31992D0608

31.12.1992 URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI L 407/29

ODLOČBA SVETA

z dne 14. novembra 1992

o določitvi analitskih metod in preskušanja toplotno obdelanega mleka za neposredno prehrano ljudi

(92/608/EGS)

SVET EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 85/397/EGS z dne 5. avgusta 1985 o težavah pri zdravju ljudi in živali, ki vplivajo na trgovino s toplotno obdelanim mlekom v Skupnosti [1] in zlasti člena 11(6) Direktive,

ob upoštevanju predloga Komisije,

ker mora Svet na podlagi člena 11(6) Direktive 85/397/EGS določiti podrobno ureditev za preglede, predvidene v členu 11(2); ker je namen takih pregledov, ki jih opravijo obrati pod nadzorom in odgovornostjo uradnega organa ter z njegovim periodičnim pregledovanjem, zagotoviti skladnost z zahtevami Direktive 85/397/EGS in zlasti z zahtevami, določenimi v členu 3(A)(3) Direktive;

ker določitev postopkov preverjanja vključuje določitev metod, ki se uporabijo za njihovo izvajanje;

ker je treba predpisati metode za določitev vsebnosti skupne suhe snovi, vsebnosti maščobe, vsebnosti suhe snovi brez maščobe, vsebnosti skupnega dušika, vsebnosti beljakovin in gostote toplotno obdelanega mleka, namenjenega za neposredno prehrano ljudi;

ker je iz tehničnih razlogov najprej treba določiti referenčne analitske metode in preskušanje, da se zagotovi izpolnjevanje standardov iz člena 3(A)(3) Direktive 85/397/EGS; ker je zlasti pomembno, da se preučijo pogoji, pod katerimi se uporabljajo rutinske analitske metode in preskušanje; ker morajo pristojni organi, dokler niso znani rezultati te študije, poskrbeti, da se uporabljajo ustrezne rutinske metode, da se zagotovi izpolnjevanje navedenih standardov;

ker določitev zgoraj navedenih metod vključuje zlasti določitev analitskih postopkov in določitev meril zanesljivosti, da se zagotovi enotna razlaga rezultatov,

SPREJEL NASLEDNJO ODLOČBO:

Člen 1

Analitske metode in preskušanje toplotno obdelanega mleka obsega:

— določitev vsebnosti skupne suhe snovi,

— določitev vsebnosti maščobe,

— določitev vsebnosti skupne suhe snovi brez maščobe,

— določitev vsebnosti skupnega dušika,

— določitev vsebnosti beljakovin,

— določitev specifične mase.

[1] UL L 226, 24.8.1985, str. 13. Direktiva, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 89/662/EGS (UL L 395, 30.12.1989, str. 13).

Člen 2

Izvajanje referenčnih analitskih metod in preskušanja, določitev meril zanesljivosti in odvzem vzorcev je treba izvesti v skladu s pravili, določenimi v Prilogi I.

Člen 3

Metode iz člena 1 so določene v Prilogi II.

Člen 4

Ta odločba je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 14. novembra 1992

Za Svet

Predsednik

J. GUMMER

PRILOGA I

I. SPLOŠNE DOLOČBE

1. UVOD

Opisane so splošne določbe v zvezi z reagenti, opremo, podajanjem rezultatov, natančnostjo in poročili o preskusu. Spoštovati jih morajo pristojne oblasti držav članic in pooblaščeni laboratoriji, ki so zadolženi za vzorčenje in preskušanje mleka.

2. REAGENTI

2.1. **Voda**

2.1.1. Kadarkoli je navedena voda za raztapljanje, redčenje ali spiranje, se uporabi destilirana, deionizirana ali demineralizirana voda najmanj enakovredne čistosti, razen če ni določeno drugače.

2.1.2. Kadarkoli je navedeno „raztapljanje“ ali „redčenje“ brez nadaljnjega pojasnila, je mišljeno „raztapljanje v vodi“ ali „redčenje z vodo“.

2.2. **Kemikalije**

Vse uporabljene kemikalije so analitske čistosti, če ni drugače določeno.

3. OPREMA

3.1. **Seznami opreme**

Seznami opreme, navedeni v različnih referenčnih metodah, vsebujejo samo pribor za posebno uporabo in pribor z določenimi lastnostmi.

3.2. **Analitska tehtnica**

„Analitska tehtnica“ pomeni tehtnico z možnostjo tehtanja na 0,1 mg natančno.

4. PODAJANJE REZULTATOV

4.1. **Rezultati**

Če ni drugače določeno, je rezultat, naveden v poročilu o preskusu (6), aritmetična sredina, dobljena iz dveh preskusov, ki izpolnjujeta merilo ponovljivosti (5.1.1), določeno za to metodo. Če merilo ponovljivosti ni izpolnjeno, je preskus treba ponoviti, če je to možno, ali pa rezultat proglasiti za neveljaven.

4.2. **Izračun masnega deleža**

Razen kadar je drugače določeno, se rezultat izračuna kot masni delež vzorca.

5. MERILA NATANČNOSTI: PONOVLJIVOST IN OBNOVLJIVOST

5.1. Merila natančnosti, navedena v vsaki metodi, so opredeljena, kakor sledi:

5.1.1. *Ponovljivost (r)* je vrednost, pod katero se nahaja absolutna razlika med dvema posameznima testnima rezultatoma, dobljenima z istim postopkom na identičnem vzorcu za analizo pod enakimi pogoji (isti analitik, ista oprema, isti laboratorij, kratek časovni interval).

5.1.2. *Obnovljivost (R)* je vrednost, pod katero se nahaja absolutna razlika med dvema posameznima testnima rezultatoma, dobljenima z istim postopkom na vzorcu za analizo pod različnimi pogoji (različna analitika, različna oprema, različna laboratorija in/ali različen čas).

5.1.3. Če ni drugače določeno za vsako posamezno metodo, predstavljajo vrednosti merila ponovljivosti in obnovljivosti 95 % interval zaupanja, kot je določeno v ISO 5725: 2. izdaja, 1986.

5.1.4. Načrtovati bi morali: potrebno medlaboratorijsko primerjalno preskušanje in študije in jih izvajati v skladu z mednarodnimi smernicami.

6. POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu navaja uporabljeno analitsko metodo in tudi dobljene rezultate. Poleg tega navaja vse podrobnosti v zvezi z uporabljenim postopkom, ki niso opredeljene v analitski metodi ali so poljubne, kot tudi vse druge okoliščine, ki so lahko vplivale na dobljene rezultate. Poročilo o preskusu navaja vse informacije, potrebne za popolno identifikacijo vzorca.

II. VZORČENJE TOPLOTNO OBDELANEGA MLEKA

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek točno določa referenčno metodo vzorčenja, transporta in shranjevanja vzorcev toplotno obdelanega mleka.

2. SPLOŠNO

Vzorčenje toplotno obdelanega mleka v cisternah, itd. izvaja strokovna oseba ki je bila pred začetkom vzorčenja ustrezno usposobljena.

Če je potrebno mora, pristojni organ ali preskusni laboratorij poučiti osebje, ki izvaja vzorčenje, o tehnikah vzorčenja, da se zagotovi, da je vzorec reprezentativen in skladen s celotno serijo.

Če je potrebno mora, pristojni organ ali preskusni laboratorij poučiti osebje, ki izvaja vzorčenje, o označevanju vzorca, da se zagotovi nedvoumna identiteta vzorca.

