

848.

Na osnovu člana 91 stav 4 Zakona o bezbjednosti hrane („Službeni list CG“, broj 57/15), Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja donijelo je

P R A V I L N I K
O METODAMA ZA UZIMANJE UZORAKA I LABORATORIJSKA ISPITIVANJA TERMIČKI OBRAĐENOG I SIROVOG MLIJEKA*

Predmet

Član 1

Ovim pravilnikom propisuju se metode za uzimanje uzoraka i laboratorijska ispitivanja termički obrađenog mlijeka namijenjenog direktnoj ishrani ljudi i sirovog mlijeka.

Uzimanje uzoraka

Član 2

Uzimanje uzoraka za laboratorijska ispitivanja termički obrađenog mlijeka vrši se u skladu sa Prilogom 1 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Laboratorijska ispitivanja termički obrađenog mlijeka

Član 3

- (1) Laboratorijska ispitivanja termički obrađenog mlijeka vrše se u skladu sa Prilogom 2 koji je sastavni dio ovog pravilnika.
- (2) Laboratorijska ispitivanja termički obrađenog mlijeka obuhvataju određivanje:
 - sadržaja ukupne suve materije;
 - sadržaja masti;
 - sadržaja ukupne suve materije bez masti;
 - sadržaja ukupnog azota;
 - sadržaja proteina;
 - specifične mase.
- (3) Nakon izvršenih laboratorijskih ispitivanja sačinjava se izvještaj o ispitivanju termički obrađenog mlijeka u skladu sa Prilogom 1.

Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze u termički obrađenom mlijeku

Član 4

- (1) Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze vrši se prema ISO standardu 11816-1 kao referentne metode.
- (2) Aktivnost alkalne fosfataze izražava se u milijedinicama enzimske aktivnosti po litru (mU/l), s tim da je jedinica aktivnosti alkalne fosfataze količina enzima alkalne fosfataze koji katalizira transformaciju jednog mikromola supstrata u minutu.
- (3) Ukoliko je ispitivanjem utvrđena aktivnost alkalne fosfataze u kravljem mlijeku koja nije veća od 350 mU/l smatra se da je nalaz negativan.
- (4) Za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze mogu se koristiti alternativne metode ako su validovane prema referentnoj metodi iz stava 1 ovog člana u skladu sa međunarodno priznatim protokolima.

Ispitivanje sirovog mlijeka na broj mikororganizama i somatskih ćelija

Član 5

- (1) Za laboratorijsko ispitivanje sirovog mlijeka odnosno utvrđivanje broja mikroorganizama i somatskih ćelija koriste se sljedeće metode:
 - 1) EN ISO 4833 za broj mikororganizama na 30°C;
 - 2) ISO 13366-1 za broj somatskih ćelija.
- (2) Za laboratorijsko ispitivanje sirovog mlijeka odnosno utvrđivanje broja mikroorganizama i somatskih ćelija mogu se primjenjivati i alternativne analitičke metode koje su validovane prema metodama iz stava 1 ovog člana u skladu sa međunarodno priznatim protokolima.

Prestanak primjene

Član 6

Danom stupanja na snagu ovog pravilnika prestaje primjena Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka ("Službeni list SFRJ", broj 32/83).

Stupanje na snagu

Član 7

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom listu Crne Gore".

*U ovaj pravilnik prenesene su odredbe Odluke Savjeta 92/608/EEC od 14. novembra 1992. o propisivanju metoda analize i ispitivanja termički obrađenog mlijeka za direktnu ishranu ljudi / Council Decision 92/608/EEC of 14 November 1992 laying down methods for the analysis and testing of heat-treated milk for direct human consumption i odredbe Priloga VI.a Regulative Komisije (EZ) br. 2074/2005 od 5. decembra 2005. o utvrđivanju mjera za sprovođenje za određene proizvode na osnovu Regulative (EZ) br. 853/2004 Evropskog parlamenta i Savjeta i za organizaciju službenih kontrola na osnovu Regulative (EZ) br. 854/2004 Evropskog parlamenta i Savjeta i Regulative (EZ) br. 882/2004 Evropskog parlamenta i Savjeta, odstupanju od Ur Regulative (EZ) br. 852/2004 Evropskog parlamenta i savjeta i o izmjeni uredbi (EZ) br. 853/2004 i (EZ) br. 854/2004 / Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004.

