

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

2832

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 UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA I MLIJEKA U PRAHU NAMIJENJENIH ZA KONZUMACIJU^[1]

I. OPĆE ODREDBE

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom propisuju metode uzorkovanja i analiza ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu.

Članak 2.

Metode uzorkovanja ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu propisane su u Prilogu 1. ovoga Pravilnika.

Članak 3.

Metode analiza ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu 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 metodama kemijskih i fizikalnih analiza mlijeka i mliječnih proizvoda (»Narodne novine« 53/91, 158/03).

Članak 6.

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

Klasa: NP 011-02/09-01/145

Urbroj: 525-13-2-0495/09-21

Zagreb, 9. rujna 2009.

Ministar:
Petar
Čobanković, v. r.

PRILOG 1.

I. METODE UZORKOVANJA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA I MLIJEKA U PRAHU ZA KEMIJSKE ANALIZE

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 prikladnog materijala odgovarajuće 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. Spremnici za uzorkovanje

Spremnici 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 ili ispitivanja. Prikladni materijali uključuju staklo, neke metale i neke vrste plastike. Spremnici bi po mogućnosti trebali biti neprozirni. Ukoliko su prozirni ili propuštaju svjetlost, spremnici sa sadržajem moraju se pohraniti na tamnom mjestu.

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

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

Svi spremnici, osim plastičnih vrećica, moraju biti čvrsto zatvoreni ili prikladnim čepom ili metalnim ili plastičnim poklopcem s navojima, po potrebi s hermetičkim 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

Spremnici za uzorke moraju se zatvoriti odmah nakon uzorkovanja.

8. Pohranjivanje uzoraka

Preporučene temperature za pohranjivanje uzoraka ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i mlijeka u prahu ne smiju biti veće od 25°C. Vrijeme pohrane uzoraka prije analize uvjetovano je temperaturom na kojoj su uzorci pohranjeni.

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 zaštititi uzorke od izlaganja stranim mirisima koji mogu kontaminirati uzorke, izlaganja direktnoj sunčevoj svjetlosti te izlaganja temperaturama većim od 25°C.

II. METODA UZORKOVANJA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLJEKA

1. Opseg i područje primjene

- ugušćeno (kondenzirano) ekstra-masno mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) mlijeko,

- ugušćeno (kondenzirano) djelomično obrano mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) obrano mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno djelomično obrano mlijeko,
- ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno obrano mlijeko.

2. Oprema

2.1. Općenito

Vidjeti točku 5. Poglavlja I. ovoga Priloga.

2.2. Klipovi i mješalice

Klipovi ili mješalice, za miješanje tekućina u velikim spremnicima, moraju imati dovoljno veliku površinu kako bi izazvali odgovarajuće miješanje proizvoda bez pojave užeglog okusa. Obzirom na različite oblike i veličine spremnika, ne može se preporučiti određeni oblik klipova za sve namjene, ali klipovi moraju biti oblikovani na način da se izbjegne grebanje unutarnje površine spremnika tijekom miješanja. Prikladan materijal opisan je u točki 5. Poglavlja I. ovoga Priloga.

Oblik prikladnog klipa preporučenog za miješanje tekućina u kantama ili limenkama ima sljedeće dimenzije (Slika 1.): disk promjera 150 mm na kojem je, u krugu promjera 100 mm, probušeno 6 rupa promjera 12,5 mm. Sredina diska pričvršćena je na metalnu šipku, čiji je drugi kraj ručke u obliku petlje. Duljina šipke, uključujući ručku, mora iznositi otprilike 1 m.

Prikladan klip za upotrebu u malim spremnicima ima sljedeće približne dimenzije (Slika 2.): šipka duljine ne manje od 2 m, s diskom promjera 300 mm na kojem je, u krugu promjera 230 mm probušeno 12 rupa promjera 30 mm.

Za miješanje sadržaja velikih spremnika preporuča se mehaničko miješanje ili miješanje čistim komprimiranim zrakom. Tijekom miješanja potrebno je osigurati da su tlak i volumen zraka minimalni radi sprječavanja pojave užeglog okusa.

Napomena:

Kada je odredbama ovoga Pravilnika propisana upotreba »čistog komprimiranog zraka«, potrebno je upotrebljavati komprimirani zrak iz kojega su uklonjeni svi kontaminanti (uključujući ulje, vodu i prašinu).

2.3. Mješalice

Širokih oštih rubova, dovoljne duljine da dopire do dna spremnika u kojem je proizvod pohranjen, jednog ruba oblikovanog po mogućnosti tako da odgovara obliku spremnika (vidjeti sliku 3.).

2.4. Zaimače

Zaimača veličine i oblika prikladnih za uzimanje uzorka, grafički je prikazana na Slici 4. Zaimača mora imati čvrstu ručku duljine najmanje 150 mm. Kapacitet zaimače ne smije biti manji od 50 mL. Prednost je ukoliko je ručka savijena. Stožasti oblik šalice omogućuje dobro polaganje zaimača.

Alternativno se može upotrijebiti zaimača podjednagog kapaciteta, ali usporednih strana raspodijeljenih u pet jednakih odsječaka, čime se olakšava uzorkovanje međusobno razmjernih količina pošiljaka pohranjenih u više spremnika.

2.5. Šipka

Okrugla, duljine približno 1 m i promjera 35 mm.

2.6. Spremnici

Za poduzorkovanje kapaciteta 5 L, sa širokim otvorom.

2.7. Žlica ili spatula širokih oštih rubova

2.8. Spremnici za uzorke

Vidjeti točku 6. Poglavlja I. ovoga Priloga.

3. Postupak

3.1. Uzorkovanje ugušćenog (kondenziranog) mlijeka

Masa uzorka ne smije biti manja od 200 g.

3.1.1. Proizvod temeljito promiješati klipom ili miješalicom, ili mehaničkim miješanjem, ili prelijevanjem iz jednog spremnika u drugi, ili upotrebom čistog komprimiranog zraka (vidjeti napomenu pod točkom 2.2.), dok proizvod ne postane dovoljno homogen.

Zaimačom uzeti uzorak odmah nakon miješanja. Ukoliko postizanje odgovarajuće homogenosti predstavlja problem, uzorke uzeti iz različitih dijelova spremnika u kojem je proizvod pohranjen, do ukupne mase najmanje 200 grama. (Ukoliko uzorak predstavlja smjesu poduzoraka, to je potrebno istaknuti na etiketi uzorka i u popratnom dokumentu).

3.1.2. Uzorkovanje malih pretpakovina namijenjenih za maloprodaju

Neoštećena i neotvorena pretpakovina može predstavljati uzorak. Jedna ili više pretpakovina iz iste serije ili lota može se uzeti kao uzorak na način da ukupna količina uzorka nije manja od 200 g.

3.2. Uzorkovanje ugušćenog (kondenziranog) zaslađenog mlijeka

3.2.1. Općenito

Uzorkovanje iz spremnika u kojima su pohranjene velike količine ugušćenog (kondenziranog) mlijeka može biti iznimno teško, osobito kada proizvod nije dovoljno homogeniziran i kada je jako viskozan. Probleme pri uzorkovanju može prouzročiti prisutnost velikih kristala saharoze ili laktoze ili taloženje različitih soli unutar proizvoda ili na stijenkama spremnika, a uzrok problema može biti i zgrušana tvar. Ovakve okolnosti utvrdit će se kada se šipka uroni u spremnik u kojem je proizvod pohranjen i izvadi nakon što je ispitana što je moguće veća dodirna površina. Ukoliko kristali šećera nisu veći od 6 mm, oni pri uzorkovanju ne bi smjeli uzrokovati poteškoće. Ukoliko proizvod nije homogeniziran, tu činjenicu treba istaknuti na etiketi uzorka i u popratnom dokumentu. Kako se ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno mlijeko često pohranjuje na sobnoj temperaturi, za dobivanje reprezentativnog uzorka preporuča se uzorkovani sadržaj zagrijati na temperaturu od najmanje 20°C.

3.2.2. Postupak

Masa uzorka ne smije biti manja od 200 g.

– otvoreni spremnici

Prethodno temeljito očišćen i osušen poklopac otvoriti samo na jednom kraju kako bi se spriječilo da u sadržaj upadne strana tvar. Sadržaj spremnika promiješati pomoću miješalice (Slika 3.) Stijenke i dno spremnika treba sastrugati lopaticom, kako bi se odstranio onaj dio proizvoda koji je na njih prionuo. Sadržaj spremnika temeljito promiješati kombinacijom kružnih i okomitih pokreta, pomoću miješalice usmjerene dijagonalno, pri čemu treba paziti da u uzorak ne uđe zrak. Miješalicu potom izvaditi, a ugušćeno (kondenzirano) mlijeko koje na nju prijanja lopaticom ili žlicom prebaciti u spremnik kapaciteta 5 L (2.6.). Miješanje i vađenje miješalice je potrebno ponavljati sve dok se ne prikupi 2 do 3 L sadržaja. Ovu količinu treba miješati sve dok ne postane homogena, a potom uzeti uzorak od najmanje 200 grama.

– zatvorene metalne bačve, začepljene na kraju ili postrance

Iz razloga opisanih u točki 3.2.1., uzorkovanje kroz rupu predviđenu za čep prikladno je samo ukoliko se radi o ugušćenom (kondenziranom) mlijeku koje lagano teče i koje je ujednačene konzistencije. Sadržaj treba izmiješati uvođenjem šipke kroz rupu predviđenu za čep, koju se nakon ispitivanja dodirne površine i miješanja u svim smjerovima koliko je moguće, izvuče i potom uzorak pripremi na način opisan u točki 3.2.1. Alternativno se može dopustiti da sadržaj istječe u prikladni spremnik, pri čemu se treba pobrinuti da iz metalne bačve isteče što je moguće više njezinog sadržaja. Nakon miješanja miješalicom, uzorak se uzima kako je opisano u točki 3.2.1.

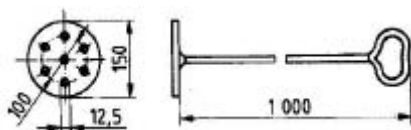
3.2.3. Uzorkovanje malih pretpakovina namijenjenih za maloprodaju

Neoštećena i neotvorena pretpakovina može predstavljati uzorak. Jedna ili više pretpakovina iz iste serije ili lota može se uzeti kao uzorak na način da ukupna količina uzorka nije manja od 200 g.

