

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

1723

Na temelju članka 94. stavka 2. Zakona o hrani (»Narodne novine« br. 46/07, 155/08), ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

PRAVILNIK

O METODAMA UZORKOVANJA I ANALIZA JESTIVIH KAZEINA I KAZEINATA^[1]

I. OPĆE ODREDBE

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom propisuju metode uzorkovanja te metode analiza jestivih kazeina i kazeinata.

Članak 2.

Metode uzorkovanja jestivih kazeina i kazeinata iz Pravilnika o jestivim kazeinima i kazeinatima (»Narodne novine« br. 80/07)^[2] propisane su u Prilogu 1. ovoga Pravilnika.

Članak 3.

Metode analiza jestivih kazeina i kazeinata propisane su u Prilogu 2. ovoga Pravilnika.

II. ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 4.

Prilozi 1. i 2. tiskani su uz ovaj Pravilnik i njegov su sastavni dio.

Članak 5.

Danom stupanja na snagu ovoga Pravilnika prestaju važiti odredbe Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka te kemijskih i fizikalnih analiza bjelančevinastih proizvoda za prehrambenu industriju (»Narodne novine« br. 53/91, 158/03).

Članak 6.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objave u »Narodnim novinama«.

Klasa:
Urbroj:
Zagreb, 15. lipnja 2009.

011-02/09-01/85
525-13-2-0495/09-16

Ministar
**mr. sc. Božidar
Pankreć, v. r.**

PRILOG 1.

METODE UZORKOVANJA ZA KEMIJSKE ANALIZE JESTIVIH KAZEINA I KAZEINATA NAMIJENJENIH ZA KONZUMACIJU

I. OPĆE ODREDBE

1. Osoblje

Uzorkovanje provodi ovlaštena kvalificirana osoba, sukladno posebnim propisima.

2. Pečaćenje i označavanje uzoraka

Svaki uzorak, uzet za službenu uporabu, mora se zapečatiti na mjestu uzimanja i označiti sukladno posebnim propisima.

3. Broj uzoraka

Za analizu je potrebno istovremeno pripremiti najmanje dva jednaka reprezentativna uzorka. Postupak i broj uzetih uzoraka propisan je posebnim propisima.

Uzorci se nakon uzorkovanja moraju što je moguće prije otpremiti u laboratorij.

4. Zapisnik

Uz uzorke se prilaže zapisnik sukladno posebnim propisima.

5. Oprema za uzorkovanje

Sva oprema za uzorkovanje mora biti izrađena od odgovarajućeg materijala prikladne čvrstoće, koji ne uzrokuje promjene uzorka koje bi mogle utjecati na rezultate ispitivanja, i ne smije uzrokovati promjene uzoraka tijekom uzorkovanja. Preporuča se upotreba nehrđajućeg čelika.

Sve površine moraju biti glatke i bez pukotina, a svi rubovi zaobljeni. Oprema za uzorkovanje mora udovoljavati zahtjevima propisanim za svaki proizvod koji se uzorkuje.

6. Posude za uzorkovanje

Posude i poklopci za uzorke moraju biti izrađeni od materijala i takve konstrukcije da primjereno štite uzorak i u njemu ne uzrokuju promjene koje bi mogle utjecati na rezultate

analiza i ispitivanja. Prikladni materijali uključuju staklo, neke metale i neke vrste plastike. Posude bi po mogućnosti trebale biti neprozirne. Ukoliko su prozirne ili propuštaju svjetlost, posude sa sadržajem moraju se pohraniti na tamnom mjestu.

Posude i poklopci moraju biti čisti i suhi. Oblik i volumen posude moraju udovoljavati zahtjevima propisanim za proizvod čiji se uzorak uzima.

Mogu se koristiti plastične posude za jednokratnu upotrebu, plastične posude, laminati uključujući aluminijsku foliju ili prikladne plastične vrećice s odgovarajućim načinima zatvaranja.

Sve posude, osim plastičnih vrećica, moraju biti čvrsto zatvorene ili prikladnim čepom ili metalnim ili plastičnim poklopcem s navojima, po potrebi s hermetičnim plastičnim zatvaračem. Svi čepovi ili zatvarači koji se koriste moraju biti netopljivi, otporni na djelovanje masti i ne smiju imati sposobnost apsorpcije te ne smiju utjecati na miris, aromu, svojstva ili sastav uzorka.

Čepovi moraju biti izrađeni ili prekriveni materijalima bez mirisa i koji nemaju sposobnost apsorpcije.

7. Postupak uzorkovanja

Posude za uzorke moraju se zatvoriti odmah nakon uzorkovanja.

8. Čuvanje uzoraka

Preporučena temperatura za čuvanje različitih kazeina i kazeinata ne smije biti veća od 25° C.

9. Prijevoz uzoraka

Uzorci se moraju što je moguće prije otpremiti u laboratorij u kojem se vrši ispitivanje (po mogućnosti unutar 24 sata nakon uzorkovanja).

Tijekom prijevoza potrebno je spriječiti izlaganje mirisima koji mogu kontaminirati uzorak, izlaganje direktnoj sunčevoj svjetlosti i temperaturama većim od 25° C.

II. METODA UZORKOVANJA JESTIVIH KAZEINA I KAZEINATA

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom opisuje uzimanje uzoraka jestivih kiselih kazeina, jestivih slatkih kazeina i jestivih kazeinata za kemijsku analizu.

