

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, ŠUMARSTVA I VODNOGA GOSPODARSTVA

3799

Na temelju članka 94. stavka 2. podstavka 4. Zakona o hrani (»Narodne novine« br. 46/07), ministar poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva donosi

PRAVILNIK

O METODAMA ANALIZA TOPLINSKI OBRAĐENOG MLIJEKA ZA PREHRANU LJUDI¹

I. OPĆE ODREDBE

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom propisuju referentne metode uzimanja uzoraka i referentne metode analize toplinski obrađenog mlijeka namijenjenog za prehranu ljudi radi kontrole kakvoće.

Članak 2.

Referentne metode analize toplinski obrađenog mlijeka su sljedeće:

- određivanje udjela ukupne suhe tvari,
- određivanje udjela masti,
- određivanje udjela bezmasne suhe tvari,
- određivanje udjela ukupnog dušika,
- određivanje udjela proteina,
- određivanje specifične mase.

Članak 3.

Izvedba referentnih metoda analiza, određivanja kriterija pouzdanosti i uzorkovanja provodi se sukladno odredbama propisanim u Prilogu 1. koji je tiskan uz ovaj Pravilnik i njegov je sastavni dio.

Članak 4.

Metode iz članka 2. ovoga Pravilnika propisane su u Prilogu 2. koji je tiskan uz ovaj Pravilnik i njegov je sastavni dio.

II. ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 5.

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

Klasa: 011-02/07-01/117

Urbroj: 525-1-07-1

Zagreb, 19. prosinca 2007.

Ministar
Petar Čobanković, v. r.

¹ Pravilnik preuzima odredbe Odluke Vijeća 92/608/EEZ od 14. studenoga 1992. kojom se propisuju metode analize i ispitivanja toplinski obrađenog mlijeka za izravnu ljudsku potrošnju

PRILOG 1.

I. OPĆE ODREDBE

1. UVOD

Propisane su opće odredbe vezane za reagense, opremu, izražavanja rezultata, preciznosti i analitičkih izvješća. Laboratoriji zaduženi za provedbu uzorkovanja i ispitivanja mlijeka moraju udovoljavati odredbama ovoga Pravilnika.

2. REAGENSI

2.1. Voda

2.1.1. Voda koja se koristi za postupke otapanja, razrjeđivanja ili ispiranja, mora biti destilirana, deionizirana ili demineralizirana voda najmanje jednake čistoće osim ukoliko nije drugačije navedeno.

2.1.2. Pojam »otapanje« ili »razrjeđivanje« bez dodatnih navoda, podrazumijeva »otapanje u vodi« ili »razrjeđivanje vodom«.

2.2. Kemijske tvari

Sve kemijske tvari koje se koriste moraju imati priznatu analitičku čistoću osim ukoliko nije drugačije navedeno.

3. OPREMA

3.1. Popis opreme

Popisi opreme za različite referentne metode sadrže samo pribor za specijaliziranu upotrebu i pribor koji zahtijeva posebnu specifikaciju.

3.2. Analitička vaga

Pojam »analitička vaga« odnosi se na vagu osjetljivosti 0.1 mg.

4. IZRAŽAVANJE REZULTATA

4.1. Rezultati

Osim ukoliko je drugačije navedeno, rezultati navedeni u analitičkom izvješću iz točke 6. ovoga Priloga odnose se na aritmetičku vrijednost dobivenu iz dvije analize koje zadovoljavaju kriterij ponovljivosti iz točke 5.1.1. ovoga Priloga naveden za tu metodu. Ukoliko kriterij ponovljivosti nije zadovoljen, analiza mora biti ponovljena, ukoliko je to moguće, ili rezultat proglašen nevažećim.

4.2. Izračunavanje masenog udjela

Ukoliko nije drugačije navedeno, rezultati se moraju izračunavati kao maseni udio uzorka.

5. KRITERIJI PRECIZNOSTI: PONOVLJIVOST I OBNOVLJIVOST

5.1. Kriteriji preciznosti koji su zadani u svakoj metodi definirani su kako slijedi:

5.1.1. Ponovljivost (r) je vrijednost ispod koje se nalazi apsolutna razlika između dva pojedinačna rezultata analiza dobivena primjenom istog postupka na istom materijalu za analizu, pod istim uvjetima (isti analitičar, ista oprema, isti laboratorij i kratki vremenski interval).

5.1.2. Obnovljivost (R) je vrijednost ispod koje se nalazi apsolutna razlika između dva pojedinačna rezultata analiza dobivena primjenom istog postupka na istom materijalu za analizu, pod različitim uvjetima (drugi analitičar, druga oprema, drugi laboratorij i/ili drugo vrijeme).

5.1.3. Ukoliko nije navedeno drugačije, za svaku pojedinu metodu vrijednosti kriterija ponovljivosti i obnovljivosti svakog postupka predstavljaju intervale s razinom pouzdanosti od 95% u skladu s HRN ISO 5725-2:2004.

5.1.4. Potrebne međulaboratorijske pokuse i studije trebalo bi planirati i provoditi u skladu s međunarodnim smjernicama.

6. ANALITIČKO IZVJEŠĆE

U analitičkom izvješću treba biti navedena korištena metoda analize i dobiveni rezultati. Osim toga, izvješće mora sadržavati sve pojedinosti o postupku koje nisu određene metodom analize ili su izborne, kao i sve druge okolnosti koje su mogle utjecati na dobivene rezultate. Analitičko izvješće treba pružiti sve potrebne informacije za potpunu identifikaciju uzorka.

II. UZORKOVANJE TOPLINSKI OBRAĐENOG MLIJEKA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovim se postupkom opisuje referentna metoda uzorkovanja, prijevoza i skladištenja uzoraka toplinski obrađenog mlijeka.

2. OPĆE ODREDBE

Uzorkovanje toplinski obrađenog mlijeka u spremnicima i dr. provest će stručna osoba koja je prošla odgovarajuću obuku prije uzorkovanja mlijeka.

Ukoliko je to potrebno, nadležno tijelo ili ispitni laboratorij mora osoblje koje radi

uzorkovanje podučiti tehnikama uzorkovanja kako bi se osiguralo da uzorak bude reprezentativan i u skladu s cijelom serijom.

Ukoliko je to potrebno, nadležno tijelo ili ispitni laboratorij moraju uputiti osoblje koje radi uzorkovanje na poduku označavanja uzorka kako bi se osigurao nedvojbeni identitet uzorka.

3. OPREMA ZA UZORKOVANJE

3.1. Opće odredbe

Oprema za uzorkovanje mora biti izrađena od nehrđajućeg čelika ili drugog odgovarajućeg materijala primjerene čvrstoće i konstrukcije koji odgovara njenoj namjeni (miješanje, uzorkovanje itd.). Stapovi i miješalice za miješanje tekućine u spremnicima moraju imati dovoljno prostora za odgovarajuće miješanje proizvoda, a da ne uzrokuju nastajanje užeglosti. Žlica mora imati čvrstu ručku dostatne dužine kako bi se omogućilo uzimanje uzoraka na bilo kojoj dubini u spremniku. Kapacitet žlice ne smije biti manji od 50 ml.

Spremnici za uzorke i poklopci moraju biti od stakla, odgovarajućih metala ili plastike.

Materijali od kojih je izrađena oprema za uzorkovanje (uključujući spremnike i poklopce) ne smiju uzrokovati nikakve promjene na uzorcima koje bi mogle utjecati na rezultate analize.

Sve površine opreme za uzorkovanje i spremnika za uzorke moraju biti čiste i suhe, glatke i bez pukotina, i rubovi im trebaju biti zaobljeni.