3. OPREMA ZA VZORČENJE

3.1. **Splošno**

Oprema za vzorčenje je iz nerjavečega jekla ali drugega primernega materiala ustrezne trdnosti in oblikovana tako, da je primerna za predvideni namen (mešanje, vzorčenje itd.). Potopne naprave/mešala za mešanje tekočin v rezervoarjih morajo imeti zadostno površino, da omogočajo ustrezno mešanje proizvoda, ne da bi pri tem povzročili nastanek žarkega priokusa. Zajemalke morajo imeti trden in dovolj dolg ročaj, da omogočajo odvzem vzorca na katerikoli globini rezervoarja. Volumen zajemalke ne sme biti manjši od 50 ml.

Posode za vzorce in pokrovi morajo biti iz stekla, primerne kovine ali plastike.

Materiali, iz katerih je narejena oprema za vzorčenje (vključno s posodami za vzorce in pokrovi), ne smejo povzročati sprememb v vzorcu, ki bi lahko vplivale na rezultate preiskav. Vse površine opreme za vzorčenje in posod za vzorce morajo biti čiste in suhe, gladke in brez razpok, robovi pa so zaobljeni.

4. TEHNIKA VZORČENJA

4.1. **Splošno**

Ne glede na teste, ki se bodo izvajali, se mleko pred vzorčenjem temeljito premeša, bodisi ročno ali mehansko.

Vzorec se vzame takoj po mešanju, medtem ko je mleko še v gibanju.

Volumen vzorca mora zadostovati potrebam preskušanja. Volumen uporabljenih posod za vzorce mora biti tak, da so posode skoraj v celoti napolnjene z vzorcem, tako da je možno ustrezno mešanje vsebine pred preskušanjem, hkrati pa med transportom ne pride do penjenja

4.2. **Ročno vzorčenje**

4.2.1. *Vzorčenje iz več posod*

Kadar je količina mleka, ki jo je treba vzorčiti, v več rezervoarjih, vzemite reprezentativno količino iz vsakega rezervoarja in označite količino mleka, kateri ustreza vsak vzorec. Razen kadar je treba vzorce iz vsakega rezervoarja preskusiti posamič, zmešajte dele reprezentativnih količin v sorazmerju s količino v rezervoarju, iz katerega je bil posamezni vzorec odvzet. Vzorec(-e) vzemite iz teh skupnih sorazmernih količin po mešanju.

4.2.2. *Vzorčenje iz velikih posod – skladiščne, železniške in cestne cisterne*

4.2.2.1. Pred vzorčenjem mleko premešajte v skladu z ustreznim postopkom.

Za mešanje vsebine velikih posod ali skladiščnih, železniških ali cestnih cistern se priporoča uporaba mehanskih mešalnikov (4.2.2.2).

Stopnja mešanja naj ustreza času, ko je mleko stalo. Učinkovitost postopka mešanja, ki ga uporabimo v katerih koli posebnih okoliščinah, se izkaže kot primerna za namen predvidenih analiz; merilo učinkovitosti mešanja zlasti vpliva na podobnost analitskih rezultatov pri vzorcih, ki so bili odvzeti bodisi iz različnih delov pošiljke bodisi na iztoku iz cisterne v intervalih med praznjenjem. Postopek mešanja mleka (neobdelano mleko ali polno mleko) velja za učinkovitega, če je razlika v vsebnosti maščobe med dvema vzorcema, odvzetima pod temi pogoji, manjša od 0,1 %.

V veliki posodi, ki ima odprtino za izliv na dnu, se lahko zgodi, da je na točki izliva majhna količina mleka, ki tudi po mešanju ni reprezentativna za celotno vsebino. Zato je bolje, da se vzorci jemljejo skozi vhodno odprtino. V primeru jemanja vzorcev na izhodni odprtini, odlijte zadostno količino mleka, da zagotovite reprezentativnost vzorcev glede na celoto.

4.2.2.2. Mešanje vsebine velikih posod ali skladiščnih, železniških ali cestnih cistern se lahko opravi:

— z mehanskim mešalnikom, ki je vgrajen v cisterno in ga poganja elektromotor;

— s propelerjem ali mešalnikom, ki ga poganja elektromotor in je postavljen na vhodno odprtino cisterne z mešalnikom, potopljenim v mleko;

— v primeru železniških ali cestnih cistern z recirkulacijo mleka s pomočjo pretočne cevi, ki je pritrjena na črpalke za praznjenje cisterne in vstavljena skozi vhodno odprtino;

— s čistim filtriranim stisnjenim zrakom. V tem primeru bi se morala uporabiti minimalni zračni tlak in volumen, da se prepreči nastanek žarkega priokusa.

4.3. **Vzorčenje toplotno obdelanega mleka za neposredno prehrano v maloprodajni embalaži**

Vzorci toplotno obdelanega mleka za neposredno prehrano v maloprodajni embalaži morajo biti v originalnem pakiranju. Če je možno, je treba vzorce vzeti iz pakirnega stroja ali hladilnice v predelovalnem obratu takoj ko je mogoče po predelavi (pri pasteriziranem mleku isti dan, kot je bilo predelano).

Vzorci se vzamejo od vsake vrste toplotno obdelanega mleka (pasterizirano, UVT obdelano in sterilizirano) v številu, ki ustreza preiskavam, ki bodo opravljene, in v skladu z navodili, ki jih je določil preskusni laboratorij ali drugi pristojni organ.

5. IDENTIFIKACIJE VZORCA

Vzorec mora biti označen z identifikacijsko kodo tako, da ga je možno brez težav identificirati s pomočjo navodil preskusnega laboratorija ali pristojnega organa.

6. KONZERVIRANJE, TRANSPORT IN HRANJENJE VZORCEV

V skladu s pristojnim nacionalnim organom preskusni laboratorij pripravi navodila v zvezi s pogoji konzerviranja (kemijsko, termično), transporta, hranjenja in časa med vzorčenjem in analizami mleka glede na vrsto mleka in uporabljenim analitskim postopkom.

V navodila morajo biti vključene naslednje točke:

— Med transportom in hranjenjem se izvajajo varnostni ukrepi da se prepreči izpostavljenost kvarnim vonjavam in neposredni sončni svetlobi. Če je posoda za vzorce prosojna, se mora hraniti v temnem prostoru.

PRILOGA II

I. DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNE SUHE SNOVI

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek točno določa referenčno metodo za določanje vsebnosti skupne suhe snovi v mleku.

2. OPREDELITEV

Vsebnost skupne suhe snovi: masa, ki ostane po koncu točno določenega postopka sušenja, izražena kot masni delež.

3. PRINCIP

Izhlapevanje vode iz odtehtanega vzorca v sušilniku pri temperaturi 102 ± 2 °C.

4. OPREMA IN STEKLOVINA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

4.1 **Analitska tehtnica**

4.2 **Eksikator** z učinkovitim sušilnim sredstvom (na primer sveže posušen silikagel z indikatorjem vsebnosti vode).

4.3 **Sušilnik,** ventiliran, temperaturno kontroliran pri 102 ± 2 °C po celotnem delovnem prostoru.

4.4 **Tehtiči z ravnim dnom,** višine 20 do 25 mm, premera 50 do 75 mm, iz ustreznega materiala in z dobro prilegajočimi, lahko odstranljivimi pokrovi.

