocny uchwyt, odpowiedniej długości, aby możliwe było pobieranie próbek z dowolnej głębokości pojemnika. Pojemność próbnika wynosi, co najmniej 50 ml.

Pojemniki na próbki oraz zamknięcia powinny być wykonane ze szkła, odpowiednich metali lub tworzyw sztucznych.

Materiały, z których wykonany jest sprzęt do pobierania próbek (włącznie z pojemnikami i zamknięciami), nie mogą powodować jakichkolwiek zmian w próbce, które mogłyby wpłynąć na wyniki badań. Wszystkie powierzchnie sprzętu do pobierania próbek oraz pojemników na próbki są czyste i suche, gładkie i wolne od pęknięć, o zaokrąglonych rogach.

4. TECHNIKA POBIERANIA PRÓBEK

4.1. **Przepisy ogólne**

Bez względu na rodzaj badań, jakie mają być wykonane, przed pobraniem próbek mleko dokładnie wymieszać ręcznie lub mechanicznie.

Próbkę pobiera się niezwłocznie po wymieszaniu, podczas gdy mleko jest jeszcze wzburzone.

Objętość próbki odpowiada wymogom badawczym. Pojemność używanych pojemników na próbki jest taka, aby próbka wypełniała je prawie całkowicie, co umożliwia właściwe wymieszanie zawartości przed badaniem, a równocześnie zapobiega gwałtownemu spienieniu podczas transportu.

4.2. **Ręczne pobieranie próbek**

4.2.1. *Pobieranie próbek z podzielonej partii produktu*

W przypadku gdy ilość mleka, z którego mają być pobrane próbki znajduje się w więcej niż jednym pojemniku, pobrać reprezentatywną próbkę z każdego pojemnika i odnotować ilość mleka, do jakiej odnosi się każda z tych próbek. O ile próbki z poszczególnych pojemników muszą być badane indywidualnie, należy wymieszać ze sobą reprezentatywne ilości w ilościach, które są proporcjonalne do ilości w pojemniku, z których pochodzi każda próbka. Po wymieszaniu proporcjonalnie pobranych ilości pobiera się z nich próbkę.

4.2.2. *Pobieranie próbek z dużych zbiorników: cystern składowych, kolejowych i samochodowych*

4.2.2.1. Przed pobraniem próbek wymieszać mleko, stosując odpowiednią procedurę.

Zaleca się mechaniczne mieszanie zawartości dużych zbiorników, cystern składowych kolejowych lub samochodowych (ppkt 4.2.2.2).

Czas i intensywność mieszania odpowiadają długości czasu, w jakim mleko pozostawało w spoczynku. Skuteczność zastosowanej w danych okolicznościach procedury mieszania jest wykazywana jako będąca odpowiednią do celów przewidzianej analizy; kryterium skuteczności mieszania ma w szczególności wpływ na podobieństwo wyników analitycznych, uzyskanych w efekcie badania próbek pobranych z różnych części partii lub z wylotu zbiornika pobranych w odstępach czasu. Procedurę mieszania mleka (mleka niepoddanego obróbce lub mleka pełnego) uważa się za skuteczną, jeśli różnica zawartości tłuszczu między dwoma próbkami pobranymi w takich warunkach wynosi mniej niż 0,1 %..

W dużym zbiorniku z wylotem w dnie, w punkcie wylotu może występować niewielka ilość mleka, która nawet po wymieszaniu nie jest reprezentatywna dla całej zawartości. Zaleca się wobec tego pobieranie próbek przez otwór włazowy. Jeśli próbki pobierane są z otworu wylotowego, należy wylać odpowiednią ilość mleka w celu zapewnienia, że próbki są reprezentatywne dla całości.

4.2.2.2. Mieszanie zawartości dużych zbiorników bądź cystern składowych, kolejowych lub samochodowych może być przeprowadzane:

— - za pomocą mieszadła mechanicznego wbudowanego w zbiorniki i napędzanego silnikiem elektrycznym,

— za pomocą mieszadła śmigłowego lub mieszadła napędzanego silnikiem elektrycznym i umieszczonego na otworze włazowym, z mieszadłem zawieszonym w mleku,

— w przypadku cystern kolejowych lub samochodowych przez recyrkulację mleka poprzez umieszczony w otworze włazowym wąż tłoczący podłączony do pomp opróżniających zbiornik,

— za pomocą czystego przefiltrowanego sprężonego powietrza. W tym przypadku należy zastosować minimalne ciśnienie powietrza i jego objętość, aby zapobiec rozwojowi posmaku jełkości w mleku.

4.3. **Pobieranie próbek mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do bezpośredniego spożycia przez ludzi w opakowaniach detalicznych**

Próbki mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do bezpośredniego spożycia przez ludzi w opakowaniach detalicznych, muszą być pełnymi zamkniętymi opakowaniami. Jeśli to możliwe, próbki należy pobierać z maszyny pakującej lub chłodni w zakładzie przetwórczym, jak najszybciej po przetworzeniu (dla pasteryzowanego mleka w dniu przetworzenia).

Próbki pobierane są z każdego rodzaju mleka poddanego obróbce termicznej (pasteryzowanego, poddanego sterylizacji UHT) w liczbie odpowiadającej badaniom, które będą przeprowadzone, oraz zgodnie z instrukcjami ustanowionymi przez laboratorium badawcze bądź inny właściwy organ.

5. ZNAKOWANIE PRÓBEK

Próbka powinna być oznakowana kodem identyfikacyjnym tak, aby można było łatwo ją zidentyfikować, stosując instrukcje podane przez laboratorium badawcze lub właściwy organ.

6. KONSERWOWANIE, TRANSPORT I SKŁADOWANIE PRÓBEK

Zgodnie z właściwym organem krajowym laboratorium badawcze opracowuje instrukcje dotyczące warunków konserwowania (chemicznego, temperaturą) transportu, składowania oraz odstępu czasu między pobraniem próbek a analizą mleka, w zależności od rodzaju mleka oraz zastosowanej procedury analizy.

Instrukcja zawiera następujące punkty:

— Środki ostrożności podczas transportu i przechowywania podejmowane są by zabezpieczyć próbki przed skażającymi zapachami i bezpośrednim działaniem promieni słonecznych. Jeśli do próbek stosuje się pojemniki przezroczyste, należy składować je w ciemnym miejscu.

ZAŁĄCZNIK II

I. OZNACZANIE OGÓLNEJ ZAWARTOŚCI SUBSTANCJI STAŁYCH

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura określa wzorcową metodę dla oznaczania ogólnej zawartości substancji stałych mleka.

2. DEFINICJA

Ogólna zawartość substancji stałych: masa pozostająca po zakończeniu określonej procedury suszenia i wyrażono wagowo jako procent masy próbki.

3. ZASADA

Zasada polega na odparowaniu wody z badanej próbki w temperaturze 102 ± 2 °C w suszarce.

4. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, oraz w szczególności:

4.1. Waga analityczna

4.2. **Eksykator**, zawierający odpowiedni środek osuszający (na przykład, świeżo aktywowany żel krzemionkowy ze wskaźnikiem zawartości wody)

4.3. **Suszarka**, dobrze wentylowana, z termostatyczną kontrolą temperatury w 102 ± 2 °C w całej przestrzeni roboczej.

4.4. **Płaskodenne naczynka wagowe**, o wysokości 20–25 mm, średnicy 50–75 mm, wykonane z odpowiedniego materiału, z dobrze dopasowanymi, łatwymi do zdejmowania wieczkami.