4. TEHNIKE UZORKOVANJA

4.1. Opće odredbe

Bez obzira na analize koje treba provesti, mlijeko treba potpuno promiješati prije uzorkovanja, i to ručno ili strojno.

Uzorak treba uzeti odmah nakon miješanja, dok se mlijeko još giba.

Volumen uzorka treba odgovarati zahtjevima analize. Kapacitet korištenih spremnika za uzorke treba biti takav da su gotovo u potpunosti ispunjeni uzorkom i da se time omogući odgovarajuće miješanje sadržaja prije analize i izbjegne bućkanje tijekom transporta.

4.2. Ručno uzorkovanje

4.2.1. Uzorkovanje iz više posuda

U slučaju kada se količina mlijeka iz koje se trebaju uzeti uzorci nalazi u više spremnika, treba uzeti reprezentativnu količinu iz svakog spremnika i zabilježiti na koju količinu mlijeka se odnosi koji uzorak. U slučaju da uzorke iz svakog spremnika ne treba zasebno analizirati, tada treba promiješati udjele ovih reprezentativnih količina u omjerima proporcionalnima količini koja se nalazi u spremnicima iz kojih je uzet uzorak. Uzorke iz tih skupnih razmjernih količina treba uzeti nakon miješanja.

4.2.2. Uzorkovanje iz velikih posuda – skladišni, željeznički i cestovni spremnici

4.2.2.1. Miješanje mlijeka odgovarajućim postupkom prije uzorkovanja.

Za miješanje sadržaja velikih posuda ili skladišnih, željezničkih i cestovnih spremnika savjetuje se korištenje strojne miješalice sukladno točki 4.2.2.2. ovoga Priloga.

Vrijeme miješanja odgovara vremenskom razdoblju u kojem je mlijeko mirovalo. Potrebno je dokazati da učinkovitost postupka miješanja koji se primijeni pod bilo kojim okolnostima

odgovara potrebama predviđene analize; kriterij učinkovitosti miješanja naročito utječe na sličnost rezultata analize provedene na uzorcima uzetima ili iz različitih dijelova pošiljke, ili iz ispusta spremnika u razmacima tijekom pražnjenja. Postupak miješanja mlijeka (neobrađenog ili punomasnog mlijeka) smatrat će se učinkovitim ukoliko razlika u količini masti koju sadrže dva uzorka uzeta pod ovim uvjetima iznosi manje od 0,1%.

U velikoj posudi s ispustom za izlivanje na dnu može na točki izlivanja postojati manja količina mlijeka koja nije reprezentativna za cjelokupni sadržaj čak ni nakon miješanja. Stoga je bolje uzimati uzorke kroz gornji otvor. Ukoliko se uzorci uzimaju na ispustu za izlivanje, treba pustiti dovoljnu količinu mlijeka da proteče kako bi se osigurala reprezentativnost uzoraka u odnosu na cjelinu.

4.2.2.2. Miješanje sadržaja velikih posuda ili skladišnih, željezničkih i cestovnih spremnika može se provesti na sljedeće načine:

- strojnom miješalicom ugrađenom u spremnike koju pokreće električni motor;
- propelerom ili miješalicom koju pokreće električni motor te je postavljena na otvor s miješalicom uronjenom u mlijeko;
- u slučaju cestovnih ili željezničkih spremnika ponovnim kruženjem mlijeka kroz ispusnu cijev koja je povezana s pumpom za pražnjenje spremnika te je umetnuta kroz gornji otvor;
- čistim filtriranim komprimiranim zrakom. U ovom slučaju trebalo bi koristiti minimalni tlak i volumen zraka kako bi se spriječilo nastajanje užeglosti.

4.3. Uzorkovanje toplinski obrađenog mlijeka za prehranu ljudi u maloprodajnoj ambalaži

Uzorci toplinski obrađenog mlijeka za prehranu ljudi u maloprodajnoj ambalaži moraju biti u originalnom pakiranju. Ukoliko je moguće, uzorke treba uzeti iz stroja za pakiranje ili hladnjače u postrojenju za obradu što je prije moguće nakon obrade (za pasterizirano mlijeko na dan obrade).

Uzorci se uzimaju iz svake vrste toplinski obrađenog mlijeka (pasteriziranog, UHT-obrađenog i steriliziranog) i to u broju koji odgovara analizama koje će se vršiti i u skladu s uputama koje je propisao laboratorij koji vrši ispitivanja ili drugo nadležno tijelo.

5. IDENTIFIKACIJA UZORKA

Uzorak treba biti označen identifikacijskim kodom tako da se može odmah identificirati prema uputama laboratorija koji vrši analize ili drugog nadležnog tijela.

6. ČUVANJE, TRANSPORT I SKLADIŠTENJE UZORAKA

Laboratorij koji provodi analize dužan je u dogovoru s nadležnim tijelom pripremiti upute vezane za uvjete čuvanja (kemijske, temperaturne), transporta, skladištenja i vremenskih razdoblja između uzorkovanja i analize mlijeka prema vrsti mlijeka i postupku analize koji se koristi.

Upute trebaju sadržavati sljedeće:

- Tijekom transporta i skladištenja treba poduzeti preventivne mjere kojima će se spriječiti izlaganje stranim mirisima i izravnoj sunčevoj svjetlosti. U slučaju da je spremnik za uzorke proziran, treba ga pohraniti na tamnom mjestu.

PRILOG 2.

I. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNE SUHE TVARI

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovim se postupkom opisuje referentna metoda za određivanje udjela ukupne suhe tvari u mlijeku.

2. DEFINICIJA

Udio ukupne suhe tvari – je masa koja ostane po završetku točno određenog postupka sušenja na konstantnoj temperaturi do konstantne mase, a izražava se kao maseni udio.

3. NAČELO

Isparavanje vode iz uzorka za analizu na temperaturi od 102 ± 2 °C u sušioniku.

4. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Uobičajena laboratorijska oprema, a naročito:

- 4.1. Analitička vaga
- 4.2. Eksikator, s učinkovitim sredstvom za sušenje (npr. svježe osušeni silika-gel s pokazateljem udjela vode).
- 4.3. Sušionik, ventiliran, s temperaturom održavanom na 102 ± 2 °C na cijelom radnom prostoru.
- 4.4. Posude s ravnim dnom, visine 20 do 25 mm, promjera 50 do 75 mm, i od odgovarajućeg materijala, zajedno s poklopcima koji dobro prijanjaju i lako se uklanjaju.
- 4.5. Vruća vodena kupelj
- 4.6. Homogenizator

5. PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU

Uzorak mlijeka treba zagrijati na temperaturu između 20 i 25 °C. Temeljito promiješati kako bi se osigurala ravnomjerna distribucija masti u cijelom uzorku. Izbjegavati previše snažno miješanje da ne bi došlo do pjenjenja mlijeka ili bućkanja masti. U slučaju da se pokaže da je teško raspršiti sloj vrhnja, treba polako zagrijati na temperaturu između 25 i 40 °C i pažljivim miješanjem umiješati svo vrhnje sa stjenke spremnika. Brzo ohladiti uzorak na 20 – 25 °C. Može se koristiti homogenizator kao pomagalo pri raspršivanju masti.

Ne može se očekivati dobivanje točnih rezultata ukoliko uzorak sadrži odvojenu tekuću mast ili vidljive odvojene bijele čestice nepravilnog oblika koje prijanjaju uza stjenke spremnika.