2. Oprema

Vidjeti Poglavlje I. točku 5. ovoga Priloga.

2.1. Sonde

Dovoljne duljine da dosegnu do dna posude s proizvodom. Sonde moraju udovoljavati zahtjevima iz Poglavlja III. ovoga Priloga.

2.2. Žlica, spatula ili lopatica

Napunjena do vrha.

2.3. Posude za uzorke

Vidjeti Poglavlje I. točku 6. ovoga Priloga.

3. Postupak

3.1. Općenito

Tijekom ili neposredno prije uzimanja uzoraka za analizu apsorpcija vode iz atmosfere u sadržaj posude za uzorke mora biti minimalna. Nakon uzorkovanja posudu ponovno čvrsto zatvoriti.

3.2. Postupak

3.2.1. Uzorkovanje

Masa uzorka koji se uzima za analizu ne smije biti manja od 200 g.

Čistu i suhu sondu utisnuti u proizvod, tako da je, ukoliko je to potrebno, posuda nagnuta ili položena na jednu stranu. Otvor okrenuti prema dolje i upotrijebiti ravnomjernu silu prodiranja. Kada dosegne dno posude, sondu rotirati za 180°, izvući sadržaj i isprazniti u posudu za uzorke. Kako bi se dobio uzorak mase najmanje 200 g, postupak ponoviti jednom ili više puta. Posudu za uzorke zatvoriti odmah nakon završenog uzorkovanja. Uzorkovanje se vrši na istoj seriji.

3.2.2. Uzimanje uzoraka proizvoda pakiranih za maloprodaju

Netaknute i neotvorene pretpakovine mogu se smatrati uzorcima. Ukoliko je to moguće, uzeti jednu ili više pretpakovina iz iste serije kako bi se dobio uzorak mase najmanje 200 g.

Ukoliko to nije moguće, upotrijebiti drugu metodu za dobivanje reprezentativnog uzorka.

3.2.3. Zaštita, čuvanje i prijevoz uzoraka

Vidjeti Poglavlje I. točke 8. i 9. ovoga Priloga.

III. SONDE ZA UZORKOVANJE JESTIVIH KAZEINA I KAZEINATA

1. Vrste sonda

a) Tip A: duga (Slika 1.)

b) Tip B: kratka (Slika 2.)

2. Materijali

Oštrica i tijelo sonde moraju biti izrađeni od glatkog metala, po mogućnosti nehrđajućeg čelika. Držak duge sonde mora po mogućnosti biti izrađen od nehrđajućeg čelika. Kratka sonda ima odvojivi drveni ili plastični držak sa kukom u obliku bajuneta u oštrici.

3. Konstrukcija

3.1. Oblik, materijal i vanjski dio moraju omogućiti lagano čišćenje sonde.

3.2. Istaknuti dio oštrice sonde tipa A mora biti dovoljno oštar kako bi poslužio kao strugač.

3.3. Šiljak oštrice mora biti dovoljno oštar kako bi se olakšalo uzimanje uzoraka.

4. Osnovne dimenzije

Sonde moraju biti sukladne sljedećim dimenzijama (dozvoljeno je odstupanje od 10%):

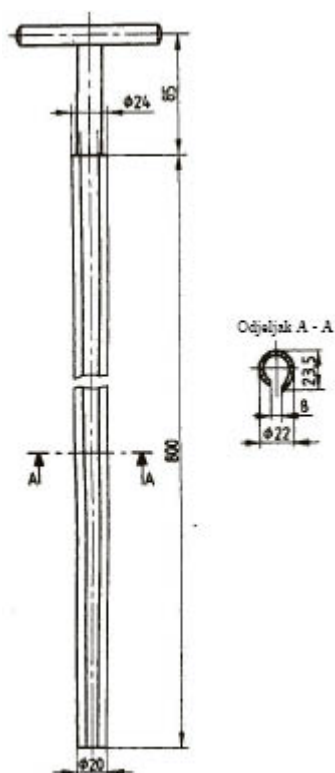
	Tip A duga	Tip B kratka
Duljina oštrice	800 mm	400 mm
Debljina metala oštrice	1 do 2 mm	1 do 2 mm
Unutarnji promjer oštrice kod šiljka	18 mm	32 mm
Unutarnju promjer oštrice kod drška ili tijela	22 mm	28 mm
Širina otvora kod šiljka	4 mm	20 mm
Širina otvora kod drška ili tijela	14 mm	14 mm

5. Napomena

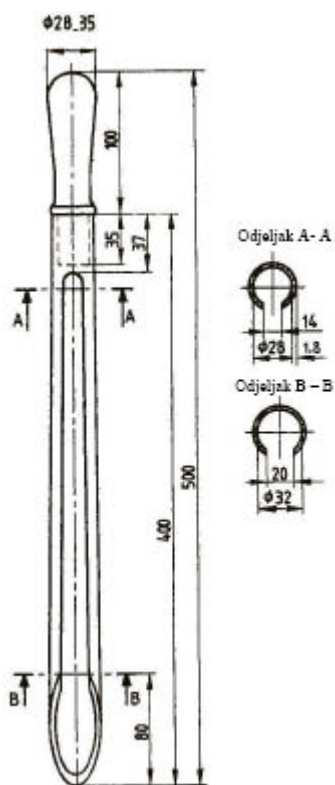
5.1. Kod manje sipkih prašaka sonde se mogu umetnuti okomito. Sonde tipa A se potpuno napune vrtnjom i mogu se izvući okomito. Sonde tipa B se potpuno napune tijekom umetanja i moraju se izvući u kosom položaju kako bi se spriječili gubici na donjem kraju.