4.5 **Vrela vodna kopel**

4.6 **Homogenizator**

5. PRIPRAVA VZORCA ZA ANALIZO

Vzorec mleka temperirajte na 20 do 25 °C. Temeljito premešajte, da zagotovite homogeno razporeditev maščobe po celotnem vzorcu. Izogibajte se preveč intenzivnemu mešanju, da ne bi prišlo do penjenja mleka ali pinjenja maščobe. Če ugotovite, da je težko dispergirati plast smetane, počasi segrejte na 25 do 40 °C in s previdnim mešanjem vključite vso smetano, ki se drži sten posode. Vzorec hitro ohladite na 20-25 °C.

Po želji lahko kot pomoč pri dispergiranju maščobe uporabite homogenizator.

Pravilnih rezultatov ni mogoče pričakovati, če vzorec vsebuje ločeno tekočo maščobo ali vidno ločene nepravilno oblikovane bele delce, ki se držijo sten posode.

6. POSTOPEK

6.1 **Priprava tehtiča**

Segrevajte tehtič (4.4) s pokrovom, postavljenim zraven njega, v sušilniku (4.3), nastavljenim na 102 ± 2 °C, najmanj 30 minut. Pokrov postavite na tehtič in takoj prenesite v eksikator (4.2), pustite, da se ohladi na sobno temperaturo (tj. najmanj 30 minut) in stehtajte na 0,1 mg natančno.

6.2 **Odtehtani vzorec**

Takoj odtehtajte na 0,1 mg natančno 3 do 5 g pripravljenega vzorca za analizo (5.) v pripravljen tehtič (6.1).

6.3 **Določitev**

6.3.1 Opravite 30-minutno predsušenje tehtiča s segrevanjem na vreli vodni kopeli (4.5).

6.3.2 Segrevajte tehtič s pokrovom poleg njega dve uri v sušilniku (4.3), nastavljenem na 102 ± 2 °C. Tehtič pokrijte s pokrovom in ga odstranite iz sušilnika.

6.3.3 Pustite, da se v eksikatorju ohladi (4.2) na sobno temperaturo (tj. najmanj 30 minut), in stehtajte na 0,1 mg natančno.

6.3.4 Ponovno segrevajte tehtič s pokrovom poleg njega v sušilniku eno uro. Pokrijte tehtič s pokrovom in ga odstranite iz sušilnika. Približno 30 minut ohlajajte v eksikatorju in stehtajte na 0,1 mg natančno.

6.3.5 Ponovite postopke, opisane v točki 6.3.4, dokler razlika v masi med dvema zaporednima tehtanjema ne presega 0,5 mg. Zabeležite najnižjo maso.

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Izračun in formula**

Izračunajte vsebnost skupne suhe snovi kot masni delež iz:

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

pri čemer je

W_T = vsebnost skupne suhe snovi v g na 100 g,

m_0 = masa tehtiča s pokrovom v gramih (glej 6.1),

m_1 = masa tehtiča s pokrovom in odtehtanega vzorca v gramih (glej 6.2),

m_2 = masa tehtiča s pokrovom in posušenega odtehtanega vzorca v gramih (glej 6.3.5).

Vrednost zaokrožite na 0,01 % natančno (masni delež).

7.2 **Natančnost**

7.2.1 *Ponovljivost (r)*: 0,10 g skupne suhe snovi na 100 g proizvoda.

7.2.2 *Obnovljivost (R)*: 0,20 g skupne suhe snovi na 100 g proizvoda.

II. DOLOČITEV VSEBNOSTI MAŠČOBE

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek točno določa referenčno metodo za določitev vsebnosti maščobe v surovem mleku, polnomastnem mleku, delno posnetem mleku in posnetem mleku.

2. OPREDELITEV

Vsebnost maščobe v mleku: vse snovi, ki se določijo s točno določenim postopkom. Izražena je kot masni delež.

3. PRINCIP

Ekstrakcija amonijalkalne etanolne raztopine odtehtanega vzorca z dietiletrom in petroleterom, odstranitev topil z distilacijo ali uparevanjem in določitev mase ekstrahiranih snovi, topnih v petroletru. (Postopek je običajno poznan kot Röse-Gottliebova metoda).

4. REAGENTI

Vsi reagenti so analitske čistosti in pri slepem preskusu ne smejo pustiti znatnega ostanka.

Da se preveri kakovost reagentov, opravite določitev, kot je opisano v točki 6.3, Uporabite prazno bučko, čašo ali kovinsko posodo (5.8) za tehtanje, pripravljeno v skladu s točko 6.4 kot taro (da se omogoči popravek vplivov sprememb atmosferskih pogojev na rezultat tehtanja). Če je ostanek, korigiran glede na spremembo mase tare, večji od 2,5 mg, ločeno določite ostanek topil z uparevanjem 100 ml dietiletra (4.4) oziroma 100 ml petroletra (4.5). Uporabite tudi taro za tehtanje. Kadar je ostanek večji od 2,5 mg, topilo očistite z destilacijo ali pa ga zamenjate.

4.1 **Raztopina amoniaka**, ki vsebuje približno 25 % (m/m) NH3. Lahko se uporabi tudi bolj koncentrirana raztopina amoniaka (glej 6.5.1 in A.1.5.1).

4.2 **Etanol**, najmanj 94 % (v/v). Lahko se uporabi etanol, denaturiran z metanolom, pod pogojem, da to zanesljivo ne vpliva na rezultate določitve.

4.3 **Raztopina kongordečega ali krezolrdečega**

Raztopite 1 g kongordečega ali krezolrdečega v vodi in dopolnite do 100 ml.

Opomba: Uporaba te raztopine, ki omogoča, da je meja med plastjo topila in vodno plastjo bolje vidna, je neobvezna (glej 6.5.2). Lahko se uporabijo druge obarvane vodne raztopine, pod pogojem da ne vplivajo na rezultat določitve.

4.4 **Dietileter**, brez peroksidov, ki ne vsebuje več kot 2 mg antioksidantov/kg in ustreza zahtevam slepega preskusa (6.3).

4.5 **Petroleter** z območjem vrelišča med 30 in 60 °C.

4.6 **Mešano topilo**, pripravljeno tik pred uporabo z mešanjem enakih volumnov dietiletra (4.4) in petroletra (4.5).

5. OPREMA IN STEKLOVINA

Opozorilo: Ker določitev vključuje uporabo hlapnih vnetljivih topil, mora vsaka uporabljena električna oprema biti skladna z zakonodajo, ki se nanaša na uporabo takih topil.

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

5.1 **Analitska tehtnica**

5.2 **Centrifuga**, v kateri se lahko bučke ali tulci za ekstrakcijo maščobe (5.6) vrtijo z rotacijsko frekvenco 500 do 600 obratov na minuto in s tem tvorijo gravitacijsko polje 80 do 90 g na zunanji strani buč ali tulcev.

Opomba: Uporaba centrifuge je neobvezna (6.5.5).

5.3 **Naprava za destilacijo ali uparevanje**, ki omogoča, da topila in etanol destiliramo iz buč ali odparevamo iz čaš ali posod (oddelka 6.5.12 in 6.5.15) pri temperaturi, ki ne presega 100 °C.

5.4 **Sušilnik**, z električnim gretjem in popolnoma odprtimi režami za prezračevanje, ki ga je možno uravnavati na temperaturo 102 ± 2 °C po celotnem delovnem prostoru. Sušilnik mora biti opremljen z ustreznim termometrom.

5.5 **Vodna kopel**, ki jo lahko uravnamo na temperaturo 35 do 40 °C.

5.6 **Bučke za ekstrakcijo maščobe, vrsta Mojonnier**

Opomba: Možno je uporabljati tudi epruvete za ekstrakcijo maščobe s sesalno natego ali nastavki za izpiralno steklenico, toda postopek je potem drugačen in je podrobno opisan v dodatku.