6. POSTUPAK

6.1. Priprema posuda

Zagrijavati posudu (4.4.) i poklopac tako da se stave u sušionik (4.3.) jedno pokraj drugog, na temperaturi održavanoj na 102 ± 2 °C, barem 30 minuta. Staviti poklopac na zdjelu i odmah je premjestiti u eksikator (4.2.), te pustiti da se ohladi na sobnu temperaturu (odnosno barem 30 minuta) i izmjeriti s točnošću od 0,1 mg.

6.2. Uzorak za analizu

Odmah izmjeriti, s točnošću od 0,1 mg, 3 do 5 g pripremljenog uzorka za analizu (5.) i staviti u pripremljenu posudu (6.1.).

6.3. Određivanje

6.3.1. Predsušiti posudu 30 minuta grijući je na vrućoj vodenoj kupelji (4.5.).

6.3.2. Zagrijavati posudu, s poklopcem pored nje, u sušioniku (4.3.) dva sata na konstantnoj temperaturi od 102 ± 2 °C. Staviti poklopac na posudu i izvaditi je iz sušionika.

6.3.3. Ostaviti posudu u eksikatoru (4.2.) da se ohladi na sobnu temperaturu (odnosno barem 30 minuta) i izmjeriti s točnošću od 0,1 mg.

6.3.4. Ponovno zagrijati posudu, s poklopcem pored nje, u sušioniku (4.3.) jedan sat. Staviti poklopac na zdjelu i izvaditi je iz sušionika. Pustiti je da se u eksikatoru (4.2.) hladi barem 30 minuta i izmjeriti je s točnošću od 0,1 mg.

6.3.5. Ponoviti postupak opisan u točki 6.3.4. dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,5 mg. Zabilježiti najnižu masu.

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

7.1. Izračunavanje i formula

Izračunavanje masenog udjela suhe tvari iz:

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

pri čemu je

W_T = udio ukupne suhe tvari u g na 100 g,

m_0 = masa posude i poklopca (pogledajte 6.1.), u gramima,

m_1 = masa posude, poklopca i uzorka za analizu prije sušenja (pogledajte 6.2.), u gramima,

m_2 = masa posude, poklopca i suhog uzorka za analizu nakon sušenja (pogledajte 6.3.5.), u gramima.

Zaokružiti dobivenu vrijednost s točnošću od 0,01% (maseni udio).

7.2. Preciznost

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

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

II. ODREĐIVANJE UDJELA MASTI

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovim se postupkom opisuje referentna metoda određivanja udjela masti u sirovom mlijeku i punomasnom mlijeku, djelomično obranom mlijeku i obranom mlijeku.

2. DEFINICIJA

Udio masti u mlijeku – je sva tvar određena točno određenom metodom, a izražava se kao maseni udio.

3. NAČELO

Otopina amonijaka i etanola uzorka za analizu ekstrahira se pomoću dietiletera i petroletera, otapala koje se uklanja destilacijom ili isparavanjem, a potom se određuje masa ekstrahirane tvari topive u petroleteru. (Ovaj postupak je poznat kao Roese-Gottliebova metoda).

4. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti priznate analitičke čistoće i ne smiju ostavljati znatne taloge pri slijepoj probi.

Kako bi se provjerila kvaliteta reagensa, treba provesti određivanje opisano u točki 6.3. Koristiti praznu tikvicu, čašu ili metalnu zdjelu (5.8.) za mjerenje, pripremljene u skladu s točkom 6.4., kao taru (kako bi se omogućilo ispravljanje učinka promjena u atmosferskim prilikama na rezultate mjerenja). Ukoliko talog, ispravljen za očitu promjenu mase tare prelazi 2,5 mg, potrebno je odvojeno odrediti talog otapala isparavanjem 100 ml dietiletera (4.4.) i 100 ml petroletera (4.5.), tim redoslijedom. Također koristiti taru za mjerenje. U slučaju da je talog veći od 2,5 mg, potrebno je pročititi otapalo destilacijom ili ga zamijeniti.

4.1. Otopina amonijaka, koja sadrži otprilike 25% (m/m) NH_3 . Može se koristiti i otopina amonijaka veće koncentracije (pogledajte 6.5.1. i A.1.5.1.).

4.2. Etanol, barem 94% (v/v). Etanol razgrađen metanolom može se koristiti ukoliko je sigurno da to ne utječe na rezultate određivanja.

4.3. Otopina kongo crvenila ili krezol crvenila

Otopiti 1 g kongo crvenila ili krezol crvenila u vodi i razvodniti do 100 ml.

Napomena: Korištenje ove otopine, koja omogućava da se lakše vidi granica između sloja otapala i vodenog sloja, nije obavezno (pogledajte 6.5.2.). Mogu se koristiti i druge vodene otopine u boji ukoliko ne utječu na rezultate određivanja.

4.4. Dietileter bez peroksida koji ne sadrži više od 2 mg/kg antioksidansa, i zadovoljava zahtjeve slijepe probe (6.3.).

4.5. Petroleter, s rasponom ključanja između 30 i 60 °C.

4.6. Smjesa otapala, pripravljeno neposredno prije korištenja miješanjem jednakih volumena dietiletera (4.4.) i petroletera (4.5.).

5. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Upozorenje: Budući da određivanje uključuje korištenje hlapljivih i zapaljivih otapala, sva korištena električna oprema mora biti u skladu sa zakonima koji se odnose na korištenje tih otapala.

Uobičajena laboratorijska oprema, a naročito:

5.1. Analitička vaga

5.2. Centrifuga, u kojoj se mogu vrtjeti tikvice ili epruvete za ekstrakciju masti (5.6.) rotacijskom frekvencijom od 500 do 600 okretaja u minuti kako bi se proizvelo gravitacijsko polje od 80 do 90 g na vanjskim krajevima tikvica ili epruveta.

Napomena: Korištenje centrifuge nije obavezno (6.5.5.).

5.3. Destilator ili instrument za isparavanje, kako bi se omogućilo destiliranje otapala i etanola iz tikvica ili isparavanje iz čaša i zdjela (pogledajte 6.5.12. i 6.5.15.) na temperaturi koja ne prelazi 100 °C.

5.4. Sušionik, koja se zagrijava električnim putem, s potpuno otvorenim ventilacijskim otvorom(ima), i u kojem se temperatura može održavati na 102 ± 2 °C na cijelom radnom prostoru. Sušionik bi trebala biti opremljena odgovarajućim termometrom.

5.5. Vodena kupelj, u kojoj se temperatura može održavati na 35 – 45 °C.

5.6. Tikvice za ekstrakciju masti tipa Mojonnier

Napomena: Moguće je koristiti i epruvete za ekstrakciju sifonom ili nastavcima boce štrcaljke, ali u tom slučaju je postupak drugačiji te je naveden u Dodatku.

Tikvice (ili epruvete) moraju imati čepove od brušenog stakla, kvalitetnog pluta ili drugog materijala na koje ne djeluju reagensi koji se koriste. Čepove od pluta treba ekstrahirati dietileterom (4.4.), namakati u vodi pri 60 °C ili najmanje 15 minuta, a nakon toga ostaviti da se ohladi u vodi kako bi ostali zasićeni pri korištenju.

5.7. Stalak, za držanje tikvica (ili epruveta) za ekstrakciju masti (pogledajte 5.6.).

5.8. Boca štrcaljka, za korištenje smjese otapala (4.6.). Ne smije se koristiti plastična boca štrcaljka.

5.9. Posude za sakupljanje masti, npr. tikvice za ključanje (s ravnim dnom), ili Erlenmeyerove tikvice kapaciteta 125 – 250 ml ili metalne posude. Ukoliko se koriste metalne posude, najbolje je da su od nehrđajućeg čelika, s ravnim dnom, po mogućnosti s noscem, i trebaju biti promjera 80 do 100 mm i visine oko 50 mm.