5.2. Kod sipkih prašaka, posude moraju biti nagnute, sonde umetnute u gotovo vodoravnom položaju s otvorom prema dolje, a izvučene s otvorom prema gore.

Slika 1. SONDA TIP A



Slika 2. SONDA TIP B



PRILOG 2.

I. PREGLED METODA ANALIZA JESTIVIH KAZEINA I KAZEINATA

I. ODREĐIVANJE VODE U: – kiselim kazeinima – slatkim kazeinima – kazeinatima	}	Metoda 1.
II. ODREĐIVANJE KOLIČINE BJELANČEVINA U: – kiselim kazeinima – slatkim kazeinima – kazeinatima	}	Metoda 2.
III. ODREĐIVANJE KISELOSTI, TITRIMETRIJSKI, U: – kiselim kazeinima		Metoda 3.
IV. ODREĐIVANJE PEPELA (uključujući P ₂ O ₅) U: – kiselim kazeinima – slatkim kazeinima		Metoda 4. Metoda 5.
V. ODREĐIVANJE pH U: – kazeinatima		Metoda 6.

II. METODE ANALIZA SASTAVA JESTIVIH KAZEINA I KAZEINATA

1. Priprema uzorka za analizu

1.1. Opće odredbe

Masa uzorka dopremljenog u laboratorij na analizu ne smije biti manja od 200 g.

1.2. Priprema uzorka za analizu u laboratoriju

1.2.1. Temeljito promiješati i razbiti grude u laboratorijskom uzorku protresajući i preokrećući posudu više puta (ukoliko je potrebno, nakon što je čitav uzorak prenesen u hermetički zatvorenu posudu dovoljnog volumena (volumena dva puta većeg od volumena uzorka) kako bi se omogućio ovaj postupak).

1.2.2. Prenijeti reprezentativni dio uzorka odnosno približno 50 g temeljito promiješanog laboratorijskog uzorka (1.2.1.) u ispitno sito (3.3.).

1.2.3. Ukoliko 50 g uzorka potpuno ili gotovo potpuno (najmanje 95% mase) prođe kroz sito (3.3.), za određivanje upotrijebiti uzorak pripremljen pod točkom 1.2.1.

1.2.4. U suprotnom, samljeti 50 g uzorka u uređaju za mljevenje (3.4.), dok uzorak ne zadovolji kriterij prolaza kroz sito (1.2.3.). Prosijani uzorak odmah prenijeti u hermetički zatvorenu posudu dovoljnog volumena (dva puta većeg od volumena uzorka) i temeljito promiješati opetovanim protresanjem i preokretanjem. Tijekom tih postupaka potrebno je poduzeti mjere kako bi se spriječila bilo kakva promjena udjela vode u uzorku.

1.2.5. Nakon što je ispitni uzorak pripremljen, što je brže moguće nastaviti s određivanjem.

1.3. Posude

Uzorak čuvati u hermetički zatvorenoj posudi.

2. Reagensi

2.1. Voda

2.1.1. Ukoliko se voda koristi kao otapalo, za razrjeđivanje ili za pranje, treba koristiti destiliranu ili demineraliziranu vodu najmanje jednake čistoće.

2.1.2. Pojam »otapanje« ili »razrjeđivanje«, bez navođenja bilo kakvog drugog reagensa, podrazumijeva otapanje u vodi ili razrjeđivanje vodom.

2.2. Kemikalije

Sve kemikalije koje se koriste moraju biti priznate analitičke čistoće, osim gdje je drugačije navedeno.

3. Oprema

3.1. Popis opreme

Popis opreme sadrži samo opremu za specijalnu upotrebu te opremu koja zahtijeva posebnu specifikaciju.

3.2. Analitička vaga

Pojam »analitička vaga« odnosi se na vagu točnosti najmanje 0,1 mg.

3.3. Ispitno sito

Ispitna sita koja se upotrebljavaju moraju imati odgovarajući poklopac, moraju biti promjera 200 mm i izrađena od žičanog materijala nominalne veličine otvora 500 µm. Dozvoljena odstupanja od nominalne veličine otvora i promjeri žice propisani su normom HRN ISO 3310-1:2008 (Ispitna sita: Tehnički zahtjevi i ispitivanja – 1. dio: Ispitna sita izrađena od metalne žičane mreže). Sita moraju imati posudu za prikupljanje.

3.4. Uređaj za mljevenje

Za mljevenje laboratorijskog uzorka, ukoliko je potrebno (vidjeti točku 1.2.4. ovoga Poglavlja), bez stvaranja prekomjerne topline i bez gubitka ili apsorpcije vode, ne smije se upotrebljavati mlin čekićar.

4. Izražavanje rezultata

4.1. Rezultati

Rezultat naveden u analitičkom izvješću predstavlja srednju vrijednost dobivenu iz najmanje dva određivanja koja zadovoljavaju kriterij ponovljivosti za tu metodu.

4.2. Izračun

Ukoliko nije drugačije navedeno, rezultat mora biti izražen kao postotak.