4.5. Wrząca łaźnia wodna

4.6. Homogenizator

5. PRZYGOTOWANIE PRÓBKI

Ogrzać próbkę mleka do temperatury 20–25 °C. Starannie wymieszać, aby zapewnić jednorodne rozmieszczenie tłuszczu w całej próbce. Unikać zbyt energicznego mieszania, aby nie spowodować spienienia mleka lub zmaślenia tłuszczu. Jeśli trudno jest rozproszyć warstwę śmietanki, powoli ogrzewać do temperatury między 25 a 40 °C, i ostrożnie mieszając, dołączyć wszelką śmietankę przylegającą do pojemnika. Oziębić szybko próbkę do temperatury 20–25 °C.

Jeśli potrzeba, do ułatwienia rozproszenia tłuszczu można zastosować homogenizator.

Nie należy spodziewać się prawidłowych wyników, jeśli próbka zawiera oddzielony ciekły tłuszcz lub widoczne, oddzielne białe cząstki o nieregularnym kształcie, przylegające do ścianek pojemnika.

6. PROCEDURA

6.1. **Przygotowanie naczyńka wagowego**

Ogrzewać naczyńko wagowe (ppkt 4.4), wraz z wieczkiem umieszczonym obok naczyńka w suszarce (ppkt 4.3), z termostatyczną kontrolą temperatury w 102+/-2 °C przez co najmniej 30 minut. Umieścić wieczko na naczyńku i niezwłocznie przenieść do eksykatora (ppkt 4.2), pozwolić na ostudzenie do temperatury pokojowej (tj. przez co najmniej 30 min) i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

6.2. **Porcja do badania**

Do przygotowanego naczyńka (ppkt 6.1), zważyć natychmiast, z dokładnością do 0,1 mg, 3–5 g przygotowanej próbki do badań (5).

6.3. **Oznaczanie**

6.3.1. Wstępnie osuszać naczynko przez 30 minut, ogrzewając je we wrzącej łaźni wodnej (ppkt 4.5).

6.3.2. Ogrzewać naczynko wraz z wieczkiem obok, w suszarce (ppkt 4.3), z kontrolą temperatury w 102 ± 2 °C przez 2 godz. Umieścić wieczko na naczynku i wyjąć z suszarki.

6.3.3. Pozwolić na ostudzenie w eksykatorze (ppkt 4.2) do temperatury pokojowej (tj. przez co najmniej 30 minut) i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

6.3.4. Ogrzewać ponownie naczyńko wraz z wieczkiem obok, w suszarce przez 1 godz. Umieścić wieczko na naczyńku i wyjąć z suszarki. Pozwolić na ostudzenie przez około 30 minut w eksykatorze i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

6.3.5. Powtórzyć czynności opisane w ppkt 6.3.4. aż różnica masy między dwoma kolejnymi ważeniami będzie niższa niż 0,5 mg. Zanotować najniższą masę.

7. PREZENTACJA WYNIKÓW

7.1. **Obliczanie i wzór**

Obliczyć ogólną zawartość substancji stałych jako procent masy próbki według wzoru:

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

gdzie:

W_T = ogólna zawartość substancji stałych w gramach, na 100 g,

m_0 = masa naczynka i wieczka (patrz ppkt 6.1), w gramach,

m_1 = masa naczynka, wieczka i porcji do badań (patrz ppkt 6.2), w gramach,

m_2 = masa naczynka, wieczka i wysuszonej porcji do badań (patrz ppkt 6.3.5), w gramach,

Zaokrąglić uzyskaną wartość do 0,01 % (procent wagowo).

7.2. **Dokładność**

7.2.1. *Powtarzalność* (r) : 0,10 g ogólnej zawartości substancji stałych na 100 g produktu.

7.2.2. *Odtwarzalność* (R): 0,20 g ogólnej zawartości substancji stałych na 100 g produktu.

II. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura określa wzorcową metodę dla oznaczenia zawartości tłuszczu w surowym mleku oraz w mleku pełnym, mleku częściowo odtłuszczonym i w mleku odtłuszczonym.

2. DEFINICJA

Zawartość tłuszczu w mleku: cała substancja ustalona określoną metodą. Jest wyrażona jako procent masy próbki.

3. ZASADA

Amoniakalny roztwór alkoholowy porcji do badania jest ekstrahowany przy użyciu eteru dietylu i eteru naftowego, rozpuszczalniki są usuwane przez destylację lub odparowanie i oznaczana jest masa wyekstrahowanej substancji rozpuszczalnej w eterze naftowym. (Procedura jest zazwyczaj znana jako metoda Rose-Gottlieba).

4. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki są uznanej jakości analitycznej i nie zostawiają dostrzegalnych pozostałości podczas pobierania ślepej próby.

Aby zbadać jakość odczynników, należy przeprowadzić oznaczenie, jak podano w ppkt 6.3. Użyć pustą kolbę, zlewkę lub metalowe naczynko (ppkt 5.8) wagowo przygotowane, jak podano w ppkt 6.4, jako tarę (masa opakowania) (wziąć poprawkę na wpływ na wynik ważenia, spowodowany zmianami w warunkach atmosferycznych). Jeśli pozostałość skorygowana dla widocznej zmiany masy tary jest większa niż 2,5 mg, dokonać oznaczenia pozostałości lub rozpuszczalników oddzielnie przez odparowanie 100 ml eteru dietylu (ppkt 4.4) i 100 ml eteru naftowego (ppkt 4.5), odpowiednio. Także zastosować tarę dla ważenia. Kiedy pozostałość jest większa niż 2,5 mg, należy oczyścić rozpuszczalnik przez destylację lub go wymienić.

4.1. **Roztwór wodny amoniaku**, zawierający ok. 25 % (m/m) NH3. Można także zastosować roztwór o większym stężeniu (patrz ppkt 6.5.1 i A.1.5.1).

4.2. **Alkohol etylowy**, co najmniej 94 % (v/v). Można użyć alkohol etylowy skażony alkoholem metylowym, pod warunkiem że istnieje pewność, że nie wpłynie to na wyniki oznaczenia.

4.3. **Roztwór czerwieni Kongo lub czerwieni krezolowej**

Rozpuścić 1 g czerwieni Kongo lub czerwieni krezolowej w wodzie i uzupełnić wodą do 100 ml.

Uwaga: *Zastosowanie niniejszego roztworu, który pozwala na wyraźniejsze* zaobserwowanie interfazy między rozpuszczalnikiem a warstwami wodnymi, jest nieobowiązkowe ((patrz ppkt 6.5.2). Można stosować inne wodne barwne roztwory pod warunkiem że nie mają one wpływu na wynik oznaczenia.

4.4. **Eter dietylu**, wolny od nadtlenków, niezawierający więcej niż 2 mg przeciwutleniaczy/kg oraz spełniający wymagania ślepej próby (ppkt 6.3).

4.5. **Eter naftowy**, o temperaturze wrzenia 30–60 °C.

4.6. **Mieszanina rozpuszczalników**, przygotowana na krótko przed użyciem, przez wymieszanie jednakowych objętości eteru dietylu (ppkt 4.4) i eteru naftowego (ppkt 4.5).

5. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

Ostrzeżenie:
Ponieważ oznaczenie obejmuje zastosowanie lotnych palnych rozpuszczalników, wszelka stosowana aparatura elektryczna musi pozostawać w zgodzie z przepisami prawnymi dotyczącymi użycia takich rozpuszczalników.