Bučke (ali epruvete) so opremljene z zamaški iz brušenega stekla, kvalitetne plute ali drugega materiala, na katerega uporabljeni reagenti ne vplivajo. Plutovinaste zamaške je treba ekstrahirati z dietiletrom (4.4), namakati v vodi pri 60 °C ali več najmanj 15 minut in jih potem pustiti, da se ohladijo v vodi, tako da so ob uporabi nasičeni.

5.7 **Stojalo** za namestitev buč (ali epruvet) za ekstrakcijo maščobe (glej 5.6).

5.8 **Izpiralna steklenica**, primerna za uporabo z mešanim topilom (4.6). Plastična izpiralka se ne sme uporabljati.

5.9 **Posode za zbiranje maščobe**, na primer okrogle bučke (z ravnim dnom), erlenmajerice z volumnom 125-250 ml ali kovinske posode. Če uporabljamo kovinske posode, je zaželeno, da so iz nerjavečega jekla, imajo ravno dno, po možnosti z izlivom ter s premerom od 80 do 100 mm in višino približno 50 mm.

5.10 **Vrelni dodatki**, razmaščeni, iz neporoznega porcelana ali silicijevega karbida ali steklenih kroglic (neobvezno pri uporabi kovinskih posod).

5.11 **Merilni valji** z volumnom 5 in 25 ml.

5.12 **Pipete**, graduirane, z volumnom 10 ml.

5.13 **Klešče**, kovinske, primerne za držanje buč, čaš ali posod.

6. POSTOPEK

Opomba: Alternativni postopek z uporabo ekstrakcijskih epruvet s sesalno natego ali nastavki za izpiralko (glej opombo k 5.6) je opisan v dodatku.

6.1 **Priprava vzorca za analizo**

Laboratorijski vzorec segrevajte 15 minut pri približno 35-40 °C, če je potrebno na vodni kopeli. Temeljito, a previdno premešajte vzorec s ponavljajočim obračanjem stekleničke z vzorcem, ne da bi pri tem povzročili penjenje ali pinjenje ter hitro ohladite na približno 20 °C.

6.2 **Odtehtani vzorec**

Vzorec za analizo (6.1) zmešajte tako, da trikrat do štirikrat previdno obrnete stekleničko, nato takoj odtehtajte 10 do 11 g vzorca za analizo na 1 mg natančno, neposredno ali z razliko, v eno od ekstrakcijskih buč (5.6).

Odtehtani vzorec je treba kar se da v celoti prenesti v spodnjo (manjšo) bučko ekstrakcijske bučke.

6.3 **Slepi preskus**

Hkrati z določitvijo izvedite slepi preskus z uporabo istega postopka in istih reagentov, le da odtehtani vzorec za analizo nadomestite z 10 do 11 ml vode.

Sprememba prave mase posode za zbiranje maščobe, korigirana z vidno spremembo mase kontrolne posode, ne sme biti večja od 2,5 mg.

6.4 **Priprava posode za zbiranje maščobe**

Posušite posodo (5.9) skupaj z nekaj vrelnimi dodatki (5.10), da se pospeši rahlo vrenje med nadaljnjim odstranjevanjem topila v sušilniku (5.4). Pustite, da se posoda ohladi (ne v eksikatorju, vendar zaščiteno pred prahom) na temperaturo prostora za tehtanje (za steklene posode najmanj eno uro, za kovinske posode najmanj 30 minut). S pomočjo klešč postavite posodo na tehtnico in jo stehtajte na 0,1 mg natančno, pri čemer pazite, da ne pride do sprememb temperature.

6.5 **Določitev**

6.5.1 Dodajte 2 ml raztopine amoniaka (4.1) ali enakovreden volumen bolj koncentrirane raztopine amoniaka in temeljito zmešajte z odtehtanim vzorcem v manjši bučki bučke. Po dodatku amoniaka nemudoma izvedite določitev.

6.5.2 Dodajte 10 ml etanola (4.2) in zmešajte previdno, a temeljito, tako da vsebino bučke pretakate naprej in nazaj med dvema bučkama; pazite, da ne bi tekočina prišla preblizu vratu bučke. Če želite, dodajte dve kapljici raztopine kongordečega ali krezolrdečega (4.3).

6.5.3 Dodajte 25 ml dietiletra (4.4), zamašite bučko s plutovinastim zamaškom, nasičeno z vodo, ali z zamaškom, omočenim z vodo (glej 5.6). Eno minuto močno stresajte bučko, (a ne pretirano da ne pride do tvorbe trdovratne emulzije) tako, da držite bučko v vodoravni legi, mala bučka pa gleda navzgor. Od časa do časa pustite, da se tekočina iz velike bučke pretoči v manjšo bučko. Če je potrebno, ohladite bučko pod tekočo vodo, potem previdno odstranite pluto ali zamašek in z izpiralko (5.8) sperite zamašek in vrat bučke z malo mešanega topila (4.6) tako, da sprana tekočina teče v bučko.

6.5.4 Dodajte 25 ml petroletra (4.5), zamašite bučko s ponovno omočeno pluto ali zamaškom (ponovno omočenim z namakanjem v vodi) in nežno stresajte bučko 30 sekund, kot je opisano v točki 6.5.3.

6.5.5 Centrifugirajte zaprto bučko eno do pet minut pri rotacijski frekvenci 500 do 600 obratov na minuto (5.2). Če centrifuge ni na voljo (glej opombo k 5.2), pustite zaprto bučko na stojalu (5.7) najmanj 30 minut, dokler ni plast supernatanta čista in razločno ločena od vodne plasti. Če je potrebno, ohladite bučko pod tekočo vodo.

6.5.6 Previdno odstranite pluto ali zamašek in sperite zamašek in notranjost vratu bučke z malo mešanega topila (4.6) tako, da sprana tekočina teče v bučko.

Če je mejna ploskev pod vznožjem vratu bučke, jo rahlo dvignite nad to raven s previdnim dodajanjem vode ob steni bučke, za olajšanje dekantiranja topila.

6.5.7 Držeč bučko za ekstrakcijo za manjšo bučko, previdno oddekantirajte, kolikor je mogoče, plast supernatanta v pripravljeno posodo za zbiranje maščobe (6.4), ki vsebuje nekaj vrelnih dodatkov (5.10). V primeru uporabe buč (neobvezno pri kovinskih posodah) se izogibajte oddekantiranju vodne plasti.

6.5.8 Sperite zunanjost vratu ekstrakcijske bučke z malo mešanega topila (4.6), tako da zberete sprano tekočino v posodi za zbiranje maščobe in pazite, da se mešano topilo ne razlije po zunanjosti ekstrakcijske bučke.

Če želite, lahko topilo ali del topila odstranite iz posode z destilacijo ali odparevanjem, kot je opisano v točki 6.5.12.

6.5.9 K vsebini v ekstrakcijski bučki dodajte 5 ml etanola (4.2), pri čemer uporabite etanol, zato da sperete notranjost vratu bučke, in premešajte kot je opisano v točki 6.5.2.

6.5.10 Izvedite drugo ekstrakcijo s ponavljanjem postopkov, opisanih v točkah 6.5.3 do 6.5.8, a z uporabo samo 15 ml dietiletra (4.4) in 15 ml petroletra (4.5); uporabite eter, da sperete notranjost vratu ekstrakcijske bučke. Če je potrebno, dvignite mejno ploskev do sredine trupa bučke, da tako omogočite kar najbolj popolno končno oddekantiranje topila.