5. Izvješće o ispitivanju

U izvješću o ispitivanju navodi se upotrijebljena metoda analize i dobiveni rezultati. Osim toga, navode se svi detalji postupka koji nisu opisani u metodi analize ili koji nisu obvezni, kao i sve okolnosti koje su mogle utjecati na dobivene rezultate. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

METODA 1. ODREĐIVANJE UDJELA VODE

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio vode u:

- kiselim kazeinima,
- slatkim kazeinima,
- kazeinatima.

2. Definicija

Udio vode u kazeinima i kazeinatima je gubitak mase određen opisanom metodom.

3. Princip

Masa ostatka uzorka za ispitivanje određuje se nakon sušenja pri atmosferskom tlaku u sušioniku pri $102 \pm 1^\circ \text{C}$ do konstantne mase. Gubitak mase izražava se kao postotak mase uzorka.

4. Oprema

4.1. Analitička vaga

4.2. Posudice s ravnim dnom, izrađene od materijala koji ne korodira u uvjetima ispitivanja primjerice nikla, aluminija, nehrđajućeg čelika ili stakla. Posudice moraju imati poklopce koji koji se mogu čvrsto zatvoriti, ali i lako ukloniti. Primjerene dimenzije su promjer 60 do 80 mm i dubina približno 25 mm.

4.3. Sušionik za sušenje pri atmosferskom tlaku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od $102 \pm 1^\circ \text{C}$. Temperatura mora biti jednaka u cijelom sušioniku.

4.4. Eksikator s aktivnim silikagelom s indikatorom prisutnosti vode ili odgovarajućim sredstvom za sušenje.

4.5. Odgovarajući pribor za rukovanje posudicama, primjerice laboratorijska kliješta.

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

Postupiti kako je opisano u točki 1.2. ovoga Poglavlja.

5.2. Priprema posudica

Otvorene posudice i poklopce (4.2.) zagrijavati u sušioniku (4.3.) pri temperaturi $102 \pm 1^\circ \text{C}$, najmanje 1 sat.

5.2.2. Zatvorene posudice ostaviti da se ohlade u eksikatoru (4.4.) do sobne temperature i zatim izvagati s točnošću od 0,1 mg (m_0).

5.3. Uzorak za analizu

Odvagati 3 do 5 g uzorka (5.1.) u posudicu. Posudicu zatvoriti poklopcem i izvagati s točnošću od 0,1 mg (m_1).

5.4. Određivanje

5.4.1. Otvorenu posudicu s poklopcem staviti u sušionik (4.3.) na temperaturu $102 \pm 1^\circ \text{C}$, četiri sata.

5.4.2. Zatvorenu posudicu ostaviti da se ohladi u eksikatoru (4.4.) do sobne temperature i zatim izvagati s točnošću od 0,1 mg.

5.4.3. Otvorenu posudicu s poklopcem zagrijavati u sušioniku jedan sat. Zatim ponoviti postupak opisan u točki 5.4.2.

5.4.4. Ukoliko je masa iz točke 5.4.3. manja od mase iz točke 5.4.2. za više od 1 mg, ponoviti postupak opisan u točki 5.4.3.

Ukoliko se masa poveća, pri izračunu (6.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu.

Konačna zabilježena masa je m_2 (g). Ukupno vrijeme sušenja ne smije biti dulje od šest sati.

6. Izražavanje rezultata

6.1. Metoda izračuna

Gubitak mase sušenjem, izražen kao postotak mase uzorka, izračunava se na sljedeći način:

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

pri čemu je:

m_0 = masa posudice i poklopca nakon postupka opisanog u točki 5.2., u gramima

m_1 = masa posudice, poklopca i uzorka prije sušenja (postupak opisan u točki 5.3.), u gramima

m_2 = masa posudice, poklopca i uzorka nakon sušenja (postupak opisan u točki 5.4.3. ili 5.4.4.), u gramima

Izračunati gubitak mase sušenjem s točnošću od 0,01%.

6.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uvjetima, ne smije biti veća od 0,1 g vode na 100 g proizvoda.

Ova dopuštena razlika između dva rezultata trebala bi biti postignuta u 95% slučajeva kada je metoda ispravno izvedena.

METODA 2. ODREĐIVANJE UDJELA BJELANČEVINA

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio bjelančevina u:

- kiselim kazeinima,
- slatkim kazeinima,
- kazeinatima.

osim onih koji sadrže amonijev kazeinat ili druge amonijeve ili dušikove neproteinske spojeve.

2. Definicija

Udio bjelančevina je umnožak udjela dušika, određenog opisanom metodom, sa faktorom 6,38 i izražen u postotku.

3. Princip

Uzorak razgraditi mješavinom kalijevog sulfata i sumporne kiseline, uz bakrov(II) sulfat kao katalizator, kako bi se organski dušik pretvorio u amonijev ion. Amonijak se destilira i apsorbira u otopinu borne kiseline i zatim titrira standardnom otopinom kloridne kiseline. Množenjem udjela dušika sa faktorom 6,38 dobiva se udio bjelančevina.

4. Reagensi

4.1. Sumporna kiselina, koncentrirana, gustoće 1,84 g/mL.

4.2. Bezvodni kalijev sulfat (K_2SO_4).

4.3. Bakrov(II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4 \times 5H_2O$).

4.4. Saharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$).

4.5. Borna kiselina, otopina 40 g/L.

4.6. Natrijev hidroksid, koncentrirana vodena otopina 30% (m/m), bez karbonata.

4.7. Kloridna kiselina, 0,1 mol/L.

4.8. Miješani indikator

Pomiješati jednaki volumen 2 g/L metilnog crvenila otopljenog u najmanje 95%-tnom(v/v) etanolu i 1 g/L otopine metilenskog modrila u najmanje 95%-tnom (v/v) etanolu.