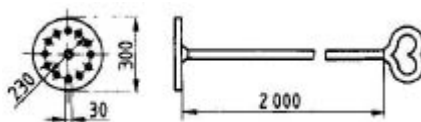
3.3. *Zaštita, čuvanje i prijevoz uzoraka*

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

Slika 1. PREPORUČENI KLIP ZA LIMENKE I KANTE
(dimenzije u mm)



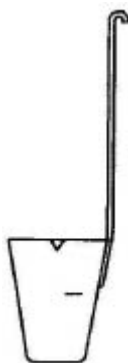
Slika 2. PREPORUČENI KLIP ZA MALE SPREMNIKE
(dimenzije u mm)



Slika 3. MIJEŠALICA PRIKLADNA ZA MIJEŠANJE UGUŠĆENOG
(KONDENZIRANOG) ZASLAĐENOG MLIJEKA



Slika 4. ZAIMAČA PRIKLADNA ZA TEKUĆINE (kapaciteta većeg od 50 mL, s ručkom
duljine najmanje 150 mm)



III. METODA UZORKOVANJA MLIJEKA U PRAHU

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom opisuje uzorkovanje za kemijske analize:

- punomasnog mlijeka u prahu,
- obranog mlijeka u prahu,

- djelomično obranog mlijeka u prahu,
- ekstra-masnog mlijeka u prahu.

2. Oprema

Vidjeti točku 5. Poglavlja I. ovoga Priloga.

2.1. Sonde dovoljne duljine da mogu dosegnuti dno spremnika s proizvodom.

Prikladne su sonde koje udovoljavaju zahtjevima iz Poglavlja IV. ovoga Priloga.

2.2. Lopatica, žlica ili spatula širokih oštih rubova.

2.3. Spremnici za uzorke

Vidjeti točku 6. Poglavlja I. ovoga Priloga.

3. Postupak

3.1. Općenito

Tijekom ili neposredno prije uzimanja uzoraka za analizu mogućnost apsorpcije vlage iz zraka potrebno je svesti na minimum. Nakon uzorkovanja spremnik ponovno čvrsto zatvoriti.

3.2. 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, spremnik nagnut ili položen na jednu stranu. Otvor okrenuti prema dolje i upotrijebiti ravnomjernu silu prodiranja. Kada dosegne dno spremnika, sondu rotirati za 180°, izvući sadržaj i isprazniti u spremnik za uzorke. Ponoviti onoliko puta koliko je potrebno da se dobije uzorak mase najmanje 200 g. Spremnik za uzorke zatvoriti odmah nakon završenog uzorkovanja.

3.2.1. Uzorkovanje malih pretpakovina namijenjenih za maloprodaju

Neoštećena i neotvorena pretpakovina može predstavljati uzorak. Jedna ili više pretpakovina iz iste serije ili lota može se uzeti kao uzorak na način da ukupna količina uzorka nije manja od 200 g.

Napomena:

Kod proizvoda označenih oznakom »instant«, cijela neotvorena pretpakovina predstavlja uzorak.

3.3. Zaštita, čuvanje i prijevoz uzoraka

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

IV. SONDE ZA UZORKOVANJE MLIJEKA U PRAHU IZ VELIKIH SPREMNIKA

1. Vrste sonda

a) Tip A: duga (Slika 5.)

b) Tip B: kratka (Slika 6.)

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 biti takvi da omogućavaju 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 %):

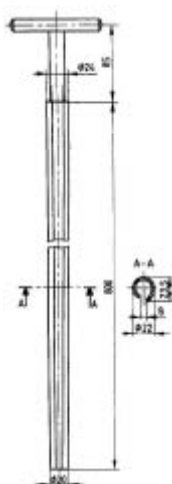
	Tip A	Tip B
	duga	kratka
Duljina oštrice	800 mm	400 mm
Debljina metala oštrice	1 do 2 mm	1 do 2 mm
Unutarnji promjer oštrice kod šiljka	18 mm	32 mm
Unutarnji promjer oštrice kod drška ili tijela	22 mm	28 mm
Širina otvora kod šiljka	4 mm	20 mm
Širina otvora kod drška ili tijela	14 mm	14 mm

5. Napomena

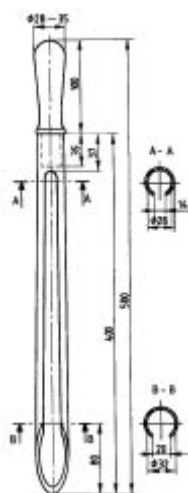
5.1. Kod manje sipkog praha sonde se mogu umetnuti okomito. Sonde tipa A se potpuno napune vrtnjom i mogu se izvući okomito. Sonde tipa B se potpuno napune tijekom umetanja i moraju se izvući u kosom položaju kako bi se spriječili gubici na donjem kraju.

5.2. Kod sipkog praha, spremnici moraju biti nagnuti, sonde umetnute u gotovo vodoravnom položaju s otvorom prema dolje, a izvučene s otvorom prema gore.

Slika 5. SONDA TIP A (dimenzije u mm)



Slika 6. SONDA TIP B (dimenzije u mm)



PRILOG 2.

I. PREGLED METODA ANALIZA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA I MLIJEKA U PRAHU

I. ODREĐIVANJE SUHE TVARI U: – ugušćenom (kondenziranom) ekstra-masnom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) djelomično obranom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) obranom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku	Metoda 1.
--	------------------

– ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelomično obranom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku	
II. ODREĐIVANJE VODE U: – ekstra-masnom mlijeku u prahu – punomasnom mlijeku u prahu – djelomično obranom mlijeku u prahu – obranom mlijeku u prahu	Metoda 2.
III. ODREĐIVANJE MASTI U: – ugušćenom (kondenziranom) ekstra-masnom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) djelomično obranom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) obranom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelomično obranom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku	Metoda 3.
IV. ODREĐIVANJE MASTI U: – ekstra-masnom mlijeku u prahu – punomasnom mlijeku u prahu – djelomično obranom mlijeku u prahu – obranom mlijeku u prahu	Metoda 4.
V. ODREĐIVANJE SAHAROZE U: – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelomično obranom mlijeku – ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku	Metoda 5.
VI. ODREĐIVANJE MLIJEČNE KISELINE I LAKTATA U: – ekstra-masnom mlijeku u prahu	Metoda 6.

– punomasnom mlijeku u prahu – djelomično obranom mlijeku u prahu – obranom mlijeku u prahu	
VII. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE U: – ekstra-masnom mlijeku u prahu – punomasnom mlijeku u prahu – djelomično obranom mlijeku u prahu – obranom mlijeku u prahu	Metoda 7. ili 8.

II. METODE ANALIZA SASTAVA UGUŠĆENOG (KONDENZIRANOG) MLIJEKA I MLIJEKA U PRAHU NAMIJENJENIH ZA KONZUMACIJU

I. OPĆE ODREDBE

1. Priprema uzorka za analizu

1.1. Ugušćeno (kondenzirano) ekstra-masno mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) djelomično obrano mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) obrano mlijeko

Protresti i preokrenuti zatvorenu limenku. Otvoriti limenku i polagano prelitati mlijeko u drugi spremnik, koji se može hermetički zatvoriti, miješajući ga opetovanim prelijevanjem. Paziti da sva mast i mlijeko koji prijanjaju na stijenke i krajeve limenke budu pomiješani s uzorkom. Zatvoriti spremnik. Ukoliko proizvod nije homogeniziran, zagrijati spremnik u vodenoj kupelji na temperaturi 40°C. Snažno protresti svakih 15 minuta. Nakon dva sata, ukloniti spremnik iz vodene kupelji i ostaviti da se ohladi do sobne temperature. Ukloniti poklopac i temeljito promiješati sadržaj spremnika žlicom ili spatulom (ukoliko se mast odvojila, uzorak se ne ispituje). Pohraniti na hladnom mjestu.

1.2. Ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno djelomično obrano mlijeko

Ugušćeno (kondenzirano) zaslađeno obrano mlijeko

Limenke: Zagrijati zatvorenu limenku u vodenoj kupelji pri temperaturi od 30-40°C približno 30 minuta. Otvoriti limenku i temeljito promiješati sadržaj spatulom ili žlicom čineći pokrete gore, dolje i kružnim pokretima kako bi se gornji i donji slojevi dobro pomiješali sa ukupnim

sadržajem. Paziti da ostatak mlijeka koji prijanja na stijenke i krajeve limenke bude umiješano u uzorak. Koliko god je moguće, preliti sadržaj u drugi spremnik koji ima poklopac za hermetičko zatvaranje. Zatvoriti spremnik i pohraniti na hladnom mjestu.

Tube: Prerezati kraj tube i izliti sadržaj u spremnik koji ima poklopac za hermetičko zatvaranje. Zatim prerezati tubu po duljini, sastrugati sav materijal koji prijanja za unutarnju stijenku i pažljivo pomiješati s ostatkom sadržaja. Pohraniti na hladnom mjestu.

1.3. Ekstra-masno mlijeko u prahu

Punomasno mlijeko u prahu

Djelomično obrano mlijeko u prahu

Obrano mlijeko u prahu

Presipati mlijeko u prahu u čisti, suhi spremnik (sa poklopcem za hermetičko zatvaranje) volumena dva puta većeg od volumena uzorka. Odmah zatvoriti spremnik i temeljito promiješati mlijeko u prahu opetovanim protresanjem i preokretanjem spremnika. Tijekom pripreme uzorka koliko god je moguće izbjegavati izlaganje uzorka atmosferi kako bi apsorpcija vlage bila minimalna.

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 istog stupnja čistoće.

2.1.2. Bez navođenja bilo kakvog drugog reagensa, pojam »otapanje« podrazumijeva otapanje u vodi, »otopina« vodenu otopinu i »razrjeđivanje« razrjeđivanje vodom.

2.2. Kemikalije

Sve kemikalije koje se koriste moraju biti potvrđene 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.

4. Izražavanje rezultata

4.1. Izračun

Ukoliko nije drugačije navedeno, rezultat mora biti izražen kao maseni udio u uzorku zapremljenom u laboratoriju.

4.2. Broj značajnih znamenki

Rezultat ne smije sadržavati više značajnih znamenki nego što je opravdano preciznošću metode koja se primjenjuje.