6.5.11 Izvedite tretjo ekstrakcijo z nadaljnjim ponavljanjem postopkov, opisanih v točkah 6.5.3 do 6.5.8, a z uporabo samo 15 ml dietiletra (4.4) in 15 ml petroletra (4.5); uporabite eter, da sperete notranjost vratu ekstrakcijske bučke. Če je potrebno, dvignite mejno ploskev do sredine vratu bučke, da tako omogočite kar najbolj popolno končno oddekantiranje topila.

Tretjo ekstrakcijo lahko pri posnetem mleku izpustimo.

6.5.12 Čim bolj popolno odstranite topila (vključno z etanolom) iz bučke z destilacijo ali iz čaše ali posode z odparevanjem (5.3). Pred začetkom destilacije sperite notranjost vratu bučke z malo mešanega topila (4.6).

6.5.13 Segrevajte posodo za zbiranje maščobe v sušilniku (5.4) (z bučko postavljeno na stran, da lahko uhajajo pare topila) eno uro. Odstranite posodo za zbiranje maščobe iz sušilnika, pustite, da se ohladi (ne v eksikatorju, ampak zaščiteno pred prahom) na temperaturo tehtalnega prostora (za steklene posode najmanj eno uro, za kovinske posode najmanj 30 minut) in stehtajte na 0,1 mg natančno.

Ne brišite posode tik pred tehtanjem. Postavite posodo na tehtnico s pomočjo klešč in se zlasti izogibajte temperaturnim spremembam.

6.5.14 Ponavljajte postopke, opisane v točki 6.5.13, dokler se masa posode za zbiranje maščobe med dvema zaporednima tehtanjema ne poveča ali zmanjša za 0,5 mg ali manj. Zabeležite najmanjšo izmerjeno maso kot maso posode za zbiranje maščobe in ekstrahirane snovi.

6.5.15 V posodo za zbiranje maščobe dodajte 25 ml petroletra, da tako preverite, ali je ekstrahirana snov v celoti topna ali ne. Rahlo segrejte in vrtinčite topilo, dokler se vsa maščoba ne raztopi.

Če je ekstrahirana snov popolnoma topna v petroletru, vzemite za maso maščobe razliko med končno maso posode, ki vsebuje ekstrahirano snov (6.5.14), in njeno začetno maso (6.4).

6.5.16 6.5.16. Če ekstrahirana snov ni popolnoma topna v petroletru, ali v primeru dvoma, ekstrahirajte maščobo iz posode popolnoma tako, da ponavljate spiranje z petroletrom.

Pustite, da se kakršna koli netopna snov usede in pazljivo oddekantirajte petroleter, ne da bi pri tem odstranili netopno snov. Ponovite ta postopek še trikrat in pri tem uporabite petroleter za spiranje notranjosti vratu posode.

Na koncu sperite zunanjost zgornjega dela posode z mešanim topilom tako, da se topilo ne razlije po zunanjosti posode. Z enournim segrevanjem v sušilniku odstranite iz posode pare petroletra, ohladite in stehtajte, kot je opisano v točkah 6.5.13 in 6.5.14.

Razliko med maso, določeno v točki 6.5.14, in to končno maso vzemite kot maso maščobe.

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 **Izračun in formula**

Izračunajte vsebnost maščobe kot masni delež:

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

pri čemer je

F = vsebnost maščobe,

m_0 = masa odtehtanega vzorca v gramih (6.2),

m_1 = masa posode za zbiranje maščobe in ekstrahirane snovi v gramih, določena v skladu s točko 6.5.14,

m_2 = masa pripravljene posode za zbiranje maščobe ali, v primeru netopnih snovi, posode za zbiranje maščobe in netopnega ostanka v gramih, določenega v točki 6.5.16,

m_3 = masa posode za zbiranje maščobe, uporabljene v slepem preskusu (6.3), in kakršne koli ekstrahirane snovi v gramih, določene v točki 6.5.14,

m_4 = masa pripravljene posode za zbiranje maščobe (glej 6.4), uporabljene v slepem preskusu (6.3) ali, v primeru netopnih snovi, posode za zbiranje maščobe in netopnega ostanka v gramih, določenega v točki 6.5.16.

Rezultat se poda na 0,01 % natančno.

7.2 **7.2. Natančnost**

7.2.1 *Ponovljivost (r)*:

— za polno mleko in delno posneto mleko: 0,02 g maščobe na 100 g proizvoda,

— za posneto mleko: 0,01 g maščobe na 100 g proizvoda.

7.2.2 *Obnovljivost (R)*:

— za polno mleko: 0,04 g maščobe na 100 g proizvoda,

— za delno posneto mleko: 0,03 g maščobe na 100 g proizvoda,

— za posneto mleko: 0,025 g maščobe na 100 g proizvoda.

III. DOLOČITEV SKUPNE SUHE SNOVI BREZ MAŠČOBE

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek točno določa referenčno metodo za določanje vsebnosti skupne suhe snovi brez maščobe v toplotno obdelanem mleku.

2. OPREDELITEV IN IZRAČUN

Vsebnost skupne suhe snovi brez maščobe je treba izraziti kot masni delež.

Vsebnost skupne suhe snovi brez maščobe je:

Vsebnost skupne suhe snovi (glej poglavje I) minus vsebnost maščobe (glej poglavje II).

IV. DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNEGA DUŠIKA

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek določa referenčno metodo za določanje vsebnosti skupnega dušika v surovem mleku, polnomastnem mleku, delno posnetem mleku in posnetem mleku.

2. OPREDELITEV

Vsebnost skupnega dušika v mleku: vsebnost dušika, izražena kot masni delež, kot ga določimo s točno opisano Kjeldahlovo metodo.

3. PRINCIP

Odtehtano količino vzorca mleka razkrojimo s koncentrirano žveplovo(VI) kislino in kalijevim sulfatom ter bakrovim(II) sulfatom kot katalizatorjem, da se tako pretvori dušik iz organskih spojin v amonijev sulfat. Amoniak sprostimo z dodajanjem raztopine natrijevega hidroksida, ga nato destiliramo in uvajamo v raztopino borove kisline. To titriramo z raztopino kisline.

4. REAGENTI

4.1 **Kalijev sulfat** (K2SO4).

4.2 **Raztopina bakrovega sulfata**. Raztopite 5,0 g bakrovega(II) sulfata pentahidrata ($CuSO_4$, $5H_2O$) v vodi in v merilni bučki dopolnite do 100 ml (pri 20 °C).

4.3 **Žveplova(VI) kislina**, najmanj 98,0 % (m/m) H_2SO_4.

4.4 **Raztopina natrijevega hidroksida**, 47 % (m/m) 704 g NaOH/L (20 °C).

Opomba: Lahko se uporabi manj koncentrirana raztopina natrijevega hidroksida, na primer: 40 % (m/m) 572 g/L, 20 °C; ali 30 % (m/m) 399 g/L, 20 °C.

4.5 **Raztopina borove kisline**. Raztopite 40 g borove kisline (H3BO3) v litru vroče vode, ohladite in shranite v steklenici iz borosilikatnega stekla.

4.6 **Raztopina indikatorja**. Raztopite 0,01 g metilrdečega, 0,02 g bromtimolmodrega in 0,06 g bromkrezolzelenega v 100 ml etanola. Raztopino hranite v zaprti rjavi steklenici v hladnem in temnem prostoru.