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Kjeldahlova tikvica, 500 mL.

5.3. Uređaj za digestiju s Kjeldahlovom tikvicom (5.2.) u nagnutom položaju te uređajem za zagrijavanje kojim se ne zagrijava dio tikvice iznad površine tekućeg sadržaja.

5.4. Hladilo s ravnom unutarnjom cijevi.

5.5. Odvodna cijev sa sigurnosnim ventilom povezana sa donjim dijelom hladila (5.4.) spojkom od brušenog stakla ili gumenom cjevčicom. Ukoliko se upotrebljava gumena cjevčica, stakleni krajevi moraju biti blizu jedan drugome.

5.6. Glava za unos, povezana s Kjeldahlovom tikvicom (5.2.) i hladilom (5.4.) pomoću mekane, čvrsto prijanjajuće gume ili drugih odgovarajućih čepova.

5.7. Erlenmeyerova tikvica, 500 mL.

5.8. Graduirane menzure, 50 i 100 mL.

5.9. Bireta, 50 mL, graduirana na 0,1 mL.

5.10. Pomagala za vrenje

5.10.1. Za digestiju: komadići tvrdog porculana ili staklene kuglice.

5.10.2. Za destilaciju: svježe žareni kamenčići za vrenje.

6. Postupak

6.1. Priprema uzorka

Postupiti kako je opisano u točki 1.2. ovoga Poglavlja.

6.2. Ispitivanje prisutnosti amonijevog iona

Ukoliko postoji sumnja da je prisutan amonijev kazeinat ili drugi amonijev spoj, potrebno je provesti sljedeću probu.

U Erlenmeyerovu tikvicu odvagati 1 g uzorka, a zatim dodati 10 mL vode i 100 mg magnezijevog oksida. Sa stijenki isprati magnezijev oksid i tikvicu zatvoriti plutenim čepom. Između plutenog čepa i vrata tikvice staviti komadić navlaženog crvenog lakmus papira. Pažljivo promiješati sadržaj tikvice i zagrijati tikvicu u vodenoj kupelji pri temperaturi 60 do 65° C. Ukoliko se boja lakmus papira promijeni u plavu unutar 15 minuta, prisutan je amonijak i metodu nije moguće primijeniti (vidjeti točku 1.).

6.3. Slijepa proba

Paralelno s određivanjem udjela dušika u uzorku, provesti slijepu probu sa 0,5 g saharoze (4.4.) umjesto uzorka, koristeći isti uređaj, iste količine svih reagensa i isti postupak kako je opisano u točki 6.5. Ukoliko je utrošak 0,1 mol/L kiseline pri titraciji veći od 0,5 mL, provjeriti reagense te nečisti reagens ili reagense očistiti ili zamijeniti.

6.4. Uzorak za analizu

U Kjeldahlovu tikvicu (5.2.) prenijeti 0,3 do 0,4 g uzorka (6.1.), izvaganoga s točnošću od 0,1 mg.

6.5. Određivanje

6.5.1. U tikvicu staviti nekoliko komadića porculana ili staklenih kuglica (5.10.1.) i približno 10 g bezvodnog kalijevog sulfata. Dodati 0,2 g bakrovog(II) sulfata (4.3.) i isprati vrat tikvice s malo vode. Dodati 20 mL koncentrirane sumporne kiseline (4.1.). Promiješati sadržaj tikvice. Lagano zagrijavati u uređaju za digestiju (5.3.) dok pjenjenje ne prestane, ostaviti da lagano vrije dok se otopina ne razbistri i pojavi stabilna blijeda zeleno-plava boja. Tijekom zagrijavanja povremeno okretati tikvicu. Nastaviti vrenje i regulirati zagrijavanje tako da se pare kondenziraju na sredini vrata tikvice. Nastaviti zagrijavanje još 90 minuta tako da ne dođe do lokalnog pregrijavanja. Ostaviti da se ohladi do sobne temperature i pažljivo dodati približno 200 mL vode i nekoliko kamenčića za vrenje (5.10.2.). Promiješati i ponovno ohladiti.

6.5.2. U Erlenmeyerovu tikvicu (5.7.) prenijeti 50 mL borne kiseline (4.5.) i četiri kapi indikatora (4.8.). Promiješati i staviti tikvicu ispod hladila (5.4.) tako da vrh odvodne cijevi (5.5.) bude uronjen u bornu kiselinu. Pomoću građuirane menzure (5.8.) u Kjeldahlovu tikvicu dodati 80 mL otopine natrijevog hidroksida (4.6.) Tijekom tog postupka držati tikvicu u nagnutom položaju kako bi otopina natrijevog hidroksida tekla uz stjenku tikvice i formirala donji sloj. Odmah povezati Kjeldahlovu tikvicu sa hladilom pomoću glave za unos (5.6.).

Lagano rotirati Kjeldahlovu tikvicu kako bi se promiješao sadržaj. Na početku lagano zagrijavati do vrenja pazeći da ne dođe do pjenjenja. Nastaviti s destilacijom tako da se 150 mL destilata sakupi za približno 30 minuta. Temperatura destilata ne smije biti veća od 25° C. Približno dvije minute prije završetka destilacije spustiti Erlenmeyerovu tikvicu tako da vrh odvodne cijevi ne bude uronjen u otopinu kiseline i isprati vrh s malo vode. Prekinuti zagrijavanje, ukloniti odvodnu cijev i isprati unutarnje i vanjske stjenke s malo vode, sakupljajući vodu u Erlenmeyerovu tikvicu.