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
ODREĐIVANJE
(sušionik 99°C)**

UDJELA

SUHE

**1.
TVARI**

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio suhe tvari u:

- ugušćenom (kondenziranom) ekstra-masnom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) djelomično obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelomično obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku.

2. Definicija

Udio suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) mlijeku je udio suhe tvari određen opisanom metodom.

3. Princip

Poznata količina uzorka razrjeđuje se vodom, miješa s pijeskom i suši pri temperaturi od $99 \pm 1^\circ\text{C}$. Masa nakon sušenja je masa suhe tvari i izračunava se kao postotak mase uzorka.

4. Reagensi

Kremeni ili morski pijesak, tretiran kloridnom kiselinom (veličina zrnaca: 0,18-0,5 mm, koja prolaze kroz sito veličine otvora 500 μm i zadržavaju se na situ veličine otvora 180 μm). Pijesak mora udovoljavati sljedećem kontrolnom testu:

Zagrijavati približno 25 g pijeska u sušioniku (5.3.), dva sata, kako je opisano u točkama 6.1. do 6.3. Dodati 5 mL vode, ponovno zagrijavati u sušioniku dva sata, ohladiti i izvagati. Razlika između dvije odvage ne smije biti veća od 0,5 mg.

Ukoliko je potrebno, tretirati pijesak 25%-tnom kloridnom kiselinom tri dana, uz povremeno miješanje. Ispirati vodom do nestanka kisele reakcije ili dok voda za ispiranje više ne sadržava kloride. Osušiti pri temperaturi od 160°C i ponovno testirati kako je gore navedeno.

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Posudice s ravnim dnom, po mogućnosti izrađene od nikla, aluminija ili nehrđajućeg čelika. Posudice moraju imati poklopce koji se mogu čvrsto zatvoriti, ali i lako ukloniti. Primjerene dimenzije su promjer 60 do 80 mm i dubina približno 25 mm.

5.3. Sušionik za sušenje pri atmosferskom tlaku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od $99 \pm 1^\circ \text{C}$. Temperatura mora biti jednaka u cijelom sušioniku.

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

5.5. Stakleni štapići, spljošteni na jednom kraju, duljine koja pristaje unutrašnjosti metalnih posudica.

5.6. Kipuća vodena kupelj.

6. Postupak

6.1. U posudicu (5.2.) staviti približno 25 g pijeska (4.) i kratki stakleni štapić (5.5.).

6.2. Bez prekrivanja posudice i sadržaja poklopcem, staviti posudicu sa sadržajem i poklopac u sušionik (5.3.) i zagrijavati dva sata.

6.3. Posudicu zatvoriti poklopcem i prenijeti u eksikator (5.4.) Ostaviti da se ohladi na sobnu temperaturu i izvagati s točnošću od 0,1 mg (M0).

6.4. Nagnuti posudicu kako bi se pijesak skupio na jednoj strani posudice. U prazni dio posudice staviti približno 1,5 g ugušćenog (kondenziranog) zaslađenog mlijeka odnosno 3,0 g ugušćenog (kondenziranog) mlijeka. Posudicu zatvoriti poklopcem i izvagati s točnošću od 0,1 mg (M1).

6.5. Skinuti poklopac, dodati 5 mL vode i pomoću staklenog štapića promiješati tekućine, a zatim pijesak i tekući dio. Štapić ostaviti u mješavini.

6.6. Posudicu staviti u vodenu kupelj (5.6.) dok voda ne ispari, što obično traje 20 minuta. Povremeno štapićem promiješati mješavinu kako bi masa bila dobro prozračena i kako se ne bi stvrdnula kad se osuši. Štapić položiti u posudicu.

6.7. Staviti posudicu i poklopac u sušionik na 1 sat i 30 minuta.

6.8. Posudicu zatvoriti poklopcem i prenijeti u eksikator (5.4.). Ostaviti da se ohladi do sobne temperature i izvagati s točnošću od 0,1 mg.

6.9. Ponovno staviti posudicu i poklopac u sušionik, otklopiti posudicu i otkrivenu posudicu i poklopac zagrijavati još jedan sat.

6.10. Ponoviti postupak opisan u točki 6.8.

6.11. Ponavljati postupak opisan u točkama 6.9. i 6.10. dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ukoliko se masa poveća, pri izračunu (7.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je M2 (g).

7. Izražavanje rezultata

7.1. Metoda izračuna

Udio suhe tvari, izražen kao postotak mase uzorka, izračunava se na sljedeći način:

$$\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

pri čemu je:

M0 = masa posudice, poklopca i pijeska nakon postupka opisanog u točki 6.3., u gramima

M1 = masa posudice, poklopca, pijeska i uzorka nakon postupka opisanog u točki 6.4., u gramima

M2 = masa posudice, poklopca, pijeska i osušenog uzorka nakon postupka opisanog u točki 6.11., u gramima

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 0,2 g suhe tvari na 100 g proizvoda.

8. Izračunavanje ukupne suhe tvari mlijeka i bezmasne suhe tvari mlijeka

8.1. Udio ukupne suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku izračunava se na sljedeći način:

Od udjela ukupne suhe tvari (prema Metodi 1.) oduzeti udio saharoze (prema Metodi 5.).

8.2. Udio bezmasne suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku izračunava se na sljedeći način:

Od udjela ukupne suhe tvari (prema Metodi 1.) oduzeti udio saharoze (prema Metodi 5.) i udio masti (prema Metodi 3.).

8.3. Udio bezmasne suhe tvari u ugušćenom (kondenziranom) mlijeku izračunava se na sljedeći način:

Od udjela ukupne suhe tvari (prema Metodi 1.) oduzeti udio masti (prema Metodi 3.).

**METODA
ODREĐIVANJE
(sušionik 102°C)**

UDJELA

**2.
VODE**

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje gubitak mase sušenjem u:

- ekstra-masnom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelomično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

2. Definicija

Udio vode je gubitak mase sušenjem određen opisanom metodom.

3. Princip

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

4. Oprema

4.1. Analitička vaga

4.2. Posudice, po mogućnosti izrađene od nikla, aluminijske, nehrđajućeg čelika ili stakla. Posudice moraju imati poklopce 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.

5. Postupak

5.1. Otvorenu posudicu (4.2.) s poklopcem staviti u sušionik (4.3.) i zagrijavati približno jedan sat.

5.2. Zatvorenu posudicu ostaviti da se ohladi u eksikatoru (4.4.) do sobne temperature i zatim izvagati s točnošću od 0,1 mg (M0).

5.3. U posudicu dodati približno 2 g mlijeka u prahu, zatvoriti posudicu i što je brže moguće izvagati s točnošću od 0,1 mg (M1).

5.4. Otvorenu posudicu s poklopcem staviti u sušionik dva sata.

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

5.6. Otvorenu posudicu s poklopcem zagrijavati u sušioniku jedan sat.

5.7. Ponoviti postupak opisan u točki 5.5.

5.8. Ponavljati postupak opisan u točkama 5.6. i 5.5. dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ukoliko se masa poveća, pri izračunu (6.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je M2 (g).

6. Izražavanje rezultata

6.1. Metoda izračuna

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

$$\frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

pri čemu je:

M0 = masa posudice i poklopca nakon postupka opisanog u točki 5.2., u gramima

M1 = masa posudice, poklopca i uzorka nakon postupka opisanog u točki 5.3., u gramima

M2 = masa posudice, poklopca i konačnog uzorka nakon postupka opisanog u točki 5.5., u gramima

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.

METODA **3.**
ODREĐIVANJE UDJELA MASTI U UGUŠĆENOM (KONDENZIRANOM)
MLIJEKU
(Metoda Röse-Gottlieb)

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio masti u:

- ugušćenom (kondenziranom) ekstra-masnom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) djelomično obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelomično obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku.

2. Definicija

Udio masti u ugušćenom (kondenziranom) mlijeku je udio masti određen opisanom metodom.

3. Princip

Udio masti određuje se ekstrakcijom masti iz amonijeve alkoholne otopine uzorka dietil eterom i petroleterom, isparavanjem otapala i vaganjem ostatka te izračunavanjem postotka mase uzorka prema Röse-Gottliebovom postupku.

4. Reagensi

Svi reagensi moraju udovoljavati zahtjevima definiranim slijepom probom (6.1.). Ukoliko je potrebno, reagensi mogu biti ponovno destilirani u prisutnosti približno 1 g mliječne masti na 100 mL otapala.

4.1. Otopina amonijaka, približno 25% (m/m) NH_3 (gustoće približno 0,91 g/mL pri 20°C) ili jača otopina poznate koncentracije.

4.2. Etanol, $96 \pm 2\%$ (v/v) ili, ukoliko isti nije na raspolaganju, etanol denaturiran metanolom, etil metil ketonom ili petroleterom.

4.3. Dietil eter, bez peroksida.

Napomena 1.:

Za određivanje prisutnosti peroksida u mali cilindar sa staklenim čepom, kojeg je potrebno isprati eterom, dodati 10 mL etera i 1 mL svježe pripremljene 10%-tne otopine kalijevog jodida. Protresti i ostaviti stajati jednu minutu. Žuta boja ne smije se pojaviti niti u jednom sloju.

Napomena 2.:

Dietil eter može se očuvati bez peroksida dodatkom mokre cinkove folije koju je potrebno potpuno umočiti u razrijeđenu kiselu otopinu bakrovog sulfata jednu minutu te zatim isprati vodom. Za 1 L upotrijebiti približno 8000 mm² cinkove folije, razrezati na trake dovoljne duljine da mogu dosezati najmanje do polovice spremnika.

4.4. Petroleter, sa rasponom vrenja od 30-60°C.

4.5. Miješano otapalo koje se priprema netom prije upotrebe miješanjem jednake količine dietil etera (4.3.) i petroletera (4.4.) (u slučaju da je naznačena upotreba miješanog otapala, ista se može zamijeniti dietil eterom ili petroleterom).

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Odgovarajuće epruvete ili tikvice za ekstrakciju s čepovima od brušenog stakla ili drugim zatvaračima otpornima na djelovanje otapala koja se koriste.

5.3. Tikvice tankih stijenki i ravnog dna, 150-250 mL.

5.4. Sušionik za sušenje pri atmosferskom tlaku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od $102 \pm 1^{\circ} \text{C}$.