5.10. Pomagala za ključanje, bez masti, od neporoznog porculana ili silicij-karbida ili staklenih kuglica (neobavezno u slučaju metalnih zdjela).

5.11. Menzure, kapaciteta 5 i 25 ml.

5.12. Pipete, s označenom skalom, kapaciteta 10 ml.

5.13. Kliješta, metalna, namijenjena držanju tikvica, čaša ili zdjela.

6. POSTUPAK

Napomena: Druga mogućnost koja je opisana u Dodatku je korištenje epruveta za ekstrakciju masti sa sifonom ili nastavcima boce štrcaljke (pogledajte napomenu pod 5.6.).

6.1. Priprema uzorka za analizu

Prilagoditi temperaturu laboratorijskog uzorka na otprilike 35 – 40 °C 15 minuta, i to pomoću vodene kupelji. Temeljito, ali lagano promiješati uzorak stalnim preokretanjem boce tako da ne nastaje pjena, i brzo ohladiti na otprilike 20 °C.

6.2. Uzorak za analizu

Promiješati uzorak za analizu (6.1.) polaganim preokretanjem boce tri ili četiri puta i odmah izvagati, s točnošću od 1 mg, 10 do 11 g uzorka za analizu, izravno ili na temelju razlike, i prenijeti ga u tikvicu za ekstrakciju (5.6.).

Uzorak za analizu mora u cijelosti biti u donjem (manjem) dijelu tikvice za ekstrakciju.

6.3. Slijepa proba

Provesti slijepu probu istovremeno, i to korištenjem istog postupka i istog reagensa, ali tako da umjesto uzorka za analizu stavimo 10 do 11 ml vode.

Promjena prave mase posude za sakupljanje masti, ispravljena za ukupnu promjenu mase kontrolne posude ne smije prelaziti 2,5 mg.

6.4. Priprema posude za sakupljanje masti

Osušiti posudu (5.9.) zajedno s nekoliko pomagala za ključanje (5.10.) kako bi se potaknulo lagano ključanje tijekom narednog uklanjanja otapala u sušioniku (5.4.) u trajanju od jedan sat. Ostavite posudu da se ohladi (ne u eksikatoru, ali zaštitite od prašine) na sobnoj

temperaturi za mjerenje (staklene posude pustiti da se hlade barem jedan sat, a metalne posude barem 30 minuta). Koristiti kliješta za stavljanje posude na vagu i provedite vaganje s točnošću od 0.1 mg, te pri tome treba izbjegavati promjene temperature.

6.5. Određivanje

6.5.2. Dodati 10 ml etanola (4.2.) i lagano, ali temeljito promiješati dopuštajući da sadržaj tikvice teče naprijed nazad između njena dva dijela; izbjegavati da tekućina dođe preblizu vratu tikvice. Prema želji dodati dvije kapi otopine kongo crvenila ili krezol crvenila (4.3.).

6.5.3. Dodati 25 ml dietiletera (4.4.), zatvoriti tikvicu čepom od pluta zasićenim vodom ili zatvaračem smočenim vodom (pogledajte 5.6.), i tresti tikvicu umjerenom jačinom (kako bi se izbjeglo stvaranje postojanih emulzija) jednu minutu s tikvicom u vodoravnom položaju, tako da manji dio stoji prema gore. Povremeno dopustiti da se tekućina iz većeg dijela pretoči u manji dio. Prema potrebi ohladiti tikvicu u vodi iz slavine, a zatim pažljivo ukloniti čep od pluta ili drugi zatvarač i pomoću boce štrcaljke (5.8.) isprati njega i vrat tikvice s malo smjese otapala (4.6.) tako da isprani sadržaj uđe u tikvicu.

6.5.4. Dodati 25 ml petroletera (4.5.), zatvoriti tikvicu ponovno namočenim čepom od pluta ili drugim zatvaračem (ponovno smočiti uranjanjem u vodu), i lagano tresti tikvicu 30 sekundi kako je opisano u točki 6.5.3.

6.5.5. Centrifugirati zatvorenu tikvicu 1 do 5 minuta rotacijskom brzinom od 500 do 600 okretaja u minuti (5.2.). Ukoliko centrifuga nije na raspolaganju (pogledati napomenu uz 5.2.) ostaviti zatvorenu tikvicu da stoji na stalku (5.7.) barem 30 minuta dok se gornji sloj jasno i vidljivo ne odvoji od vodenog sloja. Prema potrebi ohladiti tikvicu pod tekućom vodom.

6.5.6. Pažljivo ukloniti čep pluta ili drugi zatvarač i isprati ga kao i unutarnju stranu vrata tikvice s malo smjese otapala (4.6.) tako da isprani sadržaj uđe u tikvicu.

Ukoliko se granica nalazi ispod kraja vrata tikvice, isprani sadržaj treba podignuti nešto iznad te razine lagano ulijevajući vodu niz stjenku tikvice tako da se olakša prelijevanje otapala.

6.5.7. Držeći tikvicu za ekstrakciju za manji dio, pažljivo prelići najveću moguću količinu gornjeg sloja u pripremljene posude za sakupljanje masti (6.4.) koje sadrže nekoliko pomagala za ključanje (5.10.) u slučaju tikvica (po izboru s metalnim posudama), izbjegavajući izlijevanje vodenog sloja.

6.5.8. Isprati vanjsku stranu vrata tikvice za ekstrakciju s malo smjese otapala (4.6.), sakupljajući isprani sadržaj u posudu za sakupljanje masti i pazеći da se smjesa otapala ne prelije preko vanjskog dijela tikvice za ekstrakciju.

Prema želji se otapalo ili dio otapala može ukloniti iz posude destilacijom ili isparavanjem kako je opisano u točki 6.5.12.

6.5.9. Dodati 5 ml etanola (4.2.) sadržaju tikvice za ekstrakciju, pri tome koristeći etanol za ispiranje unutrašnjosti vrata tikvice, i promiješati kako je opisano u točki 6.5.2.

6.5.10. Provesti drugu ekstrakciju ponavljanjem radnji opisanih u točkama od 6.5.3. do 6.5.8., ali koristeći samo 15 ml dietiletera (4.4.) i 15 ml petroletera (4.5.); koristiti eter za ispiranje unutrašnjosti vrata tikvice za ekstrakciju. Prema potrebi podignuti granicu na sredinu vrata tikvice kako bi se omogućilo da konačno izlijevanje otapala bude što potpunije.

6.5.11. Provesti treću ekstrakciju daljnjim ponavljanjem radnji opisanih u točkama od 6.5.3. do 6.5.8., ali koristeći samo 15 ml dietil etera (4.4.) i 15 ml petroletera (4.5.); koristiti eter za ispiranje unutrašnjosti vrata tikvice za ekstrakciju. Prema potrebi podignuti granicu na sredinu vrata tikvice kako bi se omogućilo da konačno izlijevanje otapala bude što potpunije.

Treća ekstrakcija se može ispustiti kod obranog mlijeka.

6.5.12. Otapala (uključujući etanol) iz tikvice ukloniti što potpunije postupkom destilacije, ili iz čaše ili zdjele isparavanjem (5.3.), ispirući unutrašnjost vrata tikvice s malo miješanog otapala (4.6.) prije započinjanja destilacije.