6.5.3. Titrirati destilat u Erlenmeyerovoj tikvici standardnom volumetrijskom otopinom kloridne kiseline (4.7.).

7. Izražavanje rezultata

7.1. Formula i metoda izračuna

Količina bjelančevina u uzorku, izražena kao postotak mase uzorka, izračunava se na sljedeći način:

$$\frac{(V_1 - V_2) \times T \times 14 \times 100 \times 6,38}{m \times 1000} = \frac{8,932 \times (V_1 - V_2) \times T}{m}$$

pri čemu je:

V1 = volumen standardne volumetrijske otopine kloridne kiseline (4.7.) utrošene pri određivanju, u mL

V2 = volumen standardne volumetrijske otopine kloridne kiseline (4.7.) utrošene za slijepu probu (6.3.), u mL

T = koncentracija standardne volumetrijske otopine kloridne kiseline (4.7.), u mol/L

m = masa ispitivanog uzorka, u gramima

Izračunati udio bjelančevina s točnošću od 0,1%.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uvjetima, ne smije biti veća od 0,5 g bjelančevina na 100 g proizvoda.

Ova dopuštena razlika između dva rezultata trebala bi biti postignuta u 95% slučajeva kada je metoda ispravno izvedena.

METODA 3. TITRIMETRIJSKO ODREĐIVANJE KISELOSTI

1. Opseg i područje primjene

Titrimetrijskom metodom određuje se kiselost kiselih kazeina.

2. Definicija

Titracijska kiselost kiselih kazeina je volumen (mL) 0,1 mol/L standardne otopine natrijevog hidroksida potrebne za neutralizaciju vodenog ekstrakta 1 g proizvoda.

3. Princip

Vodeni ekstrakt uzorka se dobiva i filtrira pri 60° C. Filtrat se titrira standardnom otopinom natrijevog hidroksida koristeći fenolftalein kao indikator.

4. Reagensi

Iz vode koja se koristi u postupku ili za pripremu reagensa prije upotrebe mora biti uklonjen ugljikov dioksid zagrijavanjem do vrenja 10 minuta.

4.1. Otopina natrijevog hidroksida, 0,1 mol/L.

4.2. Otopina indikatora fenolftaleina, 10 g/L u etanolu (95% v/v), neutraliziranom u odnosu na indikator.

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Erlenmeyerova tikvica, 500 mL, s brušenim vratom i staklenim čepom od brušenog stakla.

5.3. Trbušasta pipeta, 100 mL.

5.4. Pipeta, primjerena za mjerenje 0,5 mL otopine indikatora.

5.5. Erlenmeyerova tikvica, 250 mL.

5.6. Menzura, 250 mL.

5.7. Bireta, graduirana na 0,1 mL.

5.8. Vodena kupelj, s mogućnošću reguliranja temperature na $60 \pm 2^\circ \text{C}$.

5.9. Odgovarajući filter.

6. Postupak

6.1. Priprema uzorka za ispitivanje

Postupiti kako je opisano u točki 1.2. ovoga Poglavlja.

6.2. Uzorak za analizu

U Erlenmeyerovu tikvicu (5.2.) odvagati približno 10 g uzorka za analizu (6.1.) s točnošću od 10 mg.

6.3. Određivanje

Pomoću menzure (5.6.) dodati 200 mL svježe prokuhane i ohlađene vode, prethodno zagrijane na 60° C. Tikvicu zatvoriti čepom, okretanjem promiješati sadržaj i staviti u vodenu kupelj na 60° C (5.8.) 30 minuta. Približno svakih 10 minuta protresti tikvicu. Filtrirati i ohladiti filtrat na približno 20° C. Filtrat mora biti bistar.

Pipetom (5.3.) prebaciti 100 mL ohlađenog filtrata u Erlenmeyerovu tikvicu (5.5.). Pipetom (5.4.) dodati 0,5 mL otopine indikatora fenolftaleina (4.2.). Titirati standardnom volumetrijskom otopinom natrijevog hidroksida do pojave blijede ružičaste boje koja se zadržava najmanje 30 sekundi. Odrediti i zapisati volumen s točnošću 0,01 mL.

7. Izražavanje rezultata

7.1. Formula i metoda izračuna

Titracijska kiselost kiselih kazeina izračunava se na sljedeći način:

$$\frac{20 \times V \times T}{m}$$

pri čemu je:

V = volumen utrošene standardne volumetrijske otopine natrijevog hidroksida (4.1.), u mL

T = koncentracija utrošene standardne volumetrijske otopine natrijevog hidroksida (4.1.), u mol/L

m = masa uzorka za analizu, u gramima

Rezultat se izražava na dva decimalna mjesta.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uvjetima, ne smije biti veća od 0,02 mL 0,1 mol/L natrijevog hidroksida na 1 g proizvoda.

Ova dopuštena razlika između dva rezultata trebala bi biti postignuta u 95% slučajeva kada je metoda ispravno izvedena.

METODA 4. ODREĐIVANJE PEPELA (uključujući P₂O₅)

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio pepela (uključujući P₂O₅) u kiselim kazeinima.