5.5. Granule za vrenje, bez masti, koje se pri upotrebi ne drobe, neporozne, primjerice staklene kuglice ili komadići silicijevog karbida (upotreba ovog materijala nije obvezna, vidjeti točku 6.2.1.).

5.6. Sifon (odvodna cijev) koja odgovara epruvetama za ekstrakciju.

5.7. Centrifuga (nije obvezna).

6. Postupak

6.1. Slijepa proba

Paralelno s određivanjem udjela masti u uzorku, provesti slijepu probu sa 10 mL vode, koristeći istu aparaturu za ekstrakciju, iste količine svih reagensa i isti postupak opisan ovom metodom, osim postupka opisanog pod točkom 6.2.2. Ukoliko slijepa proba prelazi 0,5 mg, provjeriti reagense te nečisti reagens ili reagense očistiti ili zamijeniti.

6.2. Određivanje

6.2.1. Osušiti tikvicu (5.3.) (ukoliko je potrebno zajedno sa nekoliko granula za vrenje (5.5.) kako bi se postiglo lagano vrenje tijekom uklanjanja otapala koje slijedi) u sušioniku 30-60 minuta. Ostaviti tikvicu da se ohladi do sobne temperature i izvagati s točnošću od 0,1 mg.

6.2.2. Promiješati pripremljeni uzorak i odmah izvagati, s točnošću od 1 mg, 4-5 g uzorka uzorka ili 2-2,5 g zaslađenog uzorka, direktno u aparaturu za ekstrakciju. Dodati vode do 10,5 mL i pažljivo promiješati uz lagano zagrijavanje (40-50°C) dok se proizvod potpuno ne rasprši. Određivanje je potrebno ponoviti ukoliko uzorak nije potpuno raspršen.

6.2.3. Dodati 1,5 ml amonijaka (25%) (4.1.) ili odgovarajući volumen jače otopine i dobro promiješati.

6.2.4. Dodati 10 mL etanola (4.2.) i promiješati tekućine nježno, ali temeljito u nezatvorenoj aparaturi.

6.2.5. Dodati 25 mL dietil etera (4.3.) i ohladiti pod mlazom tekuće vode. Zatvoriti aparaturu, snažno protresti i opetovano okretati jednu minutu.

6.2.6. Pažljivo ukloniti čep i dodati 25 mL petroletera (4.4.) koristeći prvih nekoliko mililitara za ispiranje čepa i unutrašnjosti vrata aparature, tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Zatvoriti aparaturu čepom i protresati i opetovano okretati 30 sekundi. Ne smije se previše snažno protresati ukoliko se ne provodi centrifugiranje pod točkom 6.2.7.

6.2.7. Ostaviti stajati aparaturu dok gornji sloj tekućine ne postane bistar i jasno se ne odijeli od donjeg vodenog sloja. Alternativno provesti odvajanje koristeći odgovarajuću centrifugu (5.7.).

Napomena:

Pri upotrebi centrifuge koju ne pokreće trofazni motor, može doći do iskrenja i stoga je potreban oprez kako bi se izbjegla eksplozija ili požar zbog eterskih para koje mogu izlaziti iz, primjerice, napukle epruvete.

6.2.8. Ukloniti čep, isprati čep i unutrašnjost vrata tikvice s nekoliko mililitara miješanog otapala (4.5.) tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Pažljivo prenijeti što je moguće više supernatanta dekantiranjem ili pomoću sifona (5.6.) u pripremljenu tikvicu (6.2.1.).

Napomena:

Ukoliko se ne upotrebljava sifon, može biti potrebno dodati malo vode kako bi se povećala površina između dva sloja i olakšalo dekantiranje.

6.2.9. Isprati vanjsku i unutarnju stranu vrata aparature ili vrh i donji dio sifona s nekoliko mililitara miješanog otapala (4.5.) tako da se tekućina s vanjske strane vrata slijeva u tikvicu, a tekućina s unutarnje strane vrata i sifona u aparaturu za ekstrakciju.

6.2.10. Provesti drugu ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u točkama od 6.2.5. do 6.2.9. uključivo, ali koristeći samo 15 mL dietil etera i 15 mL petroletera.

6.2.11. Provesti treću ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u točki 6.2.10., ali bez zadnjeg ispiranja.

Napomena:

Treća ekstrakcija nije obvezna pri analizi uzoraka ugušćenog (kondenziranog) obranog mlijeka i ugušćenog (kondenziranog) zaslađenog obranog mlijeka.

6.2.12. Pažljivo ispariti ili ukloniti destilacijom što više otapala (uključujući etanol). Ukoliko je kapacitet tikvice malen, potrebno je ukloniti nešto otapala, kako je navedeno, nakon svake ekstrakcije.

6.2.13. Kada se više ne osjeti miris otapala, tikvicu s bočne strane staviti u sušionik i zagrijavati jedan sat.

6.2.14. Izvaditi tikvicu iz sušionika, ostaviti da se ohladi do sobne temperature i izvagati s točnošću od 0,1 mg.

6.2.15. Ponoviti postupak opisan u točkama 6.2.13. i 6.2.14. uz zagrijavanje u trajanju od 30-60 minuta dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ukoliko se masa poveća, pri izračunu (7.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je M_1 (g).

6.2.16. Dodati 15-25 mL petroletera kako bi se potvrdilo da je ekstrahirana tvar potpuno topljiva. Lagano zagrijavati i rotirati dok se mast ne otopi.

6.2.16.1. Ukoliko je ekstrahirana tvar potpuno topljiva u petroleteru, masa masti je razlika između masa određenih u točkama 6.2.1. i 6.2.15.

6.2.16.2. Ukoliko je prisutna bilo koja netopljiva tvar, ili u slučaju sumnje, potpuno ekstrahirati mast iz tikvica opetovanim ispiranjem s toplim petroleterom, tako da se prije svakog dekantiranja netopljive tvari istalože. Isprati vanjski dio vrata tikvice tri puta. Zagrijavati tikvicu, postavljenu na bočnu stranu u sušioniku jedan sat. Ostaviti da se ohladi do sobne temperature kao prije (6.2.1.) i izvagati s točnošću od 0,1 mg. Masa masti je razlika između mase određene u točki 6.2.15. i ove konačne mase.

7. Izražavanje rezultata

7.1. Izračun

Masa ekstrahirane masti izražene u g izračunava se na sljedeći način:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

Udio masti u uzorku, izražen kao postotak, izračunava se na sljedeći način:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

pri čemu je:

M1 = masa tikvice M sa masti nakon postupka opisanog u točki 6.2.15., u gramima

M2 = masa tikvice M nakon postupka opisanog u točki 6.2.1. ili u slučaju netopljive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u točki 6.2.16.2., u gramima

B1 = masa tikvice B slijepe probe nakon postupka opisanog u točki 6.2.15., u gramima

B2 = masa tikvice B nakon postupka opisanog u točki 6.2.1. ili u slučaju netopljive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u točki 6.2.16.2., u gramima

S = masa upotrijebljenog uzorka, u gramima

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 g masti na 100 g proizvoda.

METODA

ODREĐIVANJE UDJELA MASTI U MLIJEKU U PRAHU

(Metoda Röse-Gottlieb)

4.

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio masti u:

- ekstra-masnom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelomično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

2. Definicija

Udio masti u mlijeku u prahu je udio masti određen opisanom metodom.

3. Princip

Udio masti određuje se ekstrakcijom masti iz amonijeve alkoholne otopine uzorka dietil eterom i petroleterom, isparavanjem otapala i vaganjem ostatka te izračunavanjem postotka mase uzorka prema Röse-Gottliebovom postupku.

4. Reagensi

Svi reagensi moraju udovoljavati zahtjevima definiranim slijepom probom (6.1.). Ukoliko je potrebno, reagensi mogu biti ponovno destilirani u prisutnosti približno 1 g mliječne masti na 100 mL otapala.

4.1. Otopina amonijaka, približno 25% (m/m) NH_3 (gustoće približno 0,91 g/mL pri 20°C) ili jača otopina poznate koncentracije.

4.2. Etanol, $96 \pm 2\%$ (v/v) ili, ukoliko isti nije na raspolaganju, etanol denaturiran metanolom, etil metil ketonom ili petroleterom.

4.3. Dietil eter, bez peroksida.

Napomena 1.:

Za određivanje prisutnosti peroksida u mali cilindar sa staklenim čepom, kojeg je potrebno isprati eterom, dodati 10 mL etera i 1 mL svježe pripremljene 10%-tne otopine kalijevog jodida. Protresti i ostaviti stajati jednu minutu. Žuta boja ne smije se pojaviti niti u jednom sloju.

Napomena 2.:

Dietil eter može se očuvati bez peroksida dodatkom mokre cinkove folije koju je potrebno potpuno umočiti u razrijeđenu kiselu otopinu bakrovog sulfata jednu minutu te zatim isprati vodom. Za 1 L upotrijebiti približno 8000 mm² cinkove folije, razrezati na trake dovoljne duljine da mogu dosezati najmanje do polovice spremnika.

4.4. Petroleter, sa rasponom vrenja od 30-60°C.

4.5. Miješano otapalo koje se priprema neposredno prije upotrebe miješanjem jednake količine dietil etera (4.3.) i petroletera (4.4.) (u slučaju da je naznačena upotreba miješanog otapala, ista se može zamijeniti dietil eterom ili petroleterom).

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Odgovarajuće epruvete ili tikvice za ekstrakciju s čepovima od brušenog stakla ili drugim zatvaračima otpornima na djelovanje otapala koja se koriste.

5.3. Tikvice tankih stijenki i ravnog dna, 150-250 mL.

5.4. Sušionik za sušenje pri atmosferskom tlaku s odgovarajućom ventilacijom i termostatski reguliranom temperaturom od $102 \pm 1^\circ \text{C}$.

5.5. Granule za vrenje, bez masti, koje se pri upotrebi ne drobe, neporozne, primjerice staklene kuglice ili komadići silicijevog karbida (upotreba ovog materijala nije obvezna, vidjeti točku 6.2.1.).

5.6. Vodena kupelj, temperature 60-70°C.

5.7. Sifon (odvodna cijev) koja odgovara epruvetama za ekstrakciju.

5.8. Centrifuga (nije obvezna).

6. Postupak

6.1. Slijepa proba

Paralelno s određivanjem udjela masti u uzorku, provesti slijepu probu sa 10 mL vode, koristeći istu aparaturu za ekstrakciju, iste količine svih reagensa i isti postupak opisan ovom metodom, osim postupka opisanog pod točkom 6.2.2. Ukoliko slijepa proba prelazi 0,5 mg, provjeriti reagense te nečisti reagens ili reagense očistiti ili zamijeniti.