4.7 **Volumetrična raztopina**

c (1/2 H_2SO_4) ali c (HCl) = 0,1 mol/L standardizirana na 0,0001 mol/L natančno.

4.8 **Saharoza brez dušika**.

4.9 **Amonijeva sol**, čista, kot je amonijev oksalat $(NH_4)2C_2O_4$, H_2O ali amonijev sulfat $(NH_4)2SO_4$.

4.10 **Triptofan** ($C_{11}H_{12}N_2O_2$), **fenacetin** ($C_{10}H_7CH_2CONH_2$) ali lizin mono- ali di-hidroklorid ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ ali $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$).

Opomba: Čistost reagentov v točkah 4.9. in 4.10. bi morala biti višje stopnje kot je „analitska čistost“. Če je na voljo, je treba uporabiti certificirano raztopino amonijeve soli (4.9).

5. OPREMA IN STEKLOVINA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

5.1 **Kjeldahlove bučke** z volumnom 500 ml.

5.2 **Primerni vrelni dodatki**, na primer, steklene kroglice s premerom približno 5 mm, Hengarjeve granule, plovec.

5.3 **Bireta ali avtomatska pipeta za doziranje** 1,0 ml.

5.4 **Graduirani merilni valji**, stekleni, z volumni 50, 100 in 250 ml.

5.5 **Naprava za razkroj** v nagnjenem položaju (približno 45°), z električnimi grelci ali plinskimi gorilniki, ki ne segrevajo bučk nad nivojem njihove vsebine, s sistemom za odstranjevanje hlapov.

5.6 **Naprava za destilacijo**, narejena iz borosilikatnega stekla, na katero lahko priključimo Kjeldahlovo bučko (5.1), ki jo sestavlja efektivna brizgalna glava, povezana z učinkovitim hladilnikom z ravno notranjo cevjo in zunanjo cevjo, ki je pritrjena na njen spodnji del; vezne cevi in zamašek(-i) morajo biti prilegajoči in po možnosti iz neoprenske gume.

5.7 **Pipeta ali avtomatska pipeta** za doziranje 0,10 ml.

5.8 **Erlenmajerice** z volumnom 500 ml, graduirane pri 200 ml.

5.9 **Bireta** z volumnom 50 ml, graduirana na 0,1 ml, maksimalna napaka ± 0,05 ml.

5.10 **Povečevalna leča** za odčitavanje birete (5.9).

5.11 **pH meter**

5.12 **Avtomatska bireta**.

6. POSTOPEK

6.1 V Kjeldahlovo bučko (5.1) dodajte vrelne dodatke (5.2) (npr. tri steklene kroglice), 15 g kalijevega sulfata (4.1), 1,0 ml raztopine bakrovega sulfata (4.2), približno 5 g vzorca mleka (stehtanega na 0,001 g natančno) in 25 ml žveplove(VI) kisline (4.3). S kislino sperite kakršne koli ostanke bakrovega sulfata, kalijevega sulfata ali mleka na vratu bučke in previdno premešajte vsebino bučke.

Opomba: Ker organska snov med vrenjem porablja žveplovo kislino, v primeru, da mleko vsebuje več kot 5,0 % (m/m) maščobe, za razkroj uporabite 30 ml H2SO4 (4.3) namesto 25 ml. Enako je treba narediti pri slepem preskusu.

6.2 Segrejte vsako Kjeldahlovo bučko na napravi za razkroj (5.5), sprva zelo nežno, da vsa črna pena ostane v trebušastem delu bučke. Ko začetno penjenje poneha in se pojavijo obilne bele pare, močno segrevajte (hlapi kisline bodo kondenzirali na polovici vratu bučke), dokler črni delci ne izginejo in dokler tekočina po razkroju ne postane bistra blede modro-zelene barve. Nato previdno vrite najmanj 1,5 ure. Upoštevajte naslednje zahteve:

(a) Čas, v katerem izvleček postane bister, ne sme biti daljši od ene ure, skupni čas za razkroj pa ne sme biti daljši od 2,5 ur. Če je za zbistritev potrebna več kot ena ura, se ustrezno podaljša tudi skupni čas za razkroj.

(b) Dodani kalijev sulfat pospešuje razkroj, ker dvigne temperaturo vrelišča zmesi. Če je volumen ostanka H_2SO_4 na koncu razkroja manjši od približno 15 ml, je lahko prišlo do izgub dušika zaradi pretiranega segrevanja. V primeru segrevanja s plinom segrevajte bučko na plošči iz toplotno izolacijskega materiala, ki ima na sredini luknjo takega premera, da se prosti plamen samo dotika dela bučke, ki je pod gladino tekočine v njej (5.5).

(c) Če črni delci pridejo v vrat bučke in se ne sperejo v trebušasti del z refluksom kisline v začetnih stopnjah intenzivnega vretja (to lahko olajšamo z vrtenjem bučke), pustite bučko, da se primerno ohladi in previdno sperite z minimalno količino vode. Nato nadaljujte z razkrojem, kot je opisano zgoraj.

6.3 Ko so Kjeldahlove bučke hladne, v vsako dodajte 300 ml vode (glej opombo), tako da previdno sperete vrat bučke, in temeljito premešajte vsebino, da se izločeni kristali raztopijo. Dodajte nekaj vrelnih dodatkov (5.2), da zagotovite enakomerno vrenje. Nato v vsako bučko dodajte 70 ml raztopine natrijevega hidroksida (4.4) (glej opombo) tako, da raztopino nežno zlijete vzdolž nagnjenega vratu bučke, da nastane spodnja plast v trebušastem delu; ne omočite vrha vratu bučke z raztopino natrijevega hidroksida.

Opomba: Združeni volumen vode in raztopine natrijevega hidroksida mora biti 370 ml, da se na ta način lahko zbere približno 150 ml destilata, tik preden nastopi nepravilno vrenje („butanje“) (6.4). Torej če dodamo večji ekvivalentni volumen raztopine natrijevega hidroksida, ki je manj koncentrirana kot 47 % (m/m), moramo volumen dodane vode ustrezno zmanjšati. Na primer, če se doda 85 ml 40 % (m/m) ali 125 ml 30 % (m/m) raztopine natrijevega hidroksida, je volumen dodane vode 285 ml oziroma 245 ml.

6.4 Takoj priključite Kjeldahlovo bučko k napravi za destilacijo (5.6). Prepričajte se, da je konec izhodne cevi hladilnika potopljen v 50 ml raztopine borove kisline (4.5) ki vsebuje 0,20 ml (5 do 6 kapljic) raztopine indikatorja (4.6) kar se nahaja v erlenmajerici (5.8). Zavrtite vsebino vsake Kjeldahlove bučke, da temeljito premešate vsebino, vendar sprva nežno, da preprečite pretirano penjenje. Ko zberete 100 do 125 ml destilata, spustite vsako erlenmajerico navzdol toliko, da je konec izhodne cevi hladilnika približno 40 mm nad oznako 200 ml. Nadaljujte z destilacijo do začetka nepravilnega vrenja („butanja“) in nato takoj ustavite segrevanje. Odklopite vsako Kjeldahlovo bučko in sperite konec izhodne cevi vsakega hladilnika z malo vode, pri čemer zbirajte sprano tekočino v erlenmajerici. Upoštevajte naslednje zahteve:

(a) Hitrost destilacije mora biti takšna, da se zbere približno 150 ml destilata, preden pride do nepravilnega vrenja („butanja“), volumen vsebine vsake erlenmajerice bo potem približno 200 ml.