Broj: 323-217/16-4

Podgorica, 29 . juna 2016. godine

Ministar,
Budimir Mugoša, s.r.

METODE ZA UZIMANJE UZORAKA ZA LABORATORIJSKO ISPITIVANJE SIROVOG I TERMIČKI OBRAĐENOG MLIJEKA

Dio I

OPREMA ZA UZIMANJE UZORAKA

1. Oprema za uzimanje uzoraka treba da je izrađena od nerđajućeg čelika ili drugog odgovarajućeg materijala adekvatne čvrstine i oblika koji odgovara njenoj namjeni (miješanje, uzimanje uzoraka).
2. Štapovi i miješalice za miješanje tečnosti u posudama (rezervoarima/tankovima i slično) treba da imaju dovoljno prostora za odgovarajuće miješanje proizvoda tako da ne uzrokuju nastajanje užeglog ukusa, a kašika treba da ima čvrstu ručku dovoljne dužine kako bi se omogućilo uzorkovanje na bilo kojoj dubini u posudi (rezervoaru/tanku i slično), s tim da kapacitet kašike ne može biti manji od 50ml.
3. Posude za uzorke i poklopci treba da budu od stakla, odgovarajućih metala ili plastike, a materijali od kojih je izrađena oprema za uzimanje uzoraka (uključujući posude i poklopce) ne treba da prouzrokuju promjene na uzorcima koje bi mogle uticati na rezultate ispitivanja. Površine opreme za uzorkovanje i posuda za uzorke treba da budu čiste, suve, glatke i bez pukotina sa zaobljenim rubovima.

Dio II

UZIMANJE UZORAKA

1. Način uzimanja uzora

Prije uzimanja uzoraka za laboratorijsko ispitivanje mlijeko treba promiješati ručno ili mašinski.

Uzorak se uzima odmah nakon miješanja, dok se mlijeko još kreće.

Zapremina uzetog uzorka treba da odgovara zahtjevima ispitivanja, a posuda za uzimanje uzoraka treba da bude skoro u potpunosti ispunjena uzetim uzorkom kako bi se omogućilo odgovarajuće miješanje sadržaja prije ispitivanja i izbjeglo mućkanje tokom transporta.

2. Ručno uzimanje uzoraka

2.1. Uzimanje uzoraka iz više posuda

Ukoliko se ukupna količina mlijeka iz koje treba uzeti uzorke nalazi u više posuda (rezervoara/tankova) uzima se reprezentativna količina mlijeka iz svake posude i zapisuje količina mlijeka koja je uzeta za uzorak.

U slučaju kada se ne uzimaju uzorci iz svake posude vrši se miješanje reprezentativnih količina uzetih uzoraka u omjerima proporcionalnim količini koja se nalazi u posudama iz kojih je uzet uzorak.

2.2. Uzimanje uzoraka iz velikih posuda –posude/rezervoari/tankovi koje služe za skladištenje, željeznički ili drumski prevoz mlijeka.

Prije uzimanja uzoraka mlijeka iz velikih posuda za skladištenje, željeznički ili drumski prevoz miješanje mlijeka vrši se po pravilu mašinskim miješalicama.

Vrijeme miješanja mlijeka zavisi od vremenskog perioda u kojem je mlijeko mirovalo.

Efikasnost miješanja utiče na sličnost rezultata ispitivanja koja su vršena na uzetim uzorcima iz različitih djelova pošiljke mlijeka ili na mjestu isticanja mlijeka iz ispusta posuda u periodu tokom pražnjenja posuda.