6.2. Određivanje

6.2.1. Osušiti tikvicu (5.3.) (ukoliko je potrebno zajedno sa nekoliko granula za vrenje (5.5.), kako bi se postiglo lagano vrenje tijekom uklanjanja otapala koje slijedi) u sušioniku (5.4.) 30-60 minuta. Ostaviti tikvicu da se ohladi do sobne temperature i izvagati s točnošću od 0,1 mg.

6.2.2. S točnošću od 1 mg izvagati približno 1 g punomasnog mlijeka u prahu ili približno 1,5 g djelomično obranog ili obranog mlijeka u prahu, direktno u aparaturu za ekstrakciju (5.2.). Dodati 10 mL vode i pažljivo promiješati dok se mlijeko u prahu potpuno ne rasprši (za neke uzorke potrebno je zagrijavanje).

6.2.3. Dodati 1,5 ml amonijaka (25%) (4.1.) ili odgovarajući volumen jače otopine i zagrijavati u vodenoj kupelji (5.6.) 15 minuta pri temperaturi 60-70°C, povremeno miješajući. Ohladiti npr. pod mlazom tekuće vode.

6.2.4. Dodati 10 mL etanola (4.2.) i promiješati tekućine pažljivo, ali temeljito u nezatvorenoj aparaturi.

6.2.5. Dodati 25 mL dietil etera (4.3.) i ohladiti pod mlazom tekuće vode. Zatvoriti aparaturu, snažno protresti i opetovano okretati jednu minutu.

6.2.6. Pažljivo ukloniti čep i dodati 25 mL petroletera (4.4.) koristeći prvih nekoliko mililitara za ispiranje čepa i unutrašnjosti vrata aparature, tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Zatvoriti aparaturu čepom i protresati i opetovano okretati 30 sekundi. Ne smije se previše snažno protresati ukoliko se ne provodi centrifugiranje pod točkom 6.2.7.

6.2.7. Ostaviti stajati aparaturu dok gornji sloj tekućine ne postane bistar i jasno se ne odijeli od donjeg vodenog sloja. Alternativno provesti odvajanje koristeći odgovarajuću centrifugu (5.7.).

Napomena:

Pri upotrebi centrifuge koju ne pokreće trofazni motor, može doći do iskrenja i stoga je potreban oprez kako bi se izbjegla eksplozija ili požar zbog eterskih para koje mogu izlaziti iz, primjerice, napukle epruvete.

6.2.8. Ukloniti čep, isprati čep i unutrašnjost vrata tikvice aparature s nekoliko mililitara miješanog otapala (4.5.) tako da se tekućina nakon ispiranja slijeva u aparaturu. Pažljivo prenijeti što je moguće više supernatanta dekantiranjem ili pomoću sifona (5.7.) u pripremljenu tikvicu (6.2.1.).

Napomena:

Ukoliko se ne upotrebljava sifon, može biti potrebno dodati malo vode kako bi se povećala površina između dva sloja i olakšalo dekantiranje.

6.2.9. Isprati vanjsku i unutarnju stranu vrata aparature ili vrh i donji dio sifona s nekoliko mililitara miješanog otapala (4.5.) tako da se tekućina s vanjske strane vrata slijeva u tikvicu, a tekućina s unutarnje strane vrata i sifona u aparaturu za ekstrakciju.

6.2.10. Provesti drugu ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u točkama od 6.2.5. do 6.2.9. uključivo, ali koristeći samo 15 mL dietil etera i 15 mL petroletera.

6.2.11. Provesti treću ekstrakciju ponavljajući postupak opisan u točki 6.2.10., ali bez zadnjeg ispiranja (6.2.9.).

Napomena:

Treća ekstrakcija nije obvezna pri analizi uzoraka obranog mlijeka u prahu.

6.2.12. Pažljivo ispariti ili destilacijom ukloniti što više otapala (uključujući etanol). Ukoliko je kapacitet tikvice malen, potrebno je ukloniti nešto otapala, kako je navedeno, nakon svake ekstrakcije.

6.2.13. Kada ne bude primjetan miris otapala, tikvicu sa bočne strane staviti u sušionik i zagrijavati jedan sat.

6.2.14. Izvaditi tikvicu iz sušionika, ostaviti da se ohladi do sobne temperature i izvagati s točnošću od 0,1 mg.

6.2.15. Ponoviti postupak opisan u točkama 6.2.13. i 6.2.14. uz zagrijavanje u trajanju od 30-60 minuta dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok se masa ne poveća. Ukoliko se masa poveća, pri izračunu (7.1.) upotrijebiti najmanju zabilježenu masu. Konačna zabilježena masa je M1 (g).

6.2.16. Dodati 15-25 mL petroletera kako bi se potvrdilo da je ekstrahirana tvar potpuno topljiva. Lagano zagrijavati i rotirati dok se mast ne otopi.

6.2.16.1. Ukoliko je ekstrahirana tvar potpuno topljiva u petroleteru, masa masti je razlika između masa određenih u točkama 6.2.1. i 6.2.15.

6.2.16.2. Ukoliko je prisutna bilo koja netopljiva tvar, ili u slučaju sumnje, potpuno ekstrahirati mast iz tikvica opetovanim ispiranjem toplim petroleterom, dopuštajući da se prije svakog dekantiranja netopljive tvari istalože. Isprati vanjski dio vrata tikvice tri puta. Zagrijavati tikvicu, postavljenu na bočnu stranu u sušioniku jedan sat. Ostaviti da se ohladi do sobne temperature kao prije (6.2.1.) i izvagati s točnošću od 0,1 mg. Masa masti je razlika između mase određene u točki 6.2.15. i ove konačne mase.

7. Izražavanje rezultata

7.1. Izračun

Masa ekstrahirane masti izražene u g izračunava se na sljedeći način:

$$(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)$$

Udio masti u uzorku, izražen kao postotak, izračunava se na sljedeći način:

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

pri čemu je:

M1 = masa tikvice M sa masti nakon postupka opisanog u točki 6.2.15., u gramima

M2 = masa tikvice M nakon postupka opisanog u točki 6.2.1., ili u slučaju netopljive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u točki 6.2.16.2., u gramima

B1 = masa tikvice B slijepe probe nakon postupka opisanog u točki 6.2.15., u gramima

B2 = masa tikvice B nakon postupka opisanog u točki 6.2.1. ili u slučaju netopljive tvari ili sumnje nakon postupka opisanog u točki 6.2.16.2., u gramima

S = masa upotrijebljenog uzorka, u gramima

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 0,2 g masti na 100 g proizvoda isključujući obrano mlijeko u prahu kod kojeg razlika ne smije biti veća od 0.1 g masti na 100 g proizvoda.

METODA

ODREĐIVANJE

(POLARIMETRIJSKA METODA)

UDJELA

5.

SAHAROZE

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio saharoze u:

- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom djelomično obranom mlijeku,
- ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom obranom mlijeku.

Uzorci ne smiju sadržavati invertni šećer.

2. Definicija

Udio saharoze u ugušćenom (kondenziranom) zaslađenom mlijeku je udio saharoze određen opisanom metodom.

3. Princip

Ova se metoda temelji na načelu Clergetove inverzije, laganog tretiranja uzorka kiselinom koja izaziva potpunu hidrolizu saharoze te gotovo nikakvu hidrolizu laktoze ili drugih šećera.

Udio saharoze dobiva se iz promjene optičke aktivnosti otopine.

Bistri filtrat uzorka, bez mutarotacije laktoze, priprema se na način da se otopina tretira amonijakom, nakon čega slijedi neutralizacija i bistrenje dodavanjem otopina cinkovog acetata i kalijevog heksacijanoferata(II). U dijelu filtrata saharoza se hidrolizira na poseban način.

Iz rotacije filtrata prije i poslije inverzije, udio saharoze izračunava se pomoću odgovarajuće formule.

4. Reagensi

4.1. Otopina cinkovog acetata, 1 mol/L.

Otopiti 21,9 g kristaliziranog cinkovog acetata dihidrata $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 mL ledene octene kiseline u vodi i nadopuniti vodom do 100 mL.

4.2. Otopina kalijevog heksacijanoferata(II), 0,25 mol/L

Otopiti 10,6 g kristaliziranog kalijevog heksacijanoferata(II) trihidrata $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$ u vodi i nadopuniti vodom do 100 mL.

4.3. Otopina kloridne kiseline, $6,35 \pm 0,20$ mol/L (20-22%) ili $5,0 \pm 0,2$ M (16-18%).

4.4. Otopina amonijaka, $2,0 \pm 0,2$ mol/L (3,5%).

4.5. Otopina octene kiseline, $2,0 \pm 0,2$ mol/L (12%).

4.6. Indikator bromtimol plavilo, 1%-tna (m/v) otopina u etanolu.

5. Oprema

5.1. Vaga točnosti 10 mg.

5.2. Polarimetrijska cijev, 2 dm, točno kalibrirane duljine.

5.3. Polarimetar ili saharimetar:

a) Polarimetar s natrijevim svjetlosti ili živinom zelenom svjetlosti (svjetiljka sa živinim parama s prizmom ili specijalni Wrattenov zaslon br. 77 A), s točnošću od najmanje 0,05 kutnih stupnjeva,

b) Saharimetar s međunarodnom šećernom ljestvicom, s bijelom svjetlosti koja prolazi kroz 15 mm filter 6%-tne otopine kalijevog bikromata, ili natrijeve svjetlosti, s točnošću od najmanje $0,1^\circ$ na međunarodnoj šećernoj ljestvici.

5.4. Vodena kupelj, regulirana na $60 \pm 1^\circ\text{C}$.

6. Postupak

6.1. Kontrolno određivanje

S ciljem standardizacije postupka, reagensa i opreme, provesti kontrolno određivanje u dva paralelna određivanja, kako je opisano u nastavku, koristeći mješavinu 100 g mlijeka i 18 g čiste saharoze ili mješavinu 110 g obranog mlijeka i 18 g čiste saharoze od kojih svaka odgovara 40 g ugušćenog (kondenziranog) mlijeka sa 45% saharoze. Izračunati udio saharoze pomoću formula navedenih u točki 7. koristeći u formuli 1. količinu odvagano mlijeka te udio masti i bjelancevina u tom mlijeku umjesto M, F i P, a u formuli 2. umjesto M vrijednost 40,00. Srednja vrijednost dobivenih vrijednosti ne smije se razlikovati za više od 0,2% od 45,0%.