(b) Učinkovitost vsakega hladilnika mora biti takšna, da temperatura vsebine v vsaki erlenmajerici med destilacijo ne preseže 25 °C.

6.5 Vsak destilat titrirajte s standardno volumetrično raztopino (4.7) do pH vrednosti 4,6 ± 0,1 z uporabo pH metra in, če želite, avtomatske birete. Dodatek indikatorja pomaga pri preverjanju pravilnega poteka titracije. Odčitajte porabo na bireti na 0,01 ml natančno (5.10) s pomočjo povečevalne leče (5.10), izogibajte se napakam zaradi paralakse.

Titracijo lahko izvedemo samo z indikatorjem. Titrirajte, dokler barva destilata ne ustreza barvi raztopine, ki je bila pred kratkim pripravljena iz 150 ml vode z dodatkom 50 ml raztopine borove kisline in 0,20 ml indikatorja v erlenmajerici (5.8).

6.6 Opravite slepi preskus v skladu s točkami 6.1 do 6.5, namesto vzorca mleka vodite skozi postopek 5 ml destilirane vode skupaj z približno 0,1 g saharoze (4.8).

Opomba: Pri titraciji slepega destilata bo poraba standardne volumetrične raztopine zelo majhna (4.7).

6.7 Redno preverjajte točnost postopka z dvema preskusoma izkoristka v skladu s postopkom iz točk 6.1 do 6.5.

6.7.1 Prepričajte se, da med destilacijo ne prihaja do izgub dušika zaradi pregrevanja ali mehanskih razpok, tako da kot odtehtani vzorec uporabite 0,15 g amonijevega oksalata ali sulfata (4.9), stehtanega na 0,001 g natančno, skupaj z 0,1 g saharoze.

Delež ugotovljenega dušika, izražen v odstotkih, je med 99,0 in 100,0 %.

Nižji ali višji rezultati nakazujejo pomanjkljivosti v postopku in/ali netočno koncentracijo standardne raztopine (4.7).

6.7.2 Preverite, da je postopek razkroja zadosten za sprostitev vsega dušika v beljakovinah, z uporabo odtehtanega vzorca 0,20 g čistega triptofana, 0,35 g fenacetina ali 0,20 g lizina hidroklorida (4.10). Vsa tehtanja morajo biti na 0,001 g natančno. Izkoristek dušika bi moral biti najmanj 98-99 %.

7. VARNOSTNI UKREPI

Pri delu s koncentrirano žveplovo(VI) kislino in natrijevim hidroksidom ter pri rokovanju s Kjeldahlovimi bučkami vedno nosite zaščitno haljo, zaščitna očala in kislinsko odporne rokavice.

Med destilacijo nikoli ne puščajte Kjeldahlovih bučk brez nadzora. Zaradi možnih nevarnosti takoj ustavite destilacijo, če vsebina premočno „buta“. Če pride do izpada električne energije za več kot dve do tri minute, znižajte zbiralno bučko tako, da je konec destilacijske cevke izven tekočine.

8. PODAJANJE REZULTATOV

8.1 **Izračun in formula:**

Izračunajte vsebnost dušika (WN), izraženo v g na 100 g proizvoda z:

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

pri čemer je

W_N = vsebnost dušika.

V = volumen standardne volumetrične raztopine kisline, uporabljene pri določitvi v mililitrih.

V_O = volumen standardne volumetrične raztopine kisline, uporabljene pri slepem preskusu v mililitrih.

c = koncentracija standardne volumetrične raztopine kisline (4.7.) v molih na liter.

m = masa odtehtanega vzorca v gramih.

Zaokrožite rezultat na 0,001 g na 100 g.

8.2 **Natančnost**

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

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

9. RAZLIČICE POSTOPKA

9.1 Namesto naprave za razkroj in Kjeldahlovih bučk, opisanih v točkah 5.5 in 5.1, uporabite blok za razkroj, opremljen z epruvetami. V tem primeru je za identifikacijo potencialnih težav treba vsako mesto preveriti posebej (6.7).

9.2 Uporaba destilacije z vodno paro namesto neposrednega gretja bučk (6.4). Če aparat ne dopušča uporabe destilirane vode, je treba paziti, da voda ne vsebuje hlapnih kislin ali baz.

9.3 Namesto 5 g (6.1) se lahko kot odtehtani vzorec uporabi 1 g mleka (semi-makro Kjeldahl) pod pogojem, da:

— se količine reagentov za mineralizacijo (6.1): H2SO4, CuSO4 !!! error character !!! B· 5 H2O, K2SO4 zmanjšajo za enak delež (1/5);

— se skupni čas razkroja (6.2) zmanjša na 75 minut;

— se količina raztopine natrijevega hidroksida (6.3) zmanjša za enak delež (1/5);

— se uporabi standardna raztopina kisline (4.7) z nižjo koncentracijo (0,02 to 0,03 mol/L).

Opomba: Uporaba ene ali več teh možnosti je sprejemljiva samo, če so vrednost ponovljivosti (8.2.1) in rezultata obeh preskusov točnosti (6.7) v skladu z zahtevami, navedenimi v tej metodi.

V. DOLOČANJE VSEBNOSTI BELJAKOVIN

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek točno določa referenčno metodo za določanje vsebnosti beljakovin v toplotno obdelanem mleku (člen 3(A)(3) v Direktivi 85/397/EGS).

2. OPREDELITEV

Vsebnost beljakovin: Vrednost, dobljena z množenjem vsebnosti skupnega dušika, izraženega kot masni delež in določenega v skladu z metodo iz poglavja IV(3), z ustreznim faktorjem (3.).

3. IZRAČUN

Vsebnost beljakovin v mleku kot masni delež = 6,38 x % vsebnost skupnega N v mleku.

VI. DOLOČANJE SPECIFIČNE MASE

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Ta postopek točno določa referenčno metodo za določanje specifične mase pri 20 °C surovega mleka, polnomastnega mleka, delno posnetega mleka in posnetega mleka.

2. OPREDELITEV

Specifična masa mleka je razmerje mase določenega volumna mleka pri 20 °C in mase enakega volumna vode pri 20 °C.

3. PRINCIP

Specifično maso pri 20 °C določimo z aerometrom.

4. OPREMA IN STEKLOVINA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

4.1 **Aerometer**

Aerometer za določanje specifične mase je naprava, ki ga sestavlja steklen plovec, na spodnjem delu, ki je širok in težak. Na zgornji konec plovca je pritrjena okrogla steklena palica, ki je koaksialno nameščena na plovec; zgornji konec palice je zaprt.

Stekleni plovec vsebuje utež (svinec, živo srebro itd.), ki je namenjeno izravnavi mase aerometra. Na palici je graduirana skala od 1,025 do 1,035 g/ml.

Aerometer bi bilo treba preverjati s piknometrično metodo z uporabo piknometra z volumnom približno 100 ml opremljenim z natančnim termometrom.

4.2 **Valji** (stekleni ali iz nerjavečega jekla).

Minimalne dimenzije bi morale biti:

— notranji premer približno 35 mm

— notranja višina približno 225 mm.

4.3 **Vodna kopel,** naravnana na 20 ± 0,1 °C.

4.4 **Vodna kopel,** naravnana na 40 ± 2 °C.

4.5 **Termometer**, graduiran na 0,5 °C.