6.5.13. Grijati posudu za sakupljanje masti (s tikvicom pored nje kako bi para otapala isparila) jedan sat u sušioniku (5.4.). Ukloniti posudu za sakupljanje masti iz sušionika, ostaviti da se ohladi (ne u eksikatoru, ali zaštitite od prašine) na temperaturu sobe za mjerenje (staklene posude neka stoje barem sat vremena, a metalne posude barem 30 minuta) i izvršiti mjerenje s točnošću od 0,1 mg.

Ne brisati posudu neposredno prije mjerenja. Staviti posudu na vagu korištenjem kliješta i naročito izbjegavati promjene temperature.

6.5.14. Ponavljati radnje opisane u točki 6.5.13. dok se masa posude za sakupljanje masti ne smanji za 0,5 mg ili manje, ili poveća, između dva uzastopna mjerenja. Zabilježiti najmanju izmjerenu masu posude za sakupljanje masti i ekstrahirane tvari.

6.5.15. Dodati 25 ml petroletera u posudu za sakupljanje masti kako bi se provjerilo je li ekstrahirana tvar u potpunosti topljiva. Lagano zagrijati i miješati otapalo dok se sva mast ne otopi.

Ukoliko je ekstrahirana tvar u potpunosti topljiva u petroleteru, uzima se da je masa masti razlika između konačne mase posude koja sadrži ekstrahiranu tvar (6.5.14.) i početne mase.

6.5.16. Ukoliko je ekstrahirana tvar u potpunosti topljiva u petroleteru, ili u slučaju sumnje, u potpunosti ekstrahirati mast iz posude ponavljanjem ispiranjem toplim petroleterom.

Pustiti sve tragove netopljive tvari da se slegnu i pažljivo izliti petroleter bez da se ukloni netopljiva tvar. Ponoviti ovaj postupak još tri puta korištenjem petroletera za ispiranje unutrašnjosti vrata posude.

Na kraju isprati vanjski dio vrha posude smjesom otapala tako da se otapalo ne proširi preko vanjske strane posude. Ukloniti paru petroletera iz posude jednosatnim zagrijavanjem posude u sušioniku, pustiti da se ohladi i izmjeriti, kako je opisano u točkama 6.5.13. i 6.5.14.

Uzeti da je masa masti razlika mase određene u točki 6.5.14. i ove konačne mase.

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

7.1. Izračun i formula

Izračunajte maseni udio masti iz:

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

pri čemu je

F = udio masti,

m_0 = masa uzorka za analizu (6.2.), u gramima,

m_1 = masa posude za sakupljanje masti i ekstrahirane tvari određene u točki 6.5.14., u gramima,

m_2 = masa pripremljene posude za sakupljanje masti ili, u slučaju netopljivog materijala, posude za sakupljanje masti i netopivog taloga određenog u točki 6.5.16., u gramima,

m_3 = masa posude za sakupljanje masti korištene u slijepoj probi (6.3.) i sav ekstrahirani materijal određen u točki 6.5.14., u gramima,

m_4 = masa pripremljene posude za sakupljanje masti (pogledati 6.4.) korištene u slijepoj probi (6.3.) ili, u slučaju netopljivog materijala, posude za sakupljanje masti i netopivog taloga određenog u točki 6.5.16., u gramima.

Prikazati rezultat s točnošću od 0,01 mg.

7.2. Preciznost

7.2.1. Ponovljivost (r):

- za punomasno mlijeko i djelomično obrano mlijeko; 0,02 g masti na 100 g proizvoda,
- za obrano mlijeko: 0,01 g masti na 100 g proizvoda

7.2.2. Obnovljivost (R):

- za punomasno mlijeko: 0,04 g masti na 100 g proizvoda,
- za djelomično obrano mlijeko: 0,03 g masti na 100 g proizvoda,
- za obrano mlijeko: 0,025 g masti na 100 g proizvoda.

III. ODREĐIVANJE UDJELA BEZMASNE SUHE TVARI

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovim se postupkom opisuje referentna metoda za određivanje udjela bezmasne suhe tvari u toplinski obrađenom mlijeku.

2. DEFINICIJA I IZRAČUN

Udio bezmasne suhe tvari izražava se kao maseni udio.

Udio bezmasne suhe tvari – je udio ukupne suhe tvari (pogledati odjeljak I.) umanjen za udio masti (pogledati odjeljak II.).

IV. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNOG DUŠIKA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovim se postupkom opisuje referentna metoda za određivanje udjela ukupnog dušika u sirovom mlijeku i punomasnom mlijeku, djelomično obranom mlijeku i obranom mlijeku.

2. DEFINICIJA

Udio ukupnog dušika u mlijeku – je udio dušika, izražen kao maseni udio, kako je određeno točno opisanom Kjeldahlovom metodom.

3. NAČELO

Izmjerena količinu uzorka mlijeka tretira se koncentriranom sumpornom kiselinom i kalij-sulfatom i bakar(II)-sulfatom kao katalizatorom, kako bi se dušik iz organskih spojeva preveo u amonij-sulfat. Amonijak se oslobađa dodavanjem otopine natrij-hidroksida, a zatim se destilira i apsorbira u otopinu borne kiseline. To se titrira kiselim otopinom.

4. REAGENSI

4.1. Kalij-sulfat (K_2SO_4).

4.2. Otopina bakar-sulfata. Otopiti 5,0 g bakar(II)-sulfata pentahidrata ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) u vodi i razvodniti do 100 ml (na 20°C) u odmjernoj tikvici.

4.3. Sumporna kiselina, barem 98,0 % (m/m) H_2SO_4 .

4.4. Otopina natrij-hidroksida, 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (20°C).

Napomena: može se koristiti i otopina natrij-hidroksida manje koncentracije, npr.: 40 % (m/m) 572 g/l, 20°C ; ili 30 % (m/m) 399 g/l, 20°C .

4.5. Otopina borne kiseline. Otopiti 40 g borne kiseline (H_3BO_3) u jednoj litri vruće vode, ostaviti da se ohladi i spremi u bocu od borosilikatnog stakla.

4.6. Indikatorska otopina. Otopiti 0,01 g crvenog metila, 0,02 g plavog bromtimola i 0,06 g zelenog bromkrezola u 100 ml etanola. Spremiti otopinu u smeđu zatvorenu bocu na hladno i tamno mjesto.

4.7. Volumetrijska otopina

$c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4)$ ili $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ standardizirana s točnošću od 0,0001 mol/l.

4.8. Saharoza bez dušika.

4.9. Amonijeva sol, čista, kao što su amonij-oksalat $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, H_2O ili amonij-sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.10. Triptofan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), fenacetin ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{CH}_2\text{CONH}_2$) ili lizin mono- ili dihidroklorid ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ ili $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$).

Napomena: čistoća reagensa u točkama 4.9. i 4.10. trebala bi biti iznad stupnja »analitičke čistoće«. Ukoliko je na raspolaganju, trebala bi se koristiti certificirana otopinu amonijeve soli (4.9.).

5. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Uobičajena laboratorijska oprema, a naročito:

5.1. Kjeldahlove tikvice kapaciteta 500 ml.

5.2. Odgovarajuća pomagala za ključanje, npr. staklene kuglice promjera oko 5 mm, Hengarove granule, kamen plavac.

5.3. Birete ili automatska pipeta, za doziranje 1,0 ml.

5.4. Menzure s označenim skalama, staklene, kapaciteta 50, 100 i 250 ml.

5.5. Digestor u nagnutom položaju (oko 45°), s električnim grijačima ili plinskim plamenicima koji ne zagrijavaju tikvicu iznad razine njenog sadržaja, sa sustavom za ekstrahiranje dima.