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, oraz w szczególności:

5.1. Waga analityczna

5.2. **Wirówka**, w której wirują kolby lub probówki do ekstrakcji tłuszczu przy częstotliwości obrotowej 500–600 obrotów($^{-1}$), aby utworzyć pole grawitacyjne 80–90 g przy zewnętrznym końcu kolb lub probówek.

Uwaga: *Zastosowanie wirówki jest nieobowi*ązkowe (ppkt 6.5.5).

5.3. **Aparat do destylacji lub odparowania**, pozwalający na destylację rozpuszczalników i alkoholu etylowego z kolb lub odparowanie ze zlewek i naczynek (ppkt 6.5.12. i 6.5.15) w temperaturze nieprzekraczającej 100 °C.

5.4. **Suszarka**, ogrzewana elektrycznie, dobrze wentylowana, z termostatyczną kontrolą temperatury (102 ± 2 °C) w całej przestrzeni roboczej. Suszarka powinna być wyposażona w odpowiedni termometr.

5.5. **Łaźnia wodna**, utrzymująca temperaturę 35–40 °C.

5.6. **Kolby do ekstrakcji tłuszczu, typu kolby Mojonniera.**

Uwaga: Można także stosować probówki do ekstrakcji tłuszczu wyposażone w osprzęt syfonowy lub tryskawkowy, ale procedura wykonania oznaczenia jest wówczas inna i jest wyszczególniona w Dodatku.

Kolby (lub probówki) powinny być zaopatrzone w korki ze szkła szlifowanego lub w korki dobrej jakości lub inne zatyczki, na które nie mają wpływu stosowane odczynniki. Zatyczki z korka powinny być ekstrahowane eterem dietylu (ppkt 4.4) przechowywane w wodzie w temperaturze 60 °C lub wyższej przez co najmniej 15 min, a następnie powinny być ostudzone w wodzie tak, aby były nasycone w czasie ich używania.

5.7. **Statyw** do utrzymywania kolb ekstrakcyjnych (lub probówek) (patrz ppkt 5.6.1).

5.8. **Tryskawka**, odpowiednia do stosowania mieszaniny rozpuszczalników (ppkt 4.6). Nie powinno się używać tryskawek z tworzywa sztucznego.

5.9. **Pojemniki do zbierania tłuszczu**, na przykład kolby warzelnicze (płaskodenne), lub kolby Erlenmeyera o pojemności 125–250 ml lub metalowe naczynka. Jeśli stosuje się naczynka metalowe, powinny być one wykonane ze stali nierdzewnej, posiadać płaskie dno, dziobek i mieć średnicę 80–100 mm oraz wysokość około 50 mm.

5.10. **Materiały pomocnicze**, ułatwiające wrzenie, wolne od tłuszczu, wykonane z nieporowatej porcelanki lub węglanu krzemu, lub szklane kulki (nieobowiązkowe w przypadku stosowania metalowych naczynek).

5.11. **Cylindry pomiarowe**, o pojemności 5 i 25 ml.

5.12. **Wyskalowane pipety** o pojemności 10 ml.

5.13. **Szczypce**, wykonane z metalu, odpowiednie do utrzymywania kolb, zlewek lub naczynek.

6. PROCEDURA

Uwaga: Alternatywna procedura stosowania probówki z osprzętem syfonowym lub tryskawkowym (patrz ppkt 5.6) jest opisana w Dodatku.

6.1. **Przygotowanie próbki do badań**

Należy ogrzewać próbkę do badań laboratoryjnych do temperatury około 35–40 °C w łaźni wodnej. Wymieszać próbkę starannie, lecz delikatnie, przez odwracanie butelki z próbką bez powodowania pienienia lub zmaślania, i szybko oziębić do temperatury ok. 20 °C.

6.2. **Porcja do badania**

Wymieszać próbkę pobraną do badania (ppkt 6.1) przez trzy lub czterokrotne delikatne odwracanie butelki i natychmiast zważyć, z dokładnością do 1 mg,

10–11 g próbki do badań, bezpośrednio lub poprzez różnicę przenoszenia, do jednej kolby ekstrakcyjnej (ppkt 5.6).

6.3. **Porcja do badania jest przenoszona możliwie jak najdokładniej do dolnego (małego) rozszerzenia kulistego kolby ekstrakcyjnej.**

Ślepa próba

Przeprowadzić ślepą próbę jednocześnie z oznaczeniem, stosując tą samą procedurę wykonania i te same odczynniki, ale zastępując porcję do badania 10–11 mililitrami wody.

6.4. **Zmiana masy pozornej naczynia do odbierania tłuszczu, skorygowana dla masy pozornej naczynia kontrolnego, nie powinna przekraczać 2,5 mg.**

Przygotowanie pojemnika do odbierania tłuszczu

6.5. **Wysuszyć pojemnik (ppkt 5.9), stosując kilka kawałków materiałów ułatwiających wrzenie (ppkt 5.10), aby spowodować łagodne wrzenie podczas usuwania rozpuszczalnika w suszarce (ppkt 5.4) przez 1 godz. Pozwolić na ostudzenie pojemnika (nie w eksykatorze, ale zabezpieczyć od pyłu) do temperatury pomieszczenia do ważenia (w przypadku naczyń szklanych, co najmniej przez godzinę, w przypadku metalowych naczyń co najmniej przez 30 minut). Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wahań temperatury, stosować szczypce do umieszczenia pojemnika na wadze i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.**

6.5.1. Oznaczanie

6.5.2. Dodać 2 ml roztworu wodnego amoniaku (ppkt 4.1) lub równorzędną ilość roztworu amoniaku o większym stężeniu i wymieszać starannie z porcją do badania w małej części kulistej kolby. Po dodaniu amoniaku, przeprowadzić bezzwłocznie oznaczenie.

6.5.3. Dodać 10 ml alkoholu etylowego (ppkt 4.2) i delikatnie, lecz starannie wymieszać, pozwalając, aby zawartość kolby przepływała do przodu i do tyłu między dwoma kulistymi częściami; unikać przedostania się cieczy zbyt blisko szyjki kolby. Jeśli potrzeba, dodać dwie krople roztworu czerwieni Kongo lub czerwieni krezolowej (ppkt 4.3).

6.5.4. Dodać 25 ml eteru dietylu (ppkt 4.4), zamknąć kolbę korkiem nasyconym wodą lub zatyczką zwilżoną wodą (patrz ppkt 5.6) i wytrząsać kolbę energicznie, ale nie nadmiernie (aby uniknąć wytworzenia się trwałych emulsji) przez minutę, utrzymując kolbę w pozycji poziomej, a małą część kulistą skierowaną ku górze. Okresowo pozwolić na przelewanie się cieczy z dużego kulistego zbiorniczka do małego kulistego zbiorniczka. Jeśli konieczne, ostudzić kolbę pod bieżącą wodą, następnie ostrożnie usunąć korek lub zatyczkę i przemyć go oraz szyjkę kolby przy użyciu małej ilości mieszaniny rozpuszczalników (ppkt 4.6), stosując tryskawkę (ppkt 5.8), tak aby popłuczyny spłynęły do kolby.

6.5.5. Dodać 25 ml eteru naftowego (ppkt 4.5), zamknąć kolbę ponownie zwilżonym korkiem lub zatyczką (ponownie zwilżyć przez zanurzenie w wodzie) i wytrząsać delikatnie kolbę przez 30 sekund, jak opisano w ppkt 6.5.3.