5. POSTOPEK

5.1 Premešajte vzorec z obračanjem, da razpršite maščobo, ter ga postavite v vodno kopel (4.4.). Pustite, da vzorec doseže temperaturo 40 °C, in ga pustite pri tej temperaturi pet minut. Temeljito premešajte s previdnim obračanjem, da zagotovite homogeno porazdelitev maščobe. Ohladite na 20 °C v drugi vodni kopeli (4.3).

5.2 Temeljito premešajte vzorec s previdnim obračanjem, da ne pride do vključitve zraka. Mleko nalijte v valj (4.2), ki ga držite postrani,da se tako izognete tvorbi pene ali mehurčkov. Uporabite dovolj velik vzorec mleka, tako da ga bo pri vstavitvi aerometra (4.1) v valj nekaj steklo preko robu. Previdno spustite aerometer v mleko in pustite, da prosto plava, ko doseže uravnoteženi položaj. Valj mora stati navpično. Aerometer mora biti v sredini stolpa tekočine in se ne sme dotikati sten valja.

5.3 Ko aerometer doseže ravnotežje, odčitajte oznako na zgornjem meniskusu.

5.4 Takoj potem, ko ste odčitali aerometer, dajte v vzorec termometer (4.5) in odčitajte temperaturo na 0,5 °C natančno. Temperatura se od 20 °C ne sme razlikovati za več kot ± 2 °C.

6. POPRAVEK TEMPERATURE

6.1 Če temperatura vzorca mleka v času merjenja specifične mase ni točno 20 °C, je treba dobljeni rezultat popraviti s prištevanjem k izmerjeni specifični masi 0,0002 za vsako stopinjo Celzija nad 20 °C ali odštevanjem 0,0002 za vsako stopinjo Celzija pod 20 °C. Ta popravek je veljaven samo, če se temperatura vzorca mleka od 20 °C ne razlikuje za več kot 5 °C.

7. PODAJANJE REZULTATOV

Metoda izračuna in formula: specifična masa vzorca je izražena v g/ml posnetega mleka pri 20 °C v skladu z naslednjo formulo:

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

pri čemer je

mv = specifična masa vzorca, odčitana na aerometru (5.4) v g/L

MG = vsebnost maščobe v vzorcu v g/L

0,92 = gostota maščobe.

8. NATANČNOST

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

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

Dodatek

(k Prilogi II)

ALTERNATIVNI POSTOPEK Z UPORABO EPRUVET ZA EKSTRAKCIJO MAŠČOBE S SESALNO NATEGO ALI PRIKLJUČKI ZA IZPIRALKO

A.1 POSTOPEK

A.1.1 Priprava vzorca za analizo

Glej 6.1.

A.1.2 Odtehtani vzorec

Ravnajte, kot je določeno v 6.2, vendar z uporabo epruvet za ekstrakcijo maščobe (glej 5.6).

Odtehtani vzorec se čim popolneje prenese na dno ekstrakcijske epruvete.

A.1.3 Slepi preskus

Glej 6.3.

A.1.4 Priprava posode za zbiranje maščobe

Glej 6.4.

A.1.5 Določitev

A.1.5.1 Dodajte 2 ml raztopine amoniaka (4.1) ali ekvivalenten volumen bolj koncentrirane raztopine amoniaka in temeljito premešajte s predhodno obdelanim odtehtanim vzorcem na dnu epruvete. Po dodatku amoniaka nemudoma izvedite določitev.

A.1.5.2 Dodajte 10 ml etanola (4.2) in nežno vendar temeljito premešajte na dnu epruvete. *Če želite*, dodajte dve kapljici raztopine kongordečega ali krezolrdečega (4.3).

A.1.5.3 Dodajte 25 ml dietiletra (4.4), zamašite epruveto s plutovinastim zamaškom, nasičenim z vodo, ali zamaškom, omočenim z vodo (5.6), in s ponavljajočim obračanjem epruveto močno stresajte, (a ne pretirano, da bi se izognil tvorbi trdovratnih emulzij) eno minuto. Če je potrebno, ohladite epruveto pod tekočo vodo, nato previdno odstranite pluto ali zamašek ter ju skupaj z vratom epruvete s pomočjo izpiralke splaknite z malo mešanega topila (4.6), tako da sprana tekočina teče v epruveto.

A.1.5.4 Dodajte 25 ml petroletra (4.5), zaprite epruveto s ponovno omočeno pluto ali zamaškom (ponovno omočenim z namakanjem v vodo), in 30 sekund nežno stresajte epruveto, kakor je opisano v točki A.1.5.3.

A.1.5.5 Centrifugirajte zaprto epruveto od ene do pet minut z rotacijsko frekvenco 500 do 600 obratov na minuto (5.2). Če centrifuge ni na voljo (glej opombo k 5.2), pustite zaprto epruveto stati v stojalu (5.7) najmanj 30 minut, dokler ni plast supernatanta bistra in vidno ločena od vodne plasti. Če je potrebno, ohladite epruveto pod tekočo vodo.

A.1.5.6 Previdno odstranite pluto ali zamašek ter ju skupaj z vratom epruvete splaknite z malo mešanega topila, tako da sprana tekočina teče v epruveto.

A.1.5.7 V epruveto vstavite priključek za sesalno nategо ali priključek za izpiralko in potisnite dolgi notranji krak navzdol, dokler ni vhodna odprtina približno 3 mm nad mejno ploskvijo obeh plasti. Notranji krak priključka je vzporedno z osjo ekstrakcijske epruvete.

Previdno prenesite plast supernatanta iz epruvete v pripravljeno posodo za zbiranje maščobe (6.4), ki v primeru buč (neobvezno pri kovinskih posodah) vsebuje nekaj vrelnih dodatkov (5.10) pri čemer se izogibajte prenosu kakršne koli vodne plasti. Sperite izhodno odprtino priključka z malo mešanega topila tako, da sprana tekočina teče v posodo za zbiranje maščobe.

A.1.5.8 Zrahljajte nastavek z vratu epruvete, ga rahlo dvignite in sperite spodnji del njegovega dolgega notranjega kraka z malo mešanega topila. Nastavek spustite in ga ponovno namestite, sprano tekočino pa prenesite v posodo za zbiranje maščobe.

Sperite izhodno odprtino priključka z malo mešanega topila, tako da sprana tekočina teče v posodo. Če želite, lahko topilo ali del topila odstranite iz posode z destilacijo ali odparevanjem, kakor je opisano v 6.5.12.

A.1.5.9 Ponovno Zrahljajte nastavek z vratu, ga rahlo dvignite in dodajte vsebini epruvete 5 ml etanola, pri čemer uporabite etanol, zato da sperete dolgi notranji krak nastavka; premešajte, kakor je opisano v A.1.5.2.

A.1.5.10 Izvedite *drugo ekstrakcijo* s ponavljanjem postopkov, opisanih v točkah A.1.5.3 do A.1.5.8, vendar z uporabo samo 15 ml dietiletra (4.4) in 15 ml petroletra (4.5). Uporabite eter, da sperete dolgi notranji krak nastavka med odstranjevanjem tega iz epruvete po predhodni ekstrakciji.

A.1.5.11 Izvedite *tretjo ekstrakcijo*, tako da znova ponovite postopke, opisane v točkah A.1.5.3 do A.1.5.8, z uporabo 15 ml dietiletra in 15 ml petroletra in s spiranjem dolgega notranjega kraka nastavka, kakor je opisano v A.15.10.

Pri posnetem mleku lahko tretjo ekstrakcijo opustimo.

A.1.5.12 Ravnajte, kakor je opisano v 6.5.12 do 6.5.16.