5.6. Destilator, izrađen od borosilikatnog stakla, na koji se može spojiti Kjeldahlovu tikvicu (5.1.) i koji se sastoji od učinkovite glave štrcaljke povezane s učinkovitim hladilom s ravnom unutarnjom cijevi i odvodnom cijevi povezanom s njegovim donjim završetkom; povezne cijevi i zatvarač(i) moraju dobro prijanjati i po mogućnosti biti od neoprenske gume.

5.7. Pipeta ili automatska pipeta, za 0,1 ml.

5.8. Čunjaste tikvice, kapaciteta 500 ml, građirane na 200 ml.

5.9. Bireta kapaciteta 50 ml, građirana na 0,1 ml, s maksimalnom mogućnošću pogreške $\pm 0,05 \text{ ml}$.

5.10. Povećalo, za očitavanje birete (5.9.).

5.11. pH-metar

5.12. Automatska bireta.

6. POSTUPAK

6.1. Dodati pomagala za ključanje (5.2.) (npr. tri staklene kuglice) u Kjeldahlovu tikvicu (5.1.), 15 g kalij-sulfata (4.1.), 1,0 ml otopine bakar-sulfata (4.2.), otprilike 5 g uzorka mlijeka (izmjenjenog s točnošću od 0,001 g) i 25 ml sumporne kiseline (4.3.). Koristiti kiselinu za ispiranje otopine bakar-sulfata, kalij-sulfata ili mlijeka na vratu tikvice, i lagano promiješati sadržaj tikvice.

Napomena: Budući da organska tvar troši sumpornu kiselinu tijekom ključanja, za razgradnju umjesto 25 ml koristi se 30 ml H_2SO_4 (4.3.) ukoliko mlijeko sadrži više od 5,0 % (m/m) masti. Isto bi trebalo učiniti i u slijepoj probi.

6.2. Zagrijte svaku Kjeldahlovu tikvicu u digestoru (5.5.), u početku vrlo polako tako da crna pjena ostane unutar trbušastog dijela tikvice. Kada prestane početno pjenjenje i pojavi se obilna bijela para, snažno prokuhajte (kisela para će se kondenzirati kada dođe na pola puta do vrha vrata tikvice) dok ne nestanu sve crne čestice i dok sadržaj tikvice ne bude jasno blijede plavo-zelene boje. Tada lagano kuhajte barem 1,5 sat. Primiti na znanje sljedeće:

(a) ne bi trebalo proteći više od 1 sata da sadržaj tikvice postane bistar, a razgradnja ukupno ne bi trebala trajati ispod 2,5 sata. Ukoliko je potrebno više od jednog sata za razbistravanje, ukupno trajanje razgradnje treba se povećati sukladno tome.

(b) dodani kalij-sulfat potiče razgradnju budući da podiže temperaturu ključanja smjese. Ukoliko je preostali volumen H_2SO_4 manji od otprilike 15 ml na kraju razgradnje, dušik je možda izgubljen zbog prekomjernog zagrijavanja. Kod plinskog grijanja trebete zagrijati tikvicu na ploči od toplinski izolacijskog materijala, s kružnim otvorom takvog promjera da slobodni plamen samo dodiruje dio tikvice koja je ispod površine tekućeg sadržaja (5.5.).

(c) ukoliko crne čestice uđu u vrat tikvice i ne spere ih se u potpunosti u trbuh tikvice kretanjem kiseline u početnim fazama razdoblja snažnog zagrijavanja (to bi se moglo olakšati okretanjem tikvice) treba pustiti da se tikvica dovoljno ohladi i pažljivo je isprati minimalnom količinom vode. Zatim nastaviti razgradnju kako je gore opisano.

6.3. Kada se Kjeldahlove tikvice u potpunosti ohlade, dodati 300 ml vode (pogledati napomenu) u svaku tako da se pažljivo ispere vrat tikvice, i temeljito promiješati sadržaj pazeći na to da se kristali koji su se odvojili otope. Dodati pomagala za ključanje (5.2.) kako bi se osiguralo jednolično ključanje. Zatim u svaku tikvicu dodati 70 ml otopine natrij-hidroksida (4.4.) (pogledati napomenu) lagano ulijevajući otopinu kroz nakošeni vrat tikvice da se stvori donji sloj u trbušastom dijelu; ne moćiti vrh vrata otopinom natrij-hidroksida. Napomena: Potrebno je da zajednički volumen vode i otopine natrij-hidroksida iznosi 370 ml kako bi se omogućilo sakupljanje oko 150 ml destilata upravo prije nego što uslijedi neujednačeno ključanje. Stoga, ako se doda veći odgovarajući volumen otopine natrij-hidroksida koncentracije manje od 47 % (m/m), volumen dodane vode smanjit će se prema tome. Na primjer, ukoliko se doda 85 ml od 40 % (m/m) ili 125 ml od 30 % (m/m) otopine natrij-hidroksida, volumen dodane vode iznositi će 285 ml ili 245 ml.

6.4. Odmah spojiti svaku Kjeldahlovu tikvicu na destilator (5.6.). Pobrinite se da vrh odvodne cijevi hladila bude uronjen u 50 ml borne kiseline (4.5.) zajedno s 0,20 ml (5 – 6 kapi) indikatorske otopine (4.6.) u čunjastoj tikvici (5.8.). Zavrtiti sadržaj svake Kjeldahlove tikvice kako bi se temeljito promiješao i zakuhao, ali u početku lagano kako bi se spriječilo pretjerano pjenjenje. Nakon što se sakupi 100 do 125 ml destilata, spuštati svaku čunjastu tikvicu dok se vršak odvodne cijevi hladila ne nađe na otprilike 40 mm iznad oznake za 200 ml. Nastaviti sa svakom pojedinačnom destilacijom dok ne počne neujednačeno ključanje, a zatim odmah prestati sa zagrijavanjem. Odvojiti sve Kjeldahlove hlove tikvice vrh odvodnih cijevi hladila pomoću malo vode, sakupljajući isprani sadržaj u čunjastu tikvicu. Treba znati sljedeće:

(a) Stupanj destilacije mora biti takav da se otprilike 150 ml destilata sakupi kada započne neujednačeno ključanje, a volumen sadržaja svake čunjaste tikvice tada će iznositi otprilike 200 ml.

(b) Učinkovitost svakog hladila trebala bi biti takva da temperatura sadržaja svake čunjaste tikvice ne prelazi 25 °C tijekom destilacije.

6.5. Titrirati svaki destilat sa standardnom volumetrijskom otopinom (4.7.) dok pH ne bude $4,6 \pm 0,1$, i pri tome koristiti pH-metar i po želji automatsku biretu. Dodavanje indikatora pomaže pri provjeravanju pravilnog tijeka titracije. Očitati vrijednosti na bireti s točnošću od

0,1 ml pomoću povećala (5.10.) izbjegavajući greške vezane za menisk.

Titriranje se može provesti samo s indikatorom. Potrebno je titrirati dok boja destilata ne postane jednaka boji prethodno pripremljene otopine od 150 ml vode u koju je dodano 50 ml otopine borne kiseline i 0,20 ml indikatora sadržanog u čunjastoj tikvici (5.8.).

6.6. Provesti slijepu probu u skladu s točkama od 6.1. do 6.5., i umjesto uzorka mlijeka za postupak uzeti 5 ml destilirane vode i otprilike 0,1 g saharoze (4.8.).

Napomena: Za titraciju slijepog destilata potreban je mali volumen standardne volumetrijske otopine (4.7.).