6.5.6. Odwirować zamkniętą kolbę przez 1–5 minut przy częstotliwości 500–600 obrotów na minutę do (-[1]) (ppkt 5.2). Jeśli nie ma możliwości użycia wirówki (patrz uwaga ppkt 5.2), umieścić zamkniętą kolbę w pozycji stojącej w statywie (ppkt 5.7) na co najmniej 30 minut aż warstwa supernatantu (cieczy sklarowanej nad osadem) stanie się klarowna i wyraźnie oddzielona od warstwy wodnej. Jeśli konieczne, ostudzić kolbę pod bieżącą wodą.

Ostrożnie usunąć korek lub zatyczkę i wypłukać ją oraz wewnętrzną część szyjki kolby małą ilością mieszaniny rozpuszczalników (ppkt 4.6), tak aby popłuczyny spłynęły do wnętrza kolby.

6.5.7. Jeśli granica faz znajduje się poniżej dna szyjki kolby, podnieść ją nieco powyżej tego poziomu dodając delikatnie wodę po ściance kolby, aby ułatwić dekantację rozpuszczalnika.

6.5.8. Trzymając kolbę ekstrakcyjną za małą kulistą część, ostrożnie zdekantować możliwie jak najwięcej warstwy supernatantu do przygotowanego naczynia do odbierania tłuszczu (ppkt 6.4), zawierającego kilka kawałków substancji ułatwiającej wrzenie (ppkt 5.10) w przypadku kolby (nieobowiązkowo przy stosowaniu metalowego naczynka), unikając dekantacji czegokolwiek z warstwy wodnej.

Przepłukać zewnętrzną stronę szyjki kolby ekstrakcyjnej przy użyciu małej ilości mieszaniny rozpuszczalników (ppkt 4.6), zbierając popłuczyny w pojemniku do odbierania tłuszczu i uważając aby mieszanina rozpuszczalników nie wydostała się na zewnątrz kolby ekstrakcyjnej.

6.5.9. Jeśli potrzeba, można usunąć rozpuszczalnik albo część rozpuszczalnika z pojemnika przez destylację lub odparowanie według ppkt 6.5.12.

6.5.10. Dodać 5 ml alkoholu etylowego (ppkt 4.2) do zawartości kolby ekstrakcyjnej, używając alkoholu etylowego do przepłukania wewnętrznej ścianki szyjki kolby i zmieszać jak opisano w ppkt 6.5.2.

6.5.11. Przeprowadzić drugą ekstrakcję, powtarzając czynności opisane w ppkt 6.5.3–6.5.8 włącznie, ale używając tylko 15 ml eteru dietylu (ppkt 4.4) i 15 ml eteru naftowego (ppkt 4.5), zastosować eter do przepłukania wewnętrznej strony szyjki kolby ekstrakcyjnej. Jeśli konieczne, podnieść granicę faz do poziomu środkowej części trzonu kolby, aby umożliwić jak najbardziej kompletną ostateczną dekantację rozpuszczalnika.

Przeprowadzić trzecią ekstrakcję, przez dalsze powtarzanie czynności opisanych w pkt 6.5.3–6.5.8 włącznie, ale używając tylko 15 ml eteru dietylu (ppkt 4.4) i 15 ml eteru naftowego (ppkt 4.5), zastosować eter do przepłukania wewnętrznej strony szyjki kolby ekstrakcyjnej. Jeśli konieczne, podnieść granicę faz do poziomu środkowej części szyjki kolby, aby ostateczna dekantacja rozpuszczalnika była jak najbardziej kompletna. W przypadku mleka odtłuszczonego można pominąć trzecią ekstrakcję.

6.5.12. Usunąć rozpuszczalniki (z alkoholem etylowym włącznie) możliwie w jak największym stopniu z kolby przez destylację albo ze zlewki lub naczyńka przez odparowanie (ppkt 5.3), przepłukując wnętrze szyjki kolby małą ilością mieszaniny rozpuszczalników (ppkt 4.6) przed rozpoczęciem destylacji.

6.5.13. Ogrzewać pojemnik do odbierania tłuszczu (kolba powinna znajdować się w pozycji leżącej, aby umożliwić wydostawanie się oparów rozpuszczalnika) przez 1 godz. w suszarce (ppkt 5.4). Usunąć pojemnik do odbierania tłuszczu z suszarki, pozwolić na ostudzenie (nie w eksykatorze, ale zabezpieczyć od pyłu) do temperatury pomieszczenia do ważenia (w przypadku szklanych pojemników, co najmniej przez 1 godz., dla metalowych naczynek co najmniej przez 30 minut) i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

Nie wycierać naczynia bezpośrednio przed ważeniem. Umieścić naczynie na wadze przy użyciu szczypiec i unikać w szczególności wahań temperatury.

6.5.14. Powtórzyć czynności opisane w ppkt 6.5.13 aż masa pojemnika do odbierania tłuszczu zmniejszy się o 0,5 mg lub mniej, lub wzrośnie, między dwoma kolejnymi ważeniami, zanotować minimalną stwierdzoną masę jako masę pojemnika do odbioru tłuszczu i wyekstrahowanej substancji.

6.5.15. Dodać 25 ml eteru naftowego do pojemnika do odbierania tłuszczu, aby sprawdzić, czy wyekstrahowana substancja jest całkowicie rozpuszczalna czy nie. Ogrzewać łagodnie i wirować rozpuszczalnikiem aż cały tłuszcz się rozpuści.

Jeśli wyekstrahowana substancja rozpuści się całkowicie w eterze naftowym, przyjąć masę tłuszczu jako różnicę między ostateczną masą pojemnika zawierającego wyekstrahowaną substancję (ppkt 6.5.14) i jego początkową masą (ppkt 6.4).

6.5.16. Jeśli wyekstrahowana substancja nie rozpuści się całkowicie w eterze naftowym, lub w przypadku wątpliwym, przeprowadzić całkowitą ekstrakcję tłuszczu z pojemnika, przez wielokrotne przemywanie ciepłym eterem naftowym.

Pozwolić na osadzenie się wszelkich nierozpuszczonych pozostałości i ostrożnie zdekantować eter naftowy bez usuwania jakiejkolwiek nierozpuszczonej substancji. Powtórzyć tę czynność trzykrotnie, stosując eter naftowy do przepłukania wnętrza szyjki kolby.

Ostatecznie przepłukać zewnętrzną stronę górnej części pojemnika z mieszaniną rozpuszczalników, tak aby rozpuszczalniki nie wydostały się poza pojemnik. Usunąć opary eteru naftowego z pojemnika, ogrzewając go przez 1 godz. w suszarce, pozwolić na ostudzenie i zważyć, według ppkt 6.5.13 i 6.5.14.

Przyjąć masę tłuszczu jako różnicę między masą oznaczoną w ppkt 6.5.14 i niniejszą masą ostateczną.

7. PREZENTACJA WYNIKÓW

7.1. **Obliczenie i wzór**

Wyliczyć zawartość tłuszczu jako procent masy próbki według wzoru:

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

gdzie:

F = zawartość tłuszczu,

m_0 = masa porcji do badania (ppkt 6.2), w gramach,

m_1 = masa pojemnika do odbierania tłuszczu i wyekstrahowanej substancji, oznaczona według ppkt 6.5.14, w gramach,

m_2 = masa przygotowanego pojemnika do odbierania tłuszczu lub w przypadku nierozpuszczonej substancji, masa pojemnika do odbierania tłuszczu oraz nierozpuszczonych pozostałości, oznaczona w ppkt 6.5.16, w gramach,

m_3 = masa pojemnika do odbierania tłuszczu użytego w ślepej próbie (ppkt 6.3) oraz wszelkiej wyekstrahowanej substancji oznaczonej w ppkt 6.5.14, w gramach,

m_4 = masa przygotowanego pojemnika do odbierania tłuszczu (patrz ppkt 6.4) użytego w ślepej próbie (ppkt 6.3), lub w przypadku nierozpuszczonej substancji, pojemnika do odbierania tłuszczu i nierozpuszczalnych pozostałości oznaczonych w ppkt 6.5.16, w gramach.