6.2. Određivanje

6.2.1. Izvagati približno 40 g dobro izmiješanog uzorka u staklenu čašu od 100 mL s točnošću od 10 mg. Dodati 50 mL vruće vode ($80-90^\circ\text{C}$) i dobro promiješati.

6.2.2. Kvantitativno prenijeti mješavinu u odmjernu tikvicu od 200 mL ispirući čašu dodatnim količinama vode temperature 60°C do ukupnog volumena između 120 mL i 150 mL. Promiješati i ostaviti da se ohladi do sobne temperature.

6.2.3. Dodati 5 mL razrijeđene otopine amonijaka (4.4.). Ponovno promiješati i ostaviti stajati 15 minuta.

6.2.4. Neutralizirati amonijak dodavanjem ekvivalentne količine razrijeđene otopine octene kiseline (4.5.). Prethodno odrediti točan broj mililitara titracijom otopine amonijaka koristeći bromtimol plavilo kao indikator (4.6.). Promiješati.

6.2.5. Dodati 12,5 mL otopine cinkovog acetata (4.1.) lagano miješajući rotiranjem nagnute tikvice.

6.2.6. Dodati 12,5 mL otopine kalijevog heksacijanoferata(II) (4.2.) na isti način kao i otopinu acetata.

6.2.7. Sadržaj tikvice temperature 20°C dopuniti vodom iste temperature (20°C) do 200 mL.

Napomena:

Tijekom bilo koje do sada opisane faze, potrebno je dodavati vodu ili reagense na način da se izbjegne stvaranje mjehurića, a iz istog je razloga potrebno miješanje obavljati rotiranjem tikvice, a ne potresanjem. Ukoliko se prisutnost mjehurića primijeti prije nadopunjavanja do 200 mL može ih se ukloniti privremenim spajanjem tikvice na vakuum pumpu i rotiranjem tikvice.

6.2.8. Začepiti tikvicu suhim čepom i temeljito promiješati snažnim potresanjem.

6.2.9. Ostaviti stajati nekoliko minuta i zatim profiltrirati preko suhog filter papira. Prvih 25 mL filtrata baciti.

6.2.10. Direktna polarizacija: odrediti optičku rotaciju filtrata pri $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.2.11. Inverzija: otpipetirati 40 mL gore dobivenog filtrata u odmjernu tikvicu od 50 mL. Dodati 6,0 mL 6,35 mol/L kloridne kiseline ili 7,5 mL 5,0 mol/L kloridne kiseline (4.3.).

Tikvicu staviti u vodenu kupelj na 60°C , 15 minuta pazeći pritom da cijeli trbušasti dio tikvice bude uronjen. Miješati kružnim pokretima prvih pet minuta pri čemu bi sadržaj tikvice trebao dostići temperaturu vodene kupelji. Ohladiti do 20°C i dopuniti do oznake vodom temperature 20°C . Promiješati i ostaviti stajati 1 sat pri toj temperaturi.

6.2.12. Invertna polarizacija

Odrediti rotaciju invertne otopine pri $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$. (Međutim, ukoliko se temperatura T tekućine u polarizacijskoj cijevi razlikuje za više od $0,2^\circ\text{C}$ tijekom mjerenja, potrebno je provesti korekciju temperature prema točki 7.2.).

7. Izražavanje rezultata

7.1. Metoda izračuna

Udio saharoze izračunava se na sljedeći način:

$$(1) \ v = \frac{M}{100} (1,08 F + 1,55 P)$$
$$(2) \ S = \frac{D - 1,25 I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times M} \%$$

pri čemu je:

S = udio saharoze

M = masa izvaganog uzorka, u gramima

F = postotak masti u uzorku

P = postotak bjelančevina u uzorku

V = volumen na koji se uzorak razrjeđuje prije filtracije, u mL

v = korekcija za volumen taloga koji se stvara tijekom bistrenja, u mL

D = direktno očitavanje polarimetra (polarizacija prije inverzije)

I = očitavanje polarimetra nakon inverzije

L = duljina polarimatrijske cijevi, u dm

Q = faktor inverzije čije su vrijednosti navedene u točki 7.2.

Napomene:

(a) Kada se odvaži točno 40,00 g ugušćenog (kondenziranog) mlijeka i kada se upotrebljava polarimetar sa natrijevom svjetlosti, kutnim stupnjevima i polarimetrijskom cijevi duljine 2 dm na $20,0 \pm 0,1$ °C, udio saharoze normalnog ugušćenog (kondenziranog) mlijeka ($C = 9$) može se izračunati na sljedeći način:

$$S = (D - 1,25T) \times (2,833 - 0,00612F - 0,00878P)$$

(b) Ukoliko se invertna polarizacija mjeri pri temperaturi različitoj od 20°C, vrijednosti je potrebno pomnožiti sa:

$$(1 + 0,0037(T - 20))$$

7.2. Vrijednosti faktora inverzije Q

Sljedećim se formulama izračunavaju točne vrijednosti faktora inverzije Q, za različite izvore svjetlosti sa korekcijama koncentracije i temperature:

Natrijeva svjetlost i polarimetar sa kutnim stupnjevima:

$$Q = 0,8825 + 0,0006(C - 9) - 0,0033(T - 20)$$

Živina zelena svjetlost i polarimetar sa kutnim stupnjevima:

$$Q = 1,0392 + 0,0007(C - 9) - 0,0039(T - 20)$$

Bijela svjetlost sa dikromatskim filterom i saharimetar sa stupnjevima međunarodne šećerne ljestvice:

$$Q = 2,549 + 0,0017(C - 9) - 0,0095(T - 20)$$

U gornjim formulama:

C = postotak ukupnih šećera u invertnoj otopini nakon polarizacije

T = temperatura invertne otopine pri polarimetrijskom očitavanju

Napomena 1.:

Postotak ukupnih šećera C u invertnoj otopini može se izračunati iz direktnog očitavanja i promjene nakon inverzije na uobičajeni način, koristeći uobičajene vrijednosti za specifične rotacije saharoze, laktoze i invertnog šećera.

Korekcija 0,0006 (C-9) itd., je točna samo kada je C približno 9; za normalno ugušćeno (kondenzirano) mlijeko ova se korekcija može zanemariti, budući da je C blizu 9.

Napomena 2.:

Odstupanje temperature od 20°C za 1°C predstavlja malu razliku kod direktnog očitavanja, međutim odstupanje veće od 0,2°C kod invertnog očitavanja zahtijeva korekciju. Korekcija – 0,0033 (T-20) itd., je točna samo između 18°C i 22°C.

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 0,3 g saharoze na 100 g ugušćenog (kondenziranog) mlijeka.

METODA

6.

ODREĐIVANJE MLIJEČNE KISELINE I LAKTATA

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom određuje udio mliječne kiseline i laktata, izraženih kao mliječna kiselina, u:

- ekstra-masnom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelomično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

2. Definicija

Udio mliječne kiseline i laktata u mlijeku u prahu je udio mliječne kiseline i laktata, izraženih kao mliječna kiselina, određen opisanom metodom.

3. Princip

Masti, bjelančevine i laktoza istovremeno se uklanjaju iz otopine uzorka dodavanjem bakrovog sulfata ili kalcijevog hidroksida nakon čega slijedi filtracija.

Mliječna kiselina i laktati u filtratu prevode se u acetaldehid koncentriranom sumpornom kiselinom uz prisutnost bakrovog(II) sulfata.

Udio mliječne kiseline određuje se kolorimetrijski uz upotrebu p-hidroksidifenila.

Udio mliječne kiseline i laktata izražava se u mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari.

4. Reagensi

4.1. Otopina bakrovog(II) sulfata

Otopiti 250 g bakrovog(II) sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) u vodi i razrijediti vodom do 1000 mL.

4.2. Suspenzija kalcijevog hidroksida.

4.2.1. Smrviti 300 g kalcijevog hidroksida (Ca(OH)_2) u tarioniku s vodom, koristeći ukupno 900 mL. Suspenzija mora biti svježe pripremljena prije upotrebe.

4.2.2. Suspenzija kalcijevog hidroksida

Smrviti 300 g kalcijevog hidroksida (Ca(OH)_2) u tarioniku s vodom, koristeći ukupno 1400 mL. Suspenzija mora biti svježe pripremljena prije upotrebe.

4.3. Sumporna kiselina – otopina bakrovog(II) sulfata

K 300 mL sumporne kiseline, 95,9-97,0% (m/m) H_2SO_4 , dodati 0,5 mL otopine bakrovog(II) sulfata (4.1.).

4.4. Otopina p-hidroksidifenila ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$)

Potresanjem i laganim zagrijavanjem otopiti 0,75 g p-hidroksidifenila u 5 mL vodene otopine natrijevog hidroksida, koja sadrži 5 g NaOH na 100 mL. U odmjernoj tikvici razrijediti vodom do 50 mL. Otopinu čuvati u boci od smeđeg stakla na tamnom i hladnom mjestu. Ne upotrebljavati otopinu ukoliko dođe do promjene boje ili zamućenja. Maksimalna trajnost otopine je 72 sata.

4.5. Standardna otopina mliječne kiseline

Neposredno prije upotrebe otopiti 0,1067 g litijevog laktata ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$) u vodi i razrijediti u odmjernoj tikvici do 1000 mL. 1 mL ove otopine odgovara 0,1 mg mliječne kiseline.

4.6. Standardno rekonstituirano mlijeko

Unaprijed analizirati nekoliko uzoraka mlijeka u prahu visoke kakvoće. Za izradu baždarne krivulje izabrati uzorak sa najmanjom količinom mliječne kiseline, koji sadrži najviše 30 mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari. Provesti postupak opisan u točkama 6.2.1. i 6.2.2.

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Spektrofotometar s mogućnošću očitavanja na valnoj duljini 570 nm.