2. Definicija

Udio pepela (uključujući P₂O₅) je udio pepela određen opisanom metodom.

3. Princip

Uzorak se spaljuje pri $825 \pm 25^{\circ} \text{C}$ u prisutnosti magnezijevog acetata kako bi se vezao sav fosfor organskog podrijetla. Konačni udio pepela izračuna se nakon vaganja ostatka i oduzimanja mase pepela koji potječe od magnezijevog acetata.

4. Reagensi

4.1. Otopina magnezijevog acetata tetrahidrata, 120 g/L.

Otopiti 120 g magnezijevog acetata tetrahidrata $[\text{Mg} (\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}]$ u vodi i dopuniti vodom do 1 L.

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Trbušasta pipeta, 5 mL.

5.3. Posudice od kvarca ili platine, promjera približno 70 mm i dubine 25 do 50 mm.

5.4. Sušionik, s mogućnošću reguliranja temperature na $102 \pm 1^{\circ} \text{C}$.

5.5. Mufolna peć, s mogućnošću reguliranja temperature na $825 \pm 25^{\circ} \text{C}$.

5.6. Vodena kupelj

5.7. Eksikator s aktivnim silikagelom s indikatorom prisutnosti vode ili odgovarajućim sredstvom za sušenje.

6. Postupak

6.1. Priprema uzorka

Vidjeti točku 1.2. ovoga Poglavlja.

6.2. Priprema posudica

Zagrijavati dvije posudice (A, B) (5.3.) u mufolnoj peći na temperaturi $825 \pm 25^\circ \text{C}$, 30 minuta. Pričekati da se posudice malo ohlade, a zatim ih staviti u eksikator (5.7.) da se ohlade na sobnu temperaturu. Izvagati posudice s točnošću 0,1 mg.

6.3. Uzorak za analizu

Odvagati približno 3 g uzorka (6.1.) s točnošću 0,1 mg u jednu od pripremljenih posudica (A).

6.4. Određivanje

Pipetom (5.2.) dodati točno 5 mL otopine magnezijevog acetata (4.1.) u posudicu (A) tako da sav uzorak bude natopljen i ostaviti stajati 20 minuta. U drugu posudicu (B) pipetom (5.2.) dodati točno 5 mL otopine magnezijevog acetata (4.1.). Ispariti sadržaj obje posudice (A i B) do suhoga u kipućoj vodenoj kupelji (5.6.). Zatim obje posudice staviti u sušionik (5.4.) na temperaturu $102 \pm 1^\circ \text{C}$, 30 minuta.

Zagrijavati posudicu A na slabom plamenu, vrućoj ploči ili pod infracrvenom lampom dok uzorak potpuno ne pougljeni, pazeći pri tome da se ne zapali.

Obje posudice (A i B) prenijeti u mufolnu peć (5.5.) i zagrijavati na temperaturu $825 \pm 25^\circ \text{C}$ najmanje 1 sat, dok sav ugljen iz posudice A ne nestane. Pričekati da se posudice malo ohlade, a zatim ih staviti u eksikator (5.7.) da se ohlade na sobnu temperaturu. Izvagati posudice s točnošću 0,1 mg.

Ponavljati postupak zagrijavanja približno 30 minuta, u mufolnoj peći (5.5.), hlađenja i vaganja do konstantne mase (u granicama 1 mg) ili do početka povećavanja mase. Zapisati najnižu masu.

7. Izražavanje rezultata

7.1. Metoda izračuna

Udio pepela, uključujući P_2O_5 , izražen kao postotak mase, izračunava se na sljedeći način:

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

pri čemu je:

m_0 = masa uzorka, u gramima

m_1 = masa posudice A i ostatka, u gramima

m_2 = masa posudice A, u gramima

m_3 = masa posudice B i ostatka, u gramima

m_4 = masa posudice B, u gramima

Konačni rezultat izračunati s točnošću 0,01%.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uvjetima, ne smije biti veća od 0,1 g na 100 g proizvoda.

Ova dopuštena razlika između dva rezultata trebala bi biti postignuta u 95% slučajeva kada je metoda ispravno izvedena.

METODA 5 ODREĐIVANJE PEPELA (uključujući P2O5)

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio pepela (uključujući P2O5) u slatkim kazeinima.

2. Definicija

Udio pepela (uključujući P2O5) je udio pepela određen opisanom metodom.

3. Princip

Uzorak se spaljuje pri temperaturi $825 \pm 25^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase. Ostatak se važe i izražava kao postotak mase uzorka.

4. Oprema

4.1. Analitička vaga

4.2. Posudica od kvarca ili platine, promjera približno 70 mm i dubine 25 do 50 mm.

4.3. Mufolna peć, sa ventilacijom i mogućnošću reguliranja temperature na $825 \pm 25^{\circ}\text{C}$.

4.4. Eksikator s aktivnim silikagelom s indikatorom prisutnosti vode ili odgovarajućim sredstvom za sušenje.

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

Postupiti kako je opisano u točki 1.2. ovoga Poglavlja.

5.2. Priprema posudice

Zagrijavati posudicu (4.2.) u mufolnoj peći na temperaturi $825 \pm 25^\circ \text{C}$, 30 minuta. Pričekati da se posudica malo ohlade, a zatim ju staviti u eksikator (5.7.) da se ohladi na sobnu temperaturu. Izvagati posudicu s točnošću 0,1 mg.