Zanotować wynik z dokładnością do 0,01 %.

7.2. **Dokładność**

7.2.1. *Powtarzalność (r)*:

— dla mleka pełnego i dla mleka częściowo odtłuszczonego: 0,02 g tłuszczu na 100 g produktu,

— dla mleka odtłuszczonego: 0,01 g tłuszczu na 100 g produktu.

7.2.2. *Odtwarzalność (R)*:

— dla mleka pełnego: 0,04 g tłuszczu na 100 g produktu,

— dla mleka częściowo odtłuszczonego: 0,03 g tłuszczu na 100 g produktu,

— dla mleka odtłuszczonego: 0,025 g tłuszczu na 100 g produktu.

III. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BEZTŁUSZCZOWYCH SUBSTANCJI STAŁYCH

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura określa wzorcową metodę dla oznaczania zawartości beztłuszczowych substancji stałych w mleku poddanym obróbce termicznej.

2. DEFINICJA I OBLICZANIE

Zawartość beztłuszczowych substancji stałych musi być wyrażona jako procent masy próbki.

Zawartość beztłuszczowych substancji stałych stanowi:

Ogólną zawartość substancji stałych (patrz sekcja I) minus zawartość tłuszczu (patrz sekcja II).

IV. OZNACZANIE OGÓLNEJ ZAWARTOŚCI AZOTU

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura określa wzorcową metodę dla oznaczania ogólnej zawartości azotu w surowym mleku, w mleku pełnym, mleku częściowo odtłuszczonym i w mleku odtłuszczonym.

2. DEFINICJA

Ogólna zawartość azotu w mleku: zawartość azotu, wyrażona jako procent masy próbki, oznaczona określoną metodą Kjeldahla.

3. ZASADA

Zasada polega na ekstrakcji odważonej ilości próbki mleka przy użyciu stężonego kwasu siarkowego i siarczanu potasowego oraz siarczanu miedziowego (II) jako katalizatora, w celu przekształcenia azotu związków organicznych w siarczan amonowy. Amoniak jest uwalniany przez dodanie roztworu wodorotlenku sodowego, a następnie jest destylowany i absorbowany w roztworze kwasu borowego. Wówczas jest miareczkowany przy użyciu roztworu kwasu.

4. ODCZYNNIKI

4.1. Siarczan potasowy (K_2SO_4)

4.2. **Roztwór siarczanu miedziowego**. Rozpuścić 5,0 g hydratu siarczanu miedziowego (II) ($CuSO_4$, $5H_2O$) w wodzie i rozcieńczyć do 100 ml (w temperaturze 20 °C) w kolbie miarowej.

4.3. **Kwas siarkowy**, co najmniej 98 % (m/m) H_2SO_4.

4.4. **Roztwór wodorotlenku sodowego**, 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (20 °C).

Uwaga: Można stosować mniej stężony roztwór wodorotlenku sodowego, na przykład 40 % (m/m) 572 g/l, 20 °C; lub 30 % (m/m) 399 g/l, 20 °C.

4.5. **Roztwór kwasu borowego**. Rozpuścić 40 g kwasu borowego (H_3BO_3) w jednym litrze gorącej wody, ostudzić i przechować w szklanej butelce z krzemianu borowego.

4.6. **Roztwór wskaźnika**. Rozpuścić 0,01 g czerwieni metylowej, 0,02 g błękitu bromo-tymolowego i 0,06 g zieleni bromokrezolowej w 100 ml alkoholu etylowego. Przechowywać roztwór w zamkniętej butelce z ciemnego szkła w chłodnym, ciemnym miejscu.

4.7. Roztwór objętościowy

c ($½H_2SO_4$) lub c (HCl) = 0,1 mol/l znormalizowany z dokładnością do 0,0001 mol/l.

4.8. Sacharoza wolna od azotu

4.9. **Sól amonowa**, taka jak szczawian amonowy $(NH_4)_2C_2O_4,H_2O$ lub siarczan amonowy $(NH_4)_2SO_4$.

4.10. **Tryptofan** ($C_{11}H_{12}N_2O_2$), **fenacetyna** ($C_{10}H_7CH_2CONH_2$) lub jedno- lub di-chlorowodorek lizyny ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ lub $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$).

Uwaga: *Czystość* odczynników podanych w ppkt 4.9 i 4.10 powinna być wyższej jakości niż „klasa analityczna". Jeśli możliwe, należy użyć poświadczonego roztworu soli amonowej (ppkt 4.9).

5. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, oraz w szczególności:

5.1. **Kolby Kjeldahla**, o pojemności 500 ml.

5.2. **Stosowne środki pomocnicze**, ułatwiające wrzenie, na przykład szklane kulki o średnicy ok. 5 mm, granulki Hengara, kawałki pumeksu.

5.3. **Biureta lub pipeta automatyczna**, do przenoszenia objętości 1,0 ml.

5.4. **Wyskalowane cylindry miarowe**, szklane, o pojemności 50, 100 i 250 ml.

5.5. **Aparat do ekstrakcji** w pozycji pochylonej (ok. 45°), z elektrycznymi urządzeniami do ogrzewania lub palnikami gazowymi, które nie ogrzewają kolb powyżej poziomu ich zawartości, wraz z systemem odprowadzania wyziewów.

5.6. **Aparat do destylacji**, wykonany ze szkła borokrzemianowego, do którego można przymocować kolbę Kjeldahla (ppkt 5.1), składającą się ze sprawnie działającej osłony przed wychlapaniem cieczy, połączonej ze sprawnym skraplaczem z długą wewnętrzną rurką i rurką wylotową umocowaną przy jej dolnym końcu; przewody łączące i zatyczka(-i) powinny być szczelne, najlepiej z gumy neoprenowej.

5.7. **Pipeta lub pipeta automatyczna**, do przenoszenia objętości 1,0 ml.

5.8. **Kolby stożkowe**, o pojemności 500 ml, wyskalowane co 200 ml.

5.9. **Biureta** o pojemności 50 ml, wyskalowana co 0,1 ml, maksymalny błąd ± 0,05 ml.

5.10. **Soczewki powiększające**, do odczytywania wskazań biurety (ppkt 5.9).

5.11. Pehametr

5.12. Biureta automatyczna

6. PROCEDURA

6.1. Do kolby Kjeldahla (ppkt 5.1) dodać środki pomocnicze, ułatwiające wrzenie (ppkt 5.2) (np. trzy szklane kulki), 15 g siarczanu potasowego (ppkt 4.1), 1,0 ml roztworu siarczanu miedziowego (ppkt 4.2), około 5 g próbki mleka (zważonej z dokładnością do 0,001 g) oraz 25 ml kwasu siarkowego (ppkt 4.1). Użyć kwasu do spłukania jakichkolwiek pozostałości roztworu siarczanu miedziowego, siarczanu potasowego lub mleka w dół szyjki kolby i delikatnie wymieszać zawartość kolby.