Postupak miješanja mlijeka (neobrađenog ili punomasnog) smatra se efikasnim ako razlika u količini masti koju sadrže dva uzeta uzroka iznosi manje od 0,1%.

U velikim posudama, rezervoarima ili tankovima sa ispustom na dnu za isticanje mlijeka može postojati manja količina mlijeka koja nije reprezentativna za cjelokupni sadržaj čak ni nakon miješanja, a u tom slučaju treba uzeti uzorke kroz gornji otvor.

Ako se uzorci uzimaju na mjestu za isticanje mlijeka iz posuda, treba ispustiti dovoljnu količinu mlijeka da protekne kako bi se obezbijedila reprezentativnost uzoraka u odnosu na ukupnu količinu mlijeka.

Miješanje sadržaja u velikim posudama koje služe za skladištenje, željeznički ili drumski prevoz može se vršiti:

- mašinskom miješalicom ugrađenom u posude koju pokreće električni motor;
- propelerom ili miješalicom koju pokreće električni motor, a koja je postavljena na otvor sa miješalicom uronjenom u mlijeko;
- ponovnim kruženjem mlijeka kroz ispusnu cijev koja je povezana sa pumpama za pražnjenje posuda i koja je provučena kroz gornji otvor u posudama koje služe za željeznički ili drumski prevoz;
- čistim filtriranim vazduhom pod kompresijom uz primjenu minimalnog pritiska i zapremine vazduha radi sprječavanja stvaranja užeglog ukusa.

3. Uzorkovanje termički obrađenog mlijeka za direktnu ishranu ljudi u pakovanju za prodaju na malo

Uzorci termički obrađenog mlijeka za direktnu ishranu ljudi koje se pakuje za prodaju na malo, treba da budu u originalnom pakovanju, a uzorci se uzimaju iz mašine za pakovanje ili prostorije za čuvanje i skladištenje mlijeka u objektu za preradu mlijeka odmah nakon prerade (pasterizovano mlijeko na dan prerade), po mogućnosti.

4. Identifikacija uzoraka

Uzeti uzorci mlijeka označavaju se identifikacionim kodom tako da se uzorak može odmah identifikovati.

5. Čuvanje, transport i skladištenje uzoraka

Čuvanje, transport i skladištenje uzoraka vrši se na način kojim se sprječava izlaganje stranim mirisima i direktnoj sunčevoj svjetlosti uzoraka uzetih u prozirnim posudama.

Uzorci se čuvaju i skladište na tamnom mjestu, kao i tokom transporta.

Prilog 2

METODE ZA LABORATORIJSKA ISPITIVANJA TERMIČKI OBRAĐENOG MLIJEKA

Dio I

Metoda za određivanje sadržaja ukupne suve materije

1. Oprema koja se koristi za određivanje suve materije

Za određivanje suve materije, koristi se i:

1.1. Analitička vaga osjetljivosti 0,1 mg;

1.2. Eksikator sa efikasnim sredstvom za sušenje (svježe osušeni silika-gel sa pokazateljom sadržaja vode);

1.3. Sušnica sa ventilatorom i temperaturom koja se održava na $(102 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ na cijelom radnom prostoru;

1.4. Posude sa ravnim dnom, visine 20mm do 25mm, obima 50mm do 75mm izrađene od odgovarajućeg materijala sa poklopcima koji dobro prijanjaju i lako se uklanjaju;

1.5. Ključalo vodenom kupatilu;

1.6. Homogenizator.

2. Priprema uzorka za ispitivanje

Isparavanje vode iz uzorka mlijeka koji se ispituje vrši se na temperaturi od $(102\pm 2)^{\circ}\text{C}$ u sušionici.

Voda koja se koristi za potrebe rastvaranja, razblaživanja i ispiranja mora biti destilovana, dejonizovana ili demineralizovana najmanje jednake čistoće.

Reagensi-hemikalije koje se koriste za laboratorijsko ispitivanje treba da imaju priznatu analitičku čistoću.