5.3. Uzorak za analizu

U posudicu odvagati približno 3 g uzorka (5.1.) s točnošću 0,1 mg.

5.4. Određivanje

Zagrijavati posudicu na slabom plamenu, vrućoj ploči ili pod infracrvenom lampom dok uzorak potpuno ne pougljeni, pazeći pri tome da se ne zapali.

Posudicu prenijeti u mufolnu peć (4.3.) na temperaturu $825 \pm 25^\circ \text{C}$ i zagrijavati najmanje 1 sat, dok sav ugljen iz posudice ne nestane. Pričekati da se posudica malo ohladi, a zatim ju staviti u eksikator (4.4.) da se ohladi na sobnu temperaturu. Izvagati posudicu s točnošću 0,1 mg.

Ponavljati postupak zagrijavanja približno 30 minuta, u mufolnoj peći (4.3.), hlađenja i vaganja do konstantne mase (u granicama 1 mg) ili do početka povećavanja mase. Zapisati najnižu masu.

6. Izražavanje rezultata

6.1. Metoda izračuna i formula

Udio pepela, uključujući P_2O_5 , izražen kao postotak mase, izračunava se na sljedeći način:

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

pri čemu je:

m_0 = masa uzorka, u gramima

m_1 = masa posudice i ostatka, u gramima

m_2 = masa posudice, u gramima

Konačni rezultat izračunati s točnošću 0,01%.

6.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uvjetima, ne smije biti veća od 0,15 g na 100 g proizvoda.

Ova dopuštena razlika između dva rezultata trebala bi biti postignuta u 95% slučajeva kada je metoda ispravno izvedena.

METODA 6. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje pH vrijednost kazeinata.

2. Definicija

pH vrijednost kazeinata je pH vodene otopine kazeinata pri 20° C određen opisanom metodom.

3. Princip

Elektrometrijsko određivanje pH vrijednosti vodene otopine kazeinata pomoću pH metra.

4. Reagensi

Voda koja se koristi za pripremu reagensa ili u postupku (6.) mora biti svježe destilirana, bez apsorbiranog ugljikovog dioksida.

4.1. Puferske otopine, za baždarenje pH metra (5.2.)

Dvije standardne puferske otopine s pH vrijednostima pri 20° C, izraženima na dva decimalna mjesta, kojima se točno određuje pH vrijednost ispitivanog uzorka, primjerice ftalatna puferska otopina s pH vrijednosti približno 4 i boraksova puferska otopina s pH vrijednosti približno 9.

5. Oprema

5.1. Vaga, s točnošću 0,1 g.

5.2. pH metar, najmanje osjetljivosti 0,05 pH jedinica, s odgovarajućom baždarenom elektrodom, primjerice staklenom elektrodom i kalomel elektrodom ili drugom referentnom elektrodom.

5.3. Termometar, s točnošću 0,5° C.

5.4. Erlenmeyerova tikvica, 100 mL, s čepom od brušenog stakla.

5.5. Čaša, 50 mL.

5.6. Mješalica.

5.7. Čaša, za mješalicu (5.6.), 250 mL.

6. Postupak

6.1. Priprema uzorka

Postupiti kako je opisano u točki 1.2. ovoga Poglavlja.

6.2. Određivanje

6.2.1. Baždarenje pH metra

Podesiti temperaturu puferskih otopina (4.1.) na 20° C i baždariti pH metar sukladno uputama proizvođača.

Napomene:

1. Baždarenje treba provesti za vrijeme 20 minuta stajanja otopine (vidjeti točku 6.2.2.).
2. Pri ispitivanju serije uzoraka provjeravati baždarenost pH metra jednom ili više standardnih otopina najmanje svakih 30 minuta.

6.2.2. Priprema otopine za ispitivanje

U čašu (5.7.) odvagati 5 g uzorka (6.1.), dodati 95 mL vode i miješati miješalicom (5.6.) 30 sekundi. Otopinu pustiti da stoji 20 minuta pri temperaturi približno 20° C, pokrivenu satnim stakalcem.

6.2.3. Mjerenje pH

6.2.3.1. U čašu (5.5.) uliti približno 20 mL otopine i odmah očitati pH vrijednost tekućine pomoću pH metra (5.2.). Prije mjerenja potrebno je elektrodu pažljivo isprati vodom.

6.2.3.2. Izmjeriti pH.

7. Izražavanje rezultata

7.1. Zapisivanje pH vrijednosti

Kao pH vrijednost otopine kazeinata očitati vrijednost na kazalu pH metra na najmanje dva decimalna mjesta.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju određivanja koja provodi isti analitičar, istovremeno ili neposredno jedno za drugim, na istom uzorku te pod istim uvjetima, ne smije biti veća od 0,05 pH jedinica.

Ova dopuštena razlika između dva rezultata trebala bi biti postignuta u 95% slučajeva kada je metoda ispravno izvedena.

[1] Pravilnikom se preuzimaju odredbe Direktive Komisije 86/424/EEZ od 15. srpnja 1986. o metodama uzorkovanja za kemijske analize jestivih kazeina i kazeinata i Direktive Komisije 85/503/EEZ od 25. listopada 1985. o metodama analiza jestivih kazeina i kazeinata

[2] Pravilnikom su preuzete odredbe Direktive Vijeća 83/417/EEZ od 25. srpnja 1983. o usklađivanju zakonodavstva država članica o određenim mliječnim proteinima (kazeinima i kazeinatima) namijenjenima za prehranu ljudi