Uwaga: *Ponieważ* substancja organiczna zużywa kwas siarkowy podczas wrzenia, należy użyć 30 ml H_2SO_4 (ppkt 4.3), zamiast 25 ml do ekstrakcji, jeżeli mleko zawiera więcej niż 5,0 % (m/m) tłuszczu. Należy także tak postąpić w ślepej próbie.

6.2. Ogrzewać każdą kolbę Kjeldahla w aparacie do ekstrakcji (ppkt 5.5), początkowo bardzo łagodnie, tak aby cała zawartość czarnej piany pozostała w obrębie kulistej części. Po ustaniu pienienia i pojawieniu się obfitych białych oparów, prowadzić energicznie wrzenie (opary kwasowe będą skraplać się w połowie odległości szyjki kolby do góry) aż znikną czarne cząstki i ekstrahowana substancja stanie się klarowna i blado niebiesko-zielona. Wówczas prowadzić łagodnie wrzenie, przez co najmniej 1,5 godz. Należy zwrócić uwagę na następujące wymagania:

a) Czas wymagany, aby ekstrahowana substancja stała się klarowna, nie powinien być dłuższy niż jedna godzina, a całkowity czas ekstrakcji nie powinien być krótszy niż 2,5 godz. Jeśli konieczna jest więcej niż 1 godz. do uzyskania klarowności, całkowity czas ekstrakcji powinien być stosownie dłuższy.

b) Dodany siarczan potasowy wzmaga ekstrakcję, gdyż podnosi temperaturę wrzenia mieszaniny. Jeśli pozostałość resztkowa H_2SO_4 jest mniejsza niż 15 ml pod koniec czasu ekstrakcji, może nastąpić utrata azotu wskutek nadmiernego ogrzewania. Jeśli ogrzewanie jest prowadzone przy użyciu gazu, należy ogrzewać kolbę na płytce z materiału termoizolacyjnego, posiadającej okrągły otwór o takiej średnicy, aby wolny ogień dosięgał tylko tej części kolby, która znajduje się poniżej powierzchni cieczy (ppkt 5.5).

c) Jeśli czarne cząstki przedostaną się do szyjki kolby i nie zostaną wszystkie spłukane w dół do części kulistej poprzez obmywanie kwasem podczas początkowych etapów okresu energicznego wrzenia (można to ułatwić poprzez obracanie kolby), pozwolić na dostateczne ostudzenie kolby i starannie przemyć minimalną ilością wody. Następnie kontynuować ekstrakcję, jak opisano powyżej.

6.3. Kiedy kolby Kjeldahla zostaną ostudzone, dodać 300 ml wody (patrz uwaga) do każdej z nich tak, aby spłukać pozostałości starannie w dół szyjki kolby i wymieszać dokładnie zawartość, zapewniając, aby kryształki, które się wydzieliły, zostały rozpuszczone. Dodać trochę środków ułatwiających wrzenie (ppkt 5.2), aby zapewnić jednolite wrzenie całości. Następnie do każdej kolby dodać 70 ml roztworu wodorotlenku sodowego (ppkt 4.4) (patrz uwaga), delikatnie wlewając roztwór w dół pochylonej szyjki kolby, aby utworzyć dolną warstwę w części kulistej; nie zwilżać górnej części szyjki kolby roztworem wodorotlenku sodowego.

Uwaga: *Jest konieczne, aby* połączona objętość wody i roztworu wodorotlenku sodowego wynosząca w sumie 370 ml wytworzyła około 150 ml destylatu zbieranego tuż przed wystąpieniem bezładnego wrzenia („wrzenie burzliwe") (ppkt 6.4). Tak więc, jeśli zostanie dodana większa równoważna objętość roztworu wodorotlenku sodowego o stężeniu mniejszym niż 47 % (m/m), objętość dodanej wody powinna być stosownie zmniejszona, na przykład, jeśli zostanie dodane 85 ml 40 % (m/m) lub 125 ml 30 % roztworu wodorotlenku sodowego, objętość dodanej wody powinna odpowiednio wynosić 285 ml lub 245 ml.

6.4. Niezwłocznie połączyć wszystkie kolby Kjeldahla z aparatem do destylacji (ppkt 5.6). Zapewnić, aby czubek rurki wylotowej skraplacza był zanurzony w 50 ml roztworu kwasu borowego (ppkt 4.5) wraz z 0,20 ml (5–6 kropli) roztworu wskaźnika (ppkt 4.6), wszystko powinno znajdować się w kolbie stożkowej (ppkt 5.8). Obracać wszystkie kolby Kjeldahla, aby starannie wymieszać ich zawartość i rozpocząć wrzenie, początkowo delikatnie, aby zapobiec nadmiernemu pienieniu. Po zebraniu 100 –125 ml destylatu obniżyć każdą kolbę stożkową, aż czubek rurki wylotowej skraplacza będzie znajdować się około 40 ml powyżej podziałki oznaczającej 200 ml. Kontynuować destylację aż do pojawienia się bezładnego wrzenia („wrzenie burzliwe") i wówczas niezwłocznie przerwać ogrzewanie. Odłączyć wszystkie kolby Kjeldahla i przemyć czubek każdej rurki wylotowej chłodniczki małą ilością wody, zbierając popłuczyny do kolby stożkowej. Należy zwrócić uwagę na następujące wymagania:

a) Szybkość destylacji powinna być taka, aby zebrać około 150 ml destylatu, kiedy rozpocznie się bezładne wrzenie („wrzenie burzliwe"), objętość zawartości każdej kolby stożkowej wynosiłaby wtedy około 200 ml.

b) Wydajność każdego skraplacza powinna być taka, aby temperatura zawartości każdej kolby stożkowej nie przekraczała 25 °C podczas destylacji.

6.5. Miareczkować każdy destylat przy użyciu standardowego roztworu objętościowego (ppkt 4.7) aż pH wyniesie 4,6 ± 0,1, stosując pehametr i jeśli konieczne, automatyczną biuretę. Dodatek wskaźnika pomaga skontrolować, czy miareczkowanie przebiega prawidłowo. Przyjąć odczyt biurety z dokładnością do 0,01 ml przy użyciu soczewek powiększających (ppkt 5.10), unikając błędu paralaksy.

Miareczkowanie można przeprowadzić tylko ze wskaźnikiem. Miareczkować, aż kolor destylatu będzie odpowiadać barwie roztworu przygotowanego ostatnio ze 150 ml wody, do której dodano 50 ml roztworu kwasu borowego i 0,20 ml wskaźnika w kolbie stożkowej (ppkt 5.8).

6.6. Przeprowadzić ślepą próbę według ppkt 6.1–6.5 włącznie, używając 5 ml destylowanej wody wraz z ok. 0,1 g sacharozy (ppkt 4.8) zamiast próbki mleka, stosując wymaganą procedurę.

Uwaga: *Miareczkowanie destylatu* ślepej próby wymaga jedynie bardzo małej ilości standardowego roztworu objętościowego (ppkt 4.7).

6.7. Regularnie kontrolować dokładność procedury, przeprowadzając dwie próby odzysku, przeprowadzając czynności według ppkt 6.1–6.5 włącznie.

6.7.1. Sprawdzić, czy nie ma miejsca utrata azotu jako rezultat nadmiernego ogrzewania lub przecieków mechanicznych podczas destylacji, używając próbki 0,15 g szczawianu lub siarczanu amonowego (ppkt 4.9) zważonego z dokładnością do 0,001 g wraz z 0,1 g sacharozy (ppkt 4.8).

Procentowa zawartość odzyskanego azotu powinna znajdować się między 99 a 100 %.