Uzorak mlijeka za ispitivanje treba zagrijati na temperaturi između 20°C i 25°C i detaljno promiješati kako bi se obezbijedila ravnomjerna distribucija masti u cijelom uzorku, s tima da treba izbjegavati snažno miješanje da ne bi došlo do pjenušanja mlijeka ili mućkanja masti.

U slučaju da je teško razbiti sloj pavlake, treba polako mlijeko zagrijati na temperaturi između 25°C i 40°C i pažljivo umiješati svu pavlaku sa zidova posude, a zatim uzorak ohladiti na temperaturi od 20°C - 25°C .

Pri disperziji masti može se koristiti homogenizator kao pomoćna oprema.

Ako uzorak sadrži odvojenu tečnu mast ili vidljive odvojene bijele čestice nepravilnog oblika koje prijanjaju uz zidove posude ne može se očekivati dobijanje tačnih rezultata.

3. Postupak

3.1. Priprema posuda

Priprema posuda obuhvata zagrijavanje posude sa ravnim dnom i poklopca u sušnici sa ventilatorom jedno pored drugog, na temperaturi održavanoj na $(102\pm 2)^{\circ}\text{C}$ najmanje 30 minuta, a nakon toga stavlja se poklopac na posudu i premješta u eksikator sa efikasnim sredstvom za sušenje, a zatim se hladi na sobnoj temperaturi (najmanje 30 minuta) i mjeri sa tačnošću od 0,1 mg. Prije sušenja posuda se zagrijava 30 minuta u ključalom vodenom kupatilu.

Posuda se zagrijava sa poklopcem pored nje, u sušnici sa ventilatorom dva sata na konstantnoj temperaturi od $(102\pm 2)^{\circ}\text{C}$, nakon zagrijavanja stavi se poklopac na posudu i izvadi se iz sušnice i ostavi da se u eksikatoru ohladi na sobnoj temperaturi (odnosno najmanje 30 minuta) i izmjeri sa tačnošću od 0,1mg.

Posuda se ponovo zagrijava, sa poklopcem pored nje, u sušnici jedan sat, stavlja se poklopac na posudu i vadi iz sušnice i ostavlja da se ohladi u eksikatoru, najmanje 30 minuta i mjeri sa tačnošću od 0,1mg.

Nakon hlađenja posude, vrši se ponovno zagrijavanje posude dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja postane manja od 0,5mg i zabilježi se najniža masa.

3.2. Ispitivani uzorak

Uzorak mlijeka koji se ispituje treba odmah izmjeriti sa tačnošću od 0,1mg a 3 do 5 g pripremljenog uzorka za ispitivanje staviti u pripremljenu posudu.

3.3. Određivanje

Prije sušenja posuda se zagrijava 30 minuta na ključalom vodenom kupatilu.

Zagrijavati posudu, sa poklopcem pored nje, u sušnici sa ventilatorom dva sata na konstantnoj temperaturi od $(102\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

Staviti poklopac na posudu i izvaditi je iz sušnice.

Ponovo zagrijati posudu, sa poklopcem pored nje, u sušnici jedan sat, zatim staviti poklopac na posudu, izvaditi je iz sušnice i ostaviti da se ohladi u eksikatoru najmanje 30 minuta i izmjeriti sa tačnošću od 0,1mg.

Ponoviti postupak iz stava 4 ove podtačke, dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja postane manja od 0,5mg i zabilježiti najnižu masu.

4. Izražavanje rezultata

4.1. Izračunavanje i formula

Ukupni sadržaj suve materije izračunava se formulom:

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

gdje je:

W_T = ukupni sadržaj suve materije u g na 100g;

m_0 = masa posude i poklopca, u gramima;

m_1 = masa posude, poklopca i ispitivanog uzorka, u gramima;

m_2 = masa posude, poklopca i suvog uzorka za ispitivanje, u gramima;

Dobijenu vrijednost zaokružiti sa tačnošću od 0,01% (maseni procenat).