6.7. Redovito provjeravati ispravnost postupka korištenjem dva rekuperacijska pokusa prateći postupak opisan u točkama od 6.1. do 6.5.

6.7.1. Provjeriti dolazi li do gubitka dušika zbog prekomjernog zagrijavanja ili mehaničkih curenja tijekom destilacije, i to korištenjem uzorka za analizu od 0,15 g amonij-oksalata ili sulfata (4.9.) izmjenjenog s točnošću od 0,001 g i 0,1 g saharoze (4.8.).

Postotak rekuperiranog dušika mora iznositi između 99,0% i 100,0 %.

Niži ili viši rezultati ukazuju na propuste u postupku i/ili netočnost koncentracije standardnih otopina (4.7.).

6.7.2. Provjeriti je li postupak razgradnje dovoljan za oslobađanje ukupnog proteinskog dušika korištenjem uzorka za analizu od 0,20 g čistog triptofana, 0,35 g fenacetina ili 0,20 g lizin hidroklorida (4.10.). Sva mjerenja trebala bi biti provedena s točnošću od 0,001 g.

Najmanje 98 – 99 % dušika trebalo bi biti rekuperirano.

7. SIGURNOSNE MJERE

Pri radu s koncentriranom sumpornom kiselinom i natrij-hidroksidom i kada se rukuje Kjeldahlovim tikvicama, uvijek nositi laboratorijsku kutu, zaštitne naočale i rukavice otporne na kiselinu.

Nikad ne ostavljati Kjeldahlove tikvice bez nadzora tijekom destilacije. Zbog potencijalne opasnosti odmah zaustaviti destilaciju ukoliko sadržaj tikvice ključa prejako. Ukoliko je struja isključena više od dvije do tri minute, spustiti tikvicu za sakupljanje tako da destilacijski vršak bude izvan tekućine.

8. IZRAŽAVANJE REZULTATA

8.1. Izračun i formula:

Izračunajte udio dušika (W_N), izraženo u gramima dušika na 100 g proizvoda sljedećom formulom:

$$W_N = \frac{1,40(V - V_0)c}{m}$$

Pri čemu je:

W_N = udio dušika,

V = volumen standardne volumetrijske otopine kiseline korištene pri određivanju, u mililitrima,

V_0 = volumen standardne volumetrijske otopine kiseline korištene u slijepoj probi, u mililitrima,

c = koncentracija, izražena u molima po litri standardne volumetrijske otopine kiseline (4.7.),

m = masa uzorka za analizu u gramima.

Zaokružiti rezultat na 0,001 g na 100 g.

8.2. Preciznost

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

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

9. IZMJENE POSTUPAKA

9.1. Koristiti aparaturu za razgradnju s cilindričnim tikvicama, umjesto digestora i Kjeldahlovih tikvica opisanih u točkama 5.5. i 5.1. U tom slučaju svaki uređaj treba zasebno provjeriti kako bi se utvrdile potencijalne nepravilnosti (6.7.).

9.2. Koristiti parnu destilaciju umjesto izravnog zagrijavanja tikvica (6.4.). Kada instrument ne dopušta korištenje destilirane vode, treba obratiti pozornost na to sadrži li voda hlapljive kiseline ili baze.

9.3. Uzorak za analizu od 1 g mlijeka (semi-makro Kjeldahl) može se koristiti umjesto 5 g (6.1.) ukoliko:

- se količine reagensa korištenog za mineralizaciju (6.1.): H_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 , smanje u istom omjeru (1/5).

- se ukupno trajanje razgradnje (6.2.) smanji na 75 minuta.

- se količina otopina natrij-hidroksida (6.3.) smanji u istom omjeru (1/5).

- se mora koristiti standardna kiselina otopina (4.7.) niže koncentracije (0,02 do 0,03 mol/l).

Napomena: Korištenje jedne ili više od ovih mogućnosti prihvatljivo je samo ukoliko su vrijednost ponovljivosti (8.2.1.) i rezultati dvije provjere točnosti (6.7.) u skladu s uvjetima propisanim ovom metodom.

V. ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovim se postupkom opisuje referentna metoda za određivanje udjela proteina u toplinski obrađenom mlijeku.

Na tržište Republike Hrvatske može se stavljati samo ono toplinski obrađeno kravlje mlijeko namijenjeno za prehranu ljudi koje udovoljava zahtjevu da mu je točka smrzavanja najviše - 0,520 °C i masa najmanje 1028 grama po litri, ako se određuje u punomasnom mlijeku pri 20 °C ili ekvivalentne vrijednosti ako se određuje u potpuno obranom mlijeku pri 20 °C, te da sadrži najmanje 28 grama proteina po litri, izračunato množenjem udjela ukupnog dušika u mlijeku sa 6,38, a udio bezmasne suhe tvari najmanje 8,50%.

Točka smrzavanja veća od -0,520 °C bit će prihvatljiva pod uvjetom da službene kontrole pokazuju da u mlijeku nema dodane vode odnosno da sirovo mlijeko udovoljava odredbama Pravilnika o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (»Narodne novine« br. 102/2000)2.

2. DEFINICIJA

Udio proteina – je vrijednost koja se dobije množenjem udjela ukupnog dušika, izraženog kao maseni udio, određenog metodom opisanom u odjeljku IV. stavku 3., s odgovarajućim faktorom (3.).

3. IZRAČUN

Udio proteina u mlijeku kao maseni udio = 6,38 x udio ukupnog dušika N u mlijeku %.

VI. ODREĐIVANJE SPECIFIČNE MASE

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovim se postupkom opisuje referentna metoda određivanja specifične mase sirovog mlijeka i punomasnog mlijeka, djelomično obranog mlijeka i obranog mlijeka na 20 °C.

2. DEFINICIJA

Specifična masa mlijeka je omjer mase određenog volumena mlijeka na 20 °C i mase istog volumena vode na 20 °C.

3. NAČELO

Specifična masa na 20 °C određuje se hidrometrom.

4. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Uobičajena laboratorijska oprema, a naročito:

4.1. Laktodenzimetar

Specifični gravitacijski laktodenzimetar je instrument koji se sastoji od staklenog plovka koji je u svom donjem dijelu širok i težak. Cilindrična staklena cjevčica je spojena na gornji kraj plovka te je usporedna s njim; gornji dio cjevčice je zatvoren.

Stakleni plovak sadrži teret (olovo, živa, itd.) namijenjen prilagođavanju mase hidrometra. Cjevčica ima skalu od 1,025 do 1,035 g/ml.

Laktodenzimetar bi trebalo provjeriti piknometrijskom metodom, korištenjem piknometra kapaciteta oko 100 ml koji je opremljen termometrom za mjerenje preciznosti.

4.2. Cilindri (stakleni ili od nehrđajućeg čelika).

Njihove minimalne dimenzije trebale bi biti sljedeće:

- unutarnji promjer otprilike 35 mm
- unutarnja visina otprilike 225 mm.

4.3. Vodena kupelj regulirana na $20 \pm 0,01$ °C.

4.4. Vopelj regulirana na 40 ± 2 °C.

4.5. Termometar, s označenom skalom podijeljenom na 0,5 °C.

5. POSTUPAK

5.1. Promiješati uzorak preokretanjem kako bi se raspršila mast i te isti staviti u vodenu kupelj na 40 °C (4.4.). Pustiti da uzorak dosegne temperaturu od 40 °C i održavati tu temperaturu pet minuta. Temeljito promiješati laganim preokretanjem kako bi se mast ravnomjerno rasporedila uz izbjegavanje nastanka pjene. Uzorak ohladiti na 20 °C u drugoj vodenoj kupelji (4.3.).