Niższe lub wyższe wyniki będą wskazywać na błędy w procedurze i/lub niedokładne stężenie roztworu standardowego (ppkt 4.7).

6.7.2. Sprawdzić, czy procedura ekstrakcji jest dostateczna, aby uwolnić cały azot białkowy, używając porcji do badania: 0,20 g czystego tryptofanu, 0,35 g fenacetyny lub 0,20 g chlorowodorku lizyny (ppkt 4.10). Wszystkie ważenia powinny być przeprowadzane z dokładnością do 0,001 g. Odzysk azotu powinien wynosić co najmniej 98–99 %.

7. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Przy pracy ze stężonym kwasem siarkowym i wodorotlenkiem sodowym i przy manipulacjach z kolbami Kjeldahla zawsze należy nosić fartuch laboratoryjny, okulary ochronne i rękawiczki kwasoodporne.

Podczas destylacji nigdy nie pozostawiać kolb Kjeldahla bez opieki. Z powodu potencjalnego zagrożenia należy natychmiast przerwać destylację, jeśli zawartość kolb „wrze burzliwie" zbyt energicznie. Jeśli zasilanie mocy zostanie wyłączone na okres dłuższy niż 2–3 minuty, należy obniżyć kolbę tak, aby czubek rurki destylacyjnej wystawał z cieczy.

8. PREZENTACJA WYNIKÓW

8.1. **Obliczanie i wzór:**

Obliczyć zawartość azotu (W_N), wyrażoną w gramach azotu na 100 g produktu według wzoru:

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

gdzie:

W_N = zawartość azotu.

V = objętość standardowego roztworu objętościowego kwasu użytego w oznaczeniu, w mililitrach.

V_O = objętość standardowego roztworu objętościowego kwasu użytego w ślepej próbie, w mililitrach.

c = stężenie, wyrażone w molach na litr standardowego roztworu objętościowego kwasu (ppkt 4.7).

m = masa porcji do badania, w gramach.

Zaokrąglić wynik z dokładnością do 0,001 g na 100 g.

8.2. **Dokładność**

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

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

9. MODYFIKACJA PROCEDUR

9.1. Użyć zblokowanego aparatu do ekstrakcji, wyposażonego w kolby cylindryczne, zamiast aparatu do ekstrakcji i kolb Kjeldahla, opisanych w ppkt 5.5 i 5.1. W tym przypadku, aby zidentyfikować ewentualne kłopoty, należy skontrolować każde miejsce indywidualnie (ppkt 6.7).

9.2. Zastosować destylację parą zamiast bezpośredniego ogrzewania kolb (ppkt 6.4). Kiedy aparatura nie pozwala na użycie wody destylowanej, należy zachować ostrożność, aby użyta woda nie zawierała lotnych substancji kwasowych lub alkalicznych.

9.3. Można użyć porcji do badania 1 g mleka (półmakro metoda Kjeldahla) zamiast 5 g (ppkt 6.1) pod warunkiem, że:

— ilości odczynników użytych do mineralizacji (ppkt 6.1): H_2SO_4, $CuSO_4\ 5H_2O$, K_2SO_4, są zredukowane w tej samej proporcji (1/5),

— całkowity czas ekstrakcji (ppkt 6.2) jest zredukowany do 75 minut.

— ilość roztworu wodorotlenku sodowego (ppkt 6.3) jest zredukowana w tym samym stopniu (1/5).

— musi być użyty standardowy roztwór kwasu (ppkt 4.7) o niższym stężeniu (0,02 –0,03 mol/l).

Uwaga: *Stosowanie jednej lub więcej* z niniejszych opcji jest do przyjęcia tylko wtedy, gdy wartość powtarzalności (ppkt 8.2.1) oraz wyniki dwóch prób na dokładność (ppkt 6.7) pozostają w zgodzie z wymaganiami, podanymi w niniejszej metodzie.

V. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura określa wzorcową metodę dla oznaczania zawartości białka w mleku poddanym obróbce termicznej (art. 3 A3 dyrektywy 85/397/EWG).

2. DEFINICJA

Zawartość białka: Wartość uzyskana przez pomnożenie ogólnej zawartości azotu, wyrażonej jako procent masy próbki, oznaczonej zgodnie z metodą opisaną w rozdziale IV (3), przez odpowiedni współczynnik (3).

3. OBLICZENIE

Zawartość białka w mleku jako procent masy próbki = 6,38 x ogólna zawartość N mleka %.

VI. OZNACZANIE MASY WŁAŚCIWEJ

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura określa wzorcową metodę dla oznaczania masy właściwej, w temperaturze 20 °C: mleka surowego, mleka pełnego, mleka częściowo odtłuszczonego oraz mleka odtłuszczonego.

2. DEFINICJA

Masa właściwa mleka stanowi stosunek masy pewnej ilości mleka w temperaturze 20 °C do masy tej samej objętości wody w temperaturze 20 °C.

3. ZASADA

Masę właściwą w temperaturze 20 °C oznacza się przy użyciu areometru.

4. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, oraz w szczególności:

4.1. Areometr

Areometr do oznaczania masy właściwej jest instrumentem składającym się ze szklanego pływaka, który, w swoim dolnym końcu, jest szeroki i ciężki. Pałeczka dzklana o cylindrycznym kształcie jest umocowana do górnej części pływaka i współosiowo skierowana ku niemu; górna część pałeczki jest zamknięta.

Szklany pływak zawiera obciążenie (ołów, rtęć itp.) przeznaczone do uregulowania masy areometru. Pałeczka posiada wyskalowaną podziałkę 1,025–1,035 g/ml.

Areometr powinien być kontrolowany metodą piknometryczną, stosując piknometr o pojemności około 100 ml, wyposażony w termometr o wysokiej dokładności.

4.2. **Cylindry** (szklane lub ze stali nierdzewnej).

Minimalne wymiary powinny wynosić:

— średnica wewnętrzna około 35 mm

— wysokość wewnętrzna około 225 mm.

4.3. **Łaźnia wodna**, z kontrolą temperatury w 20 ± 0,1 °C.

4.4. **Łaźnia wodna**, z kontrolą temperatury w 40 ± 2 °C.

4.5. **Termometr**, wyskalowany z dokładnością do 0,5 °C.

5. PROCEDURA

5.1. Wymieszać próbkę przez odwracanie, aby rozproszyć tłuszcz, i umieścić w łaźni wodnej (ppkt 4.4). Doprowadzić próbkę do temperatury 40 °C i utrzymać w tej temperaturze przez 5 minut. Wymieszać starannie przez ostrożne odwracanie, aby zapewnić jednorodne rozmieszczenie tłuszczu. Oziębić do temperatury 20 C w drugiej łaźni wodnej (ppkt 4.3).

5.2. Wymieszać starannie próbkę, ostrożnie odwracając, aby uniknąć pochwycenia pęcherzyków powietrza. Przelać mleko do cylindra (ppkt 4.2), utrzymanego w pozycji pochylonej, tak aby uniknąć wytworzenia piany lub pęcherzyków. Użyć dostatecznej próbki mleka, aby zapewnić, że pewna jego ilość przeleje się do cylindra, kiedy zostanie w nim umieszczony areometr (ppkt 4.1). Ostrożnie opuścić areometr do mleka i pozwolić, aby pływał swobodnie, kiedy znajdzie się w pozycji równowagi. Cylinder powinien znajdować się w pozycji pionowej. Areometr musi być umieszczony w środku słupka cieczy i nie powinien dotykać ścianek cylindra.