5.3. Vodena kupelj temperature $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.4. Tarionik i tučak.

5.5. Filtar papir (Schleicher i Schull 595, Whatman 1 ili papir jednake kakvoće).

5.6. Epruvete od pireksa ili jednake kakvoće (dimenzije 25 x 150 mm).

Napomena:

Svo stakleno posuđe i pribor moraju biti potpuno čisti i namijenjeni za upotrebu samo u ovom određivanju. Prije pranja stakleno posuđe i pribor koje sadrže ostatke taloga isprati koncentriranom kloridnom kiselinom.

6. Postupak

6.1. Slijepa proba

Provesti slijepu probu tako da se 30 mL vode stavi u graduiranu epruvetu od 50 mL i provesti postupak opisan u točkama 6.2.4. do 6.2.11. uključivo. Ukoliko slijepa proba s vodom prelazi ekvivalentnu količinu od 20 mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari, potrebno je provjeriti reagense i nečiste reagense ili reagens zamijeniti. Slijepu probu provesti paralelno s analizom uzorka.

6.2. Određivanje

Napomena:

Izbjegavati kontaminaciju nečistoćama, posebno slinom i znojem.

6.2.1. Odrediti količinu bezmasne suhe tvari a (u gramima) uzorka oduzimanjem količine masti (određene prema Metodi 4.) i količine vode (određene prema Metodi 2.) od 100.

6.2.2. Odvagati $\frac{1000}{(a-10)}$ uzorka s točnošću od 0,1 g. Ovu količinu uzorka dodati u 100 mL vode i temeljito promiješati.

6.2.3. 5 mL dobivene otopine otpipetirati u graduiranu epruvetu od 50 mL i razrijediti vodom do približno 30 mL.

6.2.4. Potresajući epruvetu polagano dodati 5 mL otopine bakrovog(II) sulfata (4.1.) i ostaviti stajati 10 minuta.

6.2.5. Potresajući epruvetu polagano dodati 5 mL suspenzije kalcijevog hidroksida (4.2.1.) ili 10 mL suspenzije kalcijevog hidroksida (4.2.2.).

6.2.6. Razrijediti vodom do 50 mL, snažno protresti. Ostaviti stajati 10 minuta, a zatim profiltrirati. Baciti prvi dio filtrata.

6.2.7. Otpipetirati 1 mL filtrata u epruvetu (5.6.).

6.2.8. U epruvetu dodati 6,0 mL otopine sumporne kiseline-bakrovog(II) sulfata pomoću birete ili graduirane pipete. Promiješati.

6.2.9. Zagrijavati u kipućoj vodenoj kupelji 5 minuta. Ohladiti na sobnu temperaturu pod mlazom tekuće vode.

6.2.10. Dodati dvije kapi reagensa p-hidroksifenila (4.4.) i snažno protresti kako bi se reagens ravnomjerno raširio u tekućini. Staviti epruvetu u vodenu kupelj na $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i ostaviti 15 minuta uz povremeno potresanje.

6.2.11. Staviti epruvetu u kipuću vodenu kupelj 90 sekundi. Ohladiti na sobnu temperaturu pod mlazom tekuće vode.

6.2.12. Izmjeriti apsorbanciju u odnosu na slijepu probu (6.1.) unutar tri sata na valnoj duljini navedenoj u točki 5.2.

6.2.13. Ukoliko je apsorbancija veća od najviše točke standardne krivulje, ponoviti test koristeći odgovarajući razrijeđeni filtrat dobiven u točki 6.2.6.

6.3. Priprema standarda

6.3.1. Otpipetirati 5 mL rekonstituiranog mlijeka (4.6.) u pet građiranih epruveta od 50 mL. U epruvete otpipetirati 0, 1, 2, 3 i 4 mL standardne otopine (4.5.) kako bi se dobio raspon standarda koji odgovaraju 0, 20, 40, 60 i 80 mg dodane mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari mlijeka u prahu.

6.3.2. Razrijediti vodom do približno 30 mL i provesti postupak opisan u točkama od 6.2.4. do 6.2.11.

6.3.3. Izmjeriti apsorbanciju standarda (6.3.1.) u odnosu na slijepu probu (6.1.) na valnoj duljini navedenoj u točki 5.2. Unijeti u graf apsorbancije za količine mliječne kiseline iz točke 6.3.1. odnosno 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg i 80 mg na 100 g bezmasne suhe tvari. Povuci pravac koji najbolje prolazi točkama i izraditi standardnu krivulju pomicanjem pravca paralelno na način da prolazi kroz ishodište.

7. Izražavanje rezultata

7.1. Metoda izračuna

Preračunati apsorbanciju izmjerenu u točkama 6.2.12. ili 6.2.13. u mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari u uzorku služeći se standardnom krivuljom. Dobiveni rezultat pomnožiti s faktorom razrjeđivanja u slučaju razrjeđivanja filtrata prema točki 6.2.13.

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 8 mg mliječne kiseline na 100 g bezmasne suhe tvari za količine do 80 mg. Za veće vrijednosti, ova razlika ne smije biti veća od 10% najmanje vrijednosti.

METODA

ODREĐIVANJE

(Modificirani Sanders-Sagerov postupak)

AKTIVNOSTI

7.

FOSFATAZE

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom opisuje određivanje aktivnosti fosfataze u:

- ekstra-masnom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelomično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

2. Definicija

Aktivnost fosfataze mlijeka u prahu je mjerilo količine prisutne aktivne alkalne fosfataze. Izražava se kao količina fenola u μg koji se oslobađa iz 1 mL rekonstituiranog mlijeka, određena opisanom metodom.

3. Princip

Aktivnost fosfataze mlijeka u prahu određuje se sposobnošću fosfataze da oslobodi fenol iz dinatrijevog fenil fosfata. Količina otpuštenog fenola, pod propisanim uvjetima, određuje se spektrofotometrijskim mjerenjem boje razvijene Gibbovim reagensom.

4. Reagensi

4.1. Otopina A

Pufer barijev borat hidroksid: $\text{pH } 10,6 \pm 0,1$ pri 20°C .

Otopiti 25,0 g barijevog hidroksida ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$) u vodi i razrijediti do 500 mL.

Otopiti 11,0 g borne kiseline (H_3BO_3) u vodi i razrijediti do 500 mL.

Zagrijati obje otopine do 50°C i promiješati. Protresti i ohladiti mješavinu na sobnu temperaturu. Podesiti pH na $10,6 \pm 0,1$ pomoću otopine barijevog hidroksida i filtrirati. Otopinu pohraniti u dobro zatvorenoj posudi. Prije upotrebe razrijediti pufer s jednakom količinom vode.

4.2. Otopina B

Pufer za razvijanje boje

Otopiti 6,0 g natrijevog metaborata (NaBO_2) (ili 12,6 g $\text{NaBO}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$) i 20,0 g natrijevog klorida (NaCl) u vodi i razrijediti vodom do 1000 mL.

4.3. Otopina C

Otopina puferskog supstrata.

4.3.1. Otopiti 0,5 g dinatrijevog fenil fosfata ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) u 4,5 mL otopine B (4.2.). Dodati 2 kapi otopine E (4.5.) i ostaviti da stoji 30 minuta. Ekstrahirati boju sa 2,5 mL

butanola (4.10). Ukoliko je potrebno ponoviti ekstrakciju boje. Nakon odvajanja butanol baciti. Ova se otopina može čuvati nekoliko dana u hladnjaku. Prije upotrebe još jednom razviti i ekstrahirati boju.

4.3.2. Otpipetirati 1 mL ove otopine u odmjernu tikvicu od 100 mL i dopuniti do oznake otopinom A. Pufersku otopinu pripremiti neposredno prije upotrebe.

4.4. Otopina D

Sredstvo za taloženje

Otopiti 3,0 g cinkovog sulfata ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) i 0,6 g bakrovog(II) sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) u vodi i dopuniti vodom do 100 mL.

4.5. Otopina E

Gibbov reagens

Otopiti 0,040 g 2,6-dibromokinona -1,4-kloroimida ($\text{OC}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{NCl}$) u 10 mL 96%-tnog etanola. Otopinu čuvati u boci od tamnog stakla u hladnjaku. Ovaj reagens baciti kada izgubi boju.

4.6. Pufer za razrjeđivanje boje

Razrijediti 10 mL otopine B (4.2.), pufera za razvijanje boje, vodom do 100 mL.

4.7. Otopina bakrovog sulfata

Otopiti 0,05 g bakrovog(II) sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) u vodi i dopuniti vodom do 100 mL.

4.8. Standardna otopina fenola

Otopiti $0,200 \pm 0,001$ g čistog fenola u vodi i dopuniti vodom do 100 mL u odmjernoj tikvici. Ova se otopina može čuvati nekoliko mjeseci u hladnjaku.

Razrijediti 10 mL ove otopine vodom do 100 mL. Ova razrijeđena otopina sadrži 200 μg fenola u 1 mL i može se upotrijebiti za pripremu jače razrijeđenih otopina.

4.9. Kipuća destilirana voda

4.10. n-butanol.

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Vodena kupelj, s termostatski reguliranom temperaturom od $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.3. Spektrofotometar s mogućnošću očitavanja na valnoj duljini 610 nm.

5.4. Filtar papir (Schleicher i Schull 597, Whatman 42 ili filter papir jednake kakvoće).

5.5. Kipuća vodena kupelj.

5.6. Aluminijska folija.

6. Postupak

Mjere opreza:

1. Izbjegavati direktno izlaganje sunčevoj svjetlosti.
2. Svo stakleno posuđe i pribor, čepovi i materijal za odstranjivanje moraju biti potpuno čisti. Preporučuje se ispiranje i prokuhavanje u vodi ili obrada parom.
3. Izbjegavati upotrebu plastičnih materijala (primjerice čepova) jer mogu sadržavati fenole.
4. Slina sadrži fosfatazu stoga se kontaminacija slinom u tragovima mora pažljivo izbjegavati.

6.1. Priprema uzorka

6.1.1. S točnošću od 0,1 g odvagati 10 g uzorka i otopiti u 90 mL vode. Temperatura za otapanje praha ni u kojem slučaju ne smije biti viša od 35°C.