5.2. Temeljito promiješati uzorak laganim preokretanjem kako bi se izbjeglo stvaranje pjene. Uliti mlijeko u cilindar (4.2.) koji se mora držati nagnutim kako bi se izbjeglo stvaranje pjene. Koristiti dostatnu količinu uzorka mlijeka kako bi bili sigurni da će se dio preliti iz cilindra kada se u uzorak uroni laktodenzimetar (4.1.). Pažljivo spustiti laktodenzimetar u mlijeko i pustiti ga da slobodno pluta dok ne postigne ravnotežu. Cilindar treba položiti okomito. Laktodenzimetar treba biti namješten u sredini stupca tekućine i ne bi trebao dodirivati stranice cilindra.

5.3. Kada se laktodenzimetar umiri očitati oznaku na vrhu meniskusa.

5.4. Odmah nakon što se izvrši očitavanje na hidrometru staviti termometar (4.5.) u uzorak i očitati temperaturu s točnošću od 0,5 °C. Temperatura ne smije odstupati više od 2 °C od 20 °C.

6. ISPRAVAK TEMPERATURE

6.1. Ukoliko temperatura uzorka mlijeka ne iznosi točno 20 °C pri mjerenju specifične mase, onda se dobiveni rezultat mora ispraviti dodavanjem određenoj specifičnoj masi 0,0002 za svaki stupanj celzija iznad 20 °C, ili oduzimanjem 0,0002 za svaki stupanj celzija ispod 20 °C. Ovaj ispravak provodi se samo ukoliko temperatura uzorka mlijeka odstupa do 5 °C od 20 °C.

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Metoda izračuna i formula: specifična masa uzorka izražava se u g/ml obranog mlijeka na 20 °C u skladu sa sljedećom formulom:

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

pri čemu je

mv = specifična masa uzorka očitana na hidrometru (5.4.) u g/l

MG = udio masti u uzorku u g/l

0,92 = gustoća masti.

8. PRECIZNOST

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

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

DODATAK (Prilogu II.)

ALTERNATIVNI POSTUPAK KOJI UKLJUČUJE KORIŠTENJE EPRUVETA ZA EKSTRAKCIJU MASTI SA SIFONOM ILI NASTAVKOM BOCE ŠTRCALJKE

A.1. POSTUPAK

A.1.1. Priprema uzorka za analizu

Pogledati 6.1.

A.1.2. Uzorak za analizu

Učiniti kako je navedeno pod 6.2., ali pri tome koristite epruvete za ekstrakciju masti (pogledati 5.6.).

Uzorak za analizu treba u potpunosti postaviti na dno epruvete za ekstrakciju.

A.1.3. Slijepa proba

Pogledati 6.3.

A.1.4. Priprema posude za sakupljanje masti

Pogledati 6.4.

A.1.5. Određivanje

A.1.5.1. Dodati 2 ml otopine amonijaka (4.1.), ili jednaki volumen otopine amonijaka veće koncentracije, i temeljito promiješati s prethodno pripremljenim uzorkom za analizu na dnu epruvete. Nakon dodavanja amonijaka, provesti analizu bez odgađanja.

A.1.5.2. Dodati 10 ml etanola (4.2.) i lagano, ali temeljito promiješati na dnu epruvete. Po želji dodati dvije kapi otopine kongo crvenila ili krezol crvenila (4.3.).

A.1.5.3. Dodati 25 ml dietiletera (4.4.), zatvoriti epruvetu plutenim čepom zasićenim vodom ili zatvaračem natopljenim vodom (5.6.), i snažnije tresti epruvetu (kako bi se izbjeglo nastajanje postojećih emulzija) i preokretati je jednu minutu. Ukoliko je to potrebno, ohladiti epruvetu u tekućoj vodi, a zatim pažljivo odstraniti čep od pluta ili drugi zatvarač i isprati čep i vrat epruvete s malo smjese otapala (4.6.) korištenjem boce štrcaljke (5.8.) tako da isprani sadržaj uđe u epruvetu.

A.1.5.4. Dodati 25 ml petroletera (4.5.), zatvoriti epruvetu s ponovno natopljenim plutenim čepom ili drugim zatvaračem (ponovno ga natopiti uranjanjem u vodu), i lagano tresti epruvetu 30 sekundi kako je opisano u točki A.1.5.3.

A.1.5.5. Centrifugirati zatvorenu epruvetu jednu do pet minuta s rotacijskom frekvencijom od 500 do 600 okretaja na minutu (5.2.). Ukoliko centrifuga nije na raspolaganju (pogledati napomenu pod 5.2.), pustiti zatvorenu epruvetu da stoji u stalku (5.7.) barem 30 minuta, dok gornji sloj ne postane bistar i jasno odvojen od vodenog sloja. Prema potrebi ohladiti epruvetu pod tekućom vodom.

A.1.5.6. Pažljivo odstraniti pluteni čep ili drugi zatvarač i isprati čep i vrat epruvete s malo smjese otapala tako da isprani sadržaj uđe u epruvetu.

A.1.5.7. Umetnuti sifonski nastavak ili nastavak boce štrcaljke u epruvetu i gurnuti prema dolje dugi unutarnji krak nastavka dok dovod ne bude otprilike 3 mm iznad granice između slojeva. Unutarnji krak nastavka treba biti paralelan s osi epruvete za ekstrakciju.

Pažljivo preliti gornji sloj iz epruvete u pripremljenu posudu za sakupljanje masti (6.4.) koja sadrži nekoliko pomagala za ključanje (5.10.) u slučaju tikvica (neobavezno s metalnim zdjelama), izbjegavajući da se pri tome prenese dio vodenog sloja. Isprati odvod nastavka s malo smjese otapala, sakupljajući isprani sadržaj u posudu za sakupljanje masti.

A.1.5.8. Otpustiti nastavak iz vrata epruvete, lagano podignuti nastavak i isprati donji dio njegovog duljeg unutarnjeg kraka s malo smjese otapala. Spustiti i ponovno umetnuti nastavak pa prenijeti isprani sadržaj u posudu za sakupljanje masti.

Isprati odvod nastavka s malo smjese otapala, sakupljajući isprani sadržaj u posudi. Po želji se otapalo ili dio otapala mogu ukloniti iz posude destilacijom ili isparavanjem, kako je opisano u točki 6.5.12.

A.1.5.9. Ponovno otpustiti nastavak iz vrata, polako podignuti nastavak i dodajte 5 ml etanola sadržaju epruvete, koristeći etanol za ispiranje dugog unutarnjeg kraka nastavka; promiješati kako je opisano u točki A.1.5.2.

A.1.5.10. Provesti drugu ekstrakciju ponavljanjem postupka opisanog u točkama od A.1.5.3. do A.1.5.8., ali pri tome koristiti samo 15 ml dietiletera (4.4.) i 15 ml petroletera (4.5.). Upotrijebiti eter za ispiranje dugog unutarnjeg kraka nastavka dok se uklanja nastavak iz epruvete nakon prethodne ekstrakcije.

A.1.5.11. Provesti treću ekstrakciju ponovnim ponavljanjem postupka opisanog u točkama od A.1.5.3. do A.1.5.8., koristeći 15 ml dietiletera i 15 ml petroletera i ispirući dugi unutarnji krak nastavka u skladu s točkom A.15.10.

Treća ekstrakcija se možete izostaviti kod obranog mlijeka.

A.1.5.12. Postupiti kako je opisano u točkama od 6.5.12. do 6.5.16.