5.3. Kiedy areometr osiągnie położenie równowagi, odczytać skalę na górnej części menisku.

5.4. Natychmiast po dokonaniu odczytu areometru, wprowadzić termometr (ppkt 4.5) do próbki i odczytać temperaturę z dokładnością do 0,5 °C. Temperatura nie może różnić się więcej niż ± 2 °C od temperatury ± 20 °C.

6. POPRAWKA NA TEMPERATURĘ

6.1. Jeśli temperatura próbki mleka nie wynosi dokładnie 20 °C w chwili oznaczania masy właściwej, wówczas uzyskany wynik musi być skorygowany dodając do oznaczonej masy właściwej 0,0002 za każdy stopień Celsjusza powyżej 20 °C, lub odejmując 0,0002 za każdy stopień Celsjusza poniżej 20 °C. Niniejsza poprawka jest ważna tylko wtedy, gdy temperatura próbki mleka różni się nie więcej niż o 5 °C od 20 °C.

7. PREZENTACJA WYNIKÓW

Metoda obliczania i wzór: masa właściwa jest wyrażona w gramach/ml mleka odtłuszczonego w temperaturze 20 °C według następującego wzoru:

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

gdzie:

mv = masa właściwa próbki odczytana na areometrze (ppkt 5.4) w gramach/l

MG = zawartość tłuszczu w próbce w gramach/l

0,92 = gęstość tłuszczu mleka.

8. DOKŁADNOŚĆ METODY

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

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

Dodatek

(do załącznika II)

ALTERNATYWNE PROCEDURY PRZY UŻYCIU PROBÓWEK DO EKSTRAKCJI Z OSPRZĘTEM SYFONOWYM LUB TRYSKAWKOWYM

A.1. **PROCEDURA**

A.1.1. **Przygotowanie próbki do badań**

Patrz ppkt 6.1.

A.1.2. **Próbka do badań**

Postępować jak podano w ppkt 6.2, ale użyć probówki do ekstrakcji (patrz ppkt 5.6).

Próbka do badań powinna zostać przeniesiona możliwie w całości na dno probówki do ekstrakcji.

A.1.3. **Ślepa próba**

Patrz ppkt 6.3.

A.1.4. **Przygotowanie pojemnika do odbierania tłuszczu**

Patrz ppkt 6.4.

A.1.5. **Oznaczanie**

A.1.5.1. Dodać 2 ml roztworu amoniaku (ppkt 4.1) lub równoważną objętość roztworu amoniaku o większym stężeniu i starannie wymieszać z przygotowaną próbką do badań na dnie probówki. Po dodaniu amoniaku przeprowadzić niezwłocznie oznaczenie.

A.1.5.2. Dodać 10 ml alkoholu etylowego (ppkt 4.2) i delikatnie, lecz starannie wymieszać na dnie probówki. *Jeśli potrzeba*, dodać dwie krople roztworu czerwieni Kongo lub czerwieni krezolowej (ppkt 4.3).

A.1.5.3. Dodać 25 ml eteru dietylu (ppkt 4.4), zamknąć probówkę korkiem nasyconym wodą lub zatyczką zwilżoną wodą (ppkt 5.6) i potrząsać probówką energicznie, ale nie nadmiernie (aby uniknąć wytworzenia trwałych emulsji), wielokrotnie odwracając przez minutę. Jeśli konieczne, ostudzić probówkę pod bieżącą wodą, następnie ostrożnie usunąć korek lub zatyczkę i przemyć ją oraz szyjkę probówki przy użyciu mieszaniny rozpuszczalników (ppkt 4.6), stosując tryskawkę (ppkt 5.8), tak aby popłuczyny spłynęły do probówki.

A.1.5.4. Dodać 25 ml eteru naftowego (ppkt 4.5), zamknąć probówkę ponownie zwilżonym korkiem lub zatyczką (zwilżyć ponownie przez zanurzenie w wodzie) oraz potrząsać probówką łagodnie przez 30 sekund jak to opisano w ppkt A.1.5.3.

A.1.5.5. Odwirować zamkniętą probówkę przez jedną do pięciu minut przy częstotliwości 500–600 obrotów na minutę do ($^{-1}$) (ppkt 5.2). Jeżeli nie ma wirówki (patrz uwaga do ppkt 5.2), wstawić pionowo probówkę do statywu (ppkt 5.7) na co najmniej 30 minut, aż warstwa cieczy sklarowanej nad osadem (supernatant) stanie się klarowna i wyraźnie oddzielona od warstwy wodnej. Jeśli konieczne, ostudzić probówkę pod bieżącą wodą.

A.1.5.6. Ostrożnie usunąć korek lub zatyczkę i przepłukać ją oraz szyjkę probówki małą ilością mieszaniny rozpuszczalników tak, aby popłuczyny spłynęły do probówki.

A.1.5.7. Wstawić osprzęt syfonowy lub tryskawkę do probówki i wepchnąć w dół długą część osprzętu aż wlot znajdzie się około 3 mm powyżej granicy faz między warstwami. Wewnętrzna część armatury powinna być równoległa do osi probówki ekstrakcyjnej.

Ostrożnie przenieść warstwę supernatantu z probówki do przygotowanego pojemnika do odbierania tłuszczu (ppkt 6.4), zawierającego kilka kawałków środka ułatwiającego wrzenie (ppkt 5.10) w przypadku kolb (nieobowiązkowe przy stosowaniu naczynek metalowych), unikając przeniesienia jakiejkolwiek ilości warstwy wodnej. Przepłukać wylot osprzętu przy użyciu małej ilości mieszaniny rozpuszczalników, zbierając popłuczyny w pojemniku do odbierania tłuszczu.

A.1.5.8. Poluzować osprzęt na szyjce probówki, lekko podnieść osprzęt i przemyć dolny odcinek jego wewnętrznej, długiej części przy użyciu małej ilości mieszaniny rozpuszczalników. Obniżyć i ponownie umieścić osprzęt oraz przenieść popłuczyny do pojemnika do odbierania tłuszczu.

Przepłukać wylot osprzętu małą ilością mieszaniny rozpuszczalników, zbierając popłuczyny w pojemniku. Jeśli potrzeba, można usunąć rozpuszczalnik lub część rozpuszczalnika z pojemnika, przez destylację lub odparowanie jak to opisano w ppkt 6.5.12.

A.1.5.9. Ponownie rozluźnić osprzęt na szyjce próbówki, nieco podnieść osprzęt i dodać 5 ml alkoholu etylowego do zawartości próbówki, używając alkoholu etylowego do przepłukania długiej wewnętrznej części osprzętu; wymieszać jak przedstawiono w ppkt A.1.5.2.

A.1.5.10. Przeprowadzić *drugą ekstrakcję*, powtarzając czynności opisane w ppkt A.1.5.3–A.1.5.8, ale używając tylko 15 ml eteru dietylu (ppkt 4.4) i 15 ml eteru naftowego (ppkt 4.5). Użyć eteru do przepłukania długiej, wewnętrznej części osprzętu podczas zdejmowania osprzętu z probówki po poprzedniej ekstrakcji.

A.1.5.11. Przeprowadzić *trzecią ekstrakcję*, ponownie powtarzając czynności opisane w ppkt A.1.5.3–A.1.5.8, używając 15 ml eteru dietylu i 15 ml eteru naftowego i przemywając długą, wewnętrzną część osprzętu według ppkt A.1.5.10.

W przypadku mleka odtłuszczonego można opuścić trzecią ekstrakcję.

A.1.5.12. Postępować, jak określono w ppkt 6.5.12–6.5.16.