6.2. Određivanje

6.2.1. U svaku od dvije epruvete staviti 1 mL rekonstituiranog mlijeka pripremljenog kako je opisano u točki 6.1.1.

6.2.2. Zagrijavati jednu od epruveta u kipućoj vodi dvije minute. Prekriti epruvetu i vodenu kupelj (5.5.) ili, primjerice, čašu aluminijskom folijom (5.6.) kako bi se osiguralo zagrijavanje cijele epruvete. Hladnom vodom ohladiti na sobnu temperaturu. Ovu epruvatu upotrijebiti za slijepu probu. U svim postupcima koji slijede s obje epruvete postupati jednako.

6.2.3. Dodati 10 mL otopine C (4.3.2.). Promiješati i staviti epruvetu u vodenu kupelj na 37°C (5.2.).

6.2.4. Inkubirati 60 minuta u vodenoj kupelji uz povremeno potresanje.

6.2.5. Epruvete odmah prebaciti u kipuću vodenu kupelj (5.5.) i zagrijavati dvije minute, a zatim ohladiti na sobnu temperaturu hladnom vodom.

6.2.6. Dodati 1 mL otopine D (4.4.), promiješati i filtrirati preko suhog filter papira. Baciti prve filtrate sve dok se ne dobije bistra tekućina.

6.2.7. 5 mL svakog filtrata staviti u epruvete, dodati 5 mL otopine B (4.2.) i 0,1 mL otopine E (4.5.). Promiješati.

6.2.8. Ostaviti da se boja razvija 30 minuta ne izlažući tekućinu direktnoj sunčevoj svjetlosti.

6.2.9. Izmjeriti apsorbanciju otopine uzorka u odnosu na slijepu probu, na valnoj duljini navedenoj u točki 5.3.

6.2.10. Ponoviti određivanje ukoliko je apsorbancija viša od apsorbancije standardnog uzorka sa 20 µg fenola pripremljenog kako je opisano u točki 7.

Ako se ta granica prijeđe, razrijediti odgovarajući volumen rekonstituiranog mlijeka prema točki 6.1.1. s odgovarajućim volumenom mlijeka koje je pažljivo prokuhano kako je opisano u točki 6.2.2. kako bi se inaktivirala prisutna fosfataza.

7. Izrada standardne krivulje

7.1. U četiri odmjerne tikvice od 100 mL otpipetirati 1, 3, 5 i 10 mL standardne otopine razrijeđene kako je opisano u točki 4.8. i dopuniti vodom do oznake. Ove otopine sadrže 2, 6, 10 i 20 µg fenola po mL.

7.2. U epruvete otpipetirati 1 mL vode ili 1 mL svake standardne otopine (7.1.) kako bi se dobila serija uzoraka koji sadrže 0 (vrijednost slijepe probe koja se dobiva upotrebom 1 mL vode)- 2-6-10 i 20 µg fenola.

7.3. U svaku epruvetu redom otpipetirati 1 mL otopine bakrovog(II) sulfata (4.7.), 5 mL puferske otopine za razrjeđivanje boje (4.6.), 3 mL vode i 0,1 mL otopine E. Promiješati.

7.4. Ostaviti epruvete 30 minuta na sobnoj temperaturi ne izlažući ih direktnoj sunčevoj svjetlosti.

7.5. Izmjeriti apsorbanciju otopina u svakoj epruveti, u usporedbi s vrijednosti slijepe probe, na valnoj duljini navedenoj u točki 5.3.

7.6. Izraditi standardnu krivulju unošenjem vrijednosti apsorbancije ovisno o količini fenola u µg kako je navedeno u točki 7.2.

8. Izražavanje rezultata

8.1. Izračun

8.1.1. Preračunati vrijednosti određene u točki 6.2.9. u µg fenola služeći se standardnom krivuljom.

8.1.2. Izračunati aktivnost fosfataze izraženu u µg fenola po mL rekonstituiranog mlijeka prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost fosfataze} = 2,4 \times P$$

pri čemu je:

P = količina fenola, prema točki 8.1.1., u µg

8.1.3. Ukoliko je bilo potrebno razrjeđivanje, navedeno u točki 6.2.10., pomnožiti rezultat dobiven u točki 8.1.2. sa faktorom razrjeđivanja.

8.2. 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 2 µg fenola oslobođenog iz 1 mL rekonstituiranog mlijeka.

METODA

ODREĐIVANJE

(Aschaffenburg-Müllen-ov postupak)

AKTIVNOSTI

8.

FOSFATAZE

1. Opseg i područje primjene

Ovom se metodom opisuje određivanje aktivnosti fosfataze u:

- ekstra-masnom mlijeku u prahu,
- punomasnom mlijeku u prahu,
- djelomično obranom mlijeku u prahu,
- obranom mlijeku u prahu.

2. Definicija

Aktivnost fosfataze mlijeka u prahu je mjerilo količine alkalne fosfataze prisutne u proizvodu. Izražava se kao količina p-nitrofenola u µg koji se oslobađa iz 1 mL rekonstituiranog uzorka, pod opisanim uvjetima.

3. Princip

Rekonstituirani uzorak razrjeđuje se puferskim supstratom pri pH 10,2 i inkubira pri temperaturi od 37°C dva sata. Alkalna fosfataza prisutna u uzorku u tim okolnostima oslobađa p-nitrofenol iz dodanog dinatrijevog p-nitrofenol fosfata. Oslobođeni p-nitrofenol određuje se direktnim uspoređivanjem sa standardnim obojenim staklima u jednostavnom komparatoru uz upotrebu reflektirane svjetlosti.

4. Reagensi

4.1. Puferska otopina natrijevog karbonata-bikarbonata

Otopiti 3,5 g bezvodnog natrijevog karbonata i 1,5 g natrijevog bikarbonata u vodi i razrijediti vodom do 1000 mL u odmjerneji tikvici.

4.2. Puferski supstrat

Otopiti 1,5 g dinatrijevog p-nitrofenilfosfata u puferu natrijevom karbonatu-bikarbonatu (4.1.) i razrijediti puferom (4.1.) do 1000 mL u odmjerneji tikvici.

Ova je otopina stabilna ukoliko se čuva u hladnjaku ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) mjesec dana, ali na tako pohranjenim otopinama mora se provesti kontrolno ispitivanje boje (vidjeti točku 6., Mjere opreza br. 3).

4.3. Otopine za bistenje.

4.3.1. Otopina cinkovog sulfata

Otopiti 30,0 g cinkovog sulfata (ZnSO_4) u vodi i razrijediti vodom do 100 mL u odmjernoj tikvici.

4.3.2. Otopina kalijevog heksacijanoferata(II)

Otopiti 17,2 g kalijevog heksacijanoferata(II) trihidrata ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$) i razrijediti vodom do 100 mL u odmjernoj tikvici.

5. Oprema

5.1. Analitička vaga

5.2. Vodena kupelj, s termostatski reguliranom temperaturom od $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.3. Komparator, sa specijalnim diskom koji sadrži standardna obojena stakla kalibrirana u μg p-nitrofenola po mL mlijeka i kivete dimenzija 2 x 25 mm.

6. Postupak

Mjere opreza:

1. Nakon upotrebe, epruvete isprazniti, isprati vodom, oprati u vrućoj vodi koja sadrži alkalni deterdžent te zatim temeljito isprati čistom vrućom tekućom vodom. Na kraju, prije upotrebe epruvete isprati vodom i osušiti.

2. Pipete temeljito isprati čistom hladnom tekućom vodom odmah nakon upotrebe, zatim isprati vodom i osušiti prije upotrebe.

3. Čepove epruveta temeljito isprati vrućom tekućom vodom odmah nakon upotrebe te zatim staviti u kipuću vodu dvije minute.

4. Otopina puferskog supstrata (4.2.) trebala bi ostati stabilna najmanje mjesec dana ukoliko se čuva u hladnjaku na temperaturi od 4°C ili nižoj. Bilo kakva nestabilnost označena je pojavom žute boje. Dok se rezultati ispitivanja uvijek očitavaju u odnosu na prokuhani kontrolni uzorak koji sadrži istu otopinu puferskog supstrata, upotreba otopine se ne preporuča ako je vrijednost boje veća od $10 \mu\text{g}$ kada se očitava u kiveti komparatora duljine 25 mm u odnosu na destiliranu vodu u drugoj kiveti duljine 25 mm.

5. Upotrebljavati posebnu pipetu za svaki uzorak i izbjegavati kontaminaciju pipete slinom.

6. Tijekom ispitivanja uvijek treba izbjegavati izlaganje sunčevoj svjetlosti.

6.1. Priprema uzorka

Otopiti 10 g praha u 90 mL vode. Temperatura za otapanje praha ne smije biti viša od 35°C.

6.2. Određivanje

6.2.1. Otpipetirati 15 mL puferskog supstrata (4.2.) u čistu, suhu epruvetu, te dodati 2 mL rekonstituiranog uzorka (6.1.) koji se ispituje. Začepiti epruvetu, promiješati okretanjem i staviti u vodenu kupelj na 37°C.

6.2.2. Istovremeno u vodenu kupelj staviti kontrolnu epruvetu koja sadrži 15 mL puferskog supstrata i 2 mL prokuhanog rekonstituiranog uzorka sličnoga onome koji se ispituje.

6.2.3. Nakon dva sata izvaditi obje epruvete iz vodene kupelji, dodati 0,5 mL cinkovog sulfata za taloženje (4.3.1.), ponovno začepiti, snažno protresti i ostaviti stajati tri minute. Dodati 0,5 mL kalijevog heksacijanoferata(II) za taloženje (4.3.2.), temeljito promiješati i filtrirati kroz nabrani filter papir i skupiti bistri filtrat u čistu epruvetu.

6.2.4. Prebaciti filtrat u 25 mm kivetu i usporediti sa filtratom prokuhanog kontrolnog uzorka u komparatoru koristeći poseban disk (5.3.).

7. Izražavanje rezultata

7.1. Izračun

Direktno očitavanje dobiveno u točki 6.2.4. bilježi se kao µg p-nitrofenola po mL uzorka ili po mL rekonstituiranog uzorka.

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 2 µg p-nitrofenola oslobođenog iz 1 mL rekonstituiranog mlijeka.

[1] Pravilnikom se preuzimaju odredbe Direktive Komisije 87/524/EEZ od 6. listopada 1987. o metodama uzorkovanja za kemijske analize ugušćenog mlijeka i mlijeka u prahu te odredbe Direktive Komisije 79/1067/EEZ od 13. studenog 1979. o metodama analiza ugušćenog mlijeka i mlijeka u prahu za prehranu ljudi