Sadržaj ukupne suve materije je masa koja preostane po završetku tačno određenog postupka sušenja, a izražena je kao maseni procenat.

4.2. Preciznost

Ponovljivost (r): 0,10g ukupne suve materije na 100g proizvoda.

Obnovljivost (R): 0,20g ukupne suve materije na 100g proizvoda.

4.3. Kriterijumi preciznosti: ponovljivost (*repeatability*) i obnovljivost (*reproducibility*) kod ispitivanja mlijeka

Kriterijumi preciznosti: ponovljivosti i obnovljivosti koriste se u svim metodama ispitivanja mlijeka.

Ponovljivost (r) je vrijednost ispod koje se nalazi apsolutna razlika između dva pojedinačna rezultata ispitivanja dobijena primjenom istog postupka na istom materijalu za ispitivanje, pod istim uslovima (isti analitičar, ista oprema, ista laboratorija i kratki vremenski interval).

Obnovljivost (R) je vrijednost ispod koje se nalazi apsolutna razlika između dva pojedinačna rezultata ispitivanja dobijena primjenom istog postupka na istom materijalu za ispitivanje, pod različitim uslovima (drugi analitičar, druga oprema, druga laboratorija i/ili drugo vrijeme).

Dio II

ODREĐIVANJE SADRŽAJA MASTI

1. Određivanja sadržaja masti vrši se za sirovo mlijeko, punomasno mlijeko, djelimično obrano mlijeko i obrano mlijeko.

2. Sadržaj masti u mlijeku izražava se u masenim procentima.

3. Röse-Gottlieb metoda

Amonijačno-etanolni rastvor iz uzorka mlijeka ekstrahuje se pomoću dietiletra i petroletra, rastvarači se uklanjaju destilacijom ili uparavanjem a potom se određuje masa ekstrahovane supstance rastvorljive u petroletru.

4. Reagensi

Reagensi koji se koriste za ispitivanje mlijeka treba da budu odgovarajuće analitičke čistoće i ne smiju stvarati primjetan ostatak pri slijepoj probi.

Da bi se provjerio kvalitet reagenasa vrši se slijepa proba, a kao tara se koristi prazan balon, čaša ili metalna posuda za mjerenje, pripremljeni u skladu podtačkom 6.4 tačka 6 ovog dijela (kako bi se omogućila korekcija uticaja promjene u atmosferskim prilikama na rezultate mjerenja).

Ako ostatak korigovan za očiglednu promjenu mase tare prelazi 2,5mg, odvojeno se određuje ostatak rastvarača isparavanjem 100ml dietiletera iz podtačke 4.4 ove tačke i 100ml petroletra iz podtačke 4.5 ove tačke, tim redosledom, a za mjerenje koristi se tara.

Kada je talog veći od 2,5mg, rastvarač se prečišćava destilacijom ili se zamijeni.

4.1. Rastvor amonijaka koji sadrži približno 25% (m/m) NH_3 , a može se koristiti i rastvor amonijaka veće koncentracije u skladu stavom 1 podtačka 6.5 tačka 6 ovog dijela i podtačkom 2.1 tačka 2 dio VIII ovog priloga.

4.2. Etanol, najmanje 94% (v/v), etanol denaturisan metanolom može se koristiti ako je sigurno da to neće uticati na rezultate određivanja.

4.3. Rastvor kongo crvenog ili krezol crvenog: Rastvoriti 1g kongo crvenog ili krezol crvenog u vodi i razblažiti do 100ml.

Napomena: Korišćenje ovog rastvora nije obavezno u skladu sa stavom 2 podtačka 6.5 tačka 6 ovog dijela.

Ovaj rastvarač omogućava da se lakše uoči granica između sloja rastvarača i vodenog sloja, a mogu se koristiti i drugi vodeni rastvori u boji ako ne utiču na rezultate određivanja.

4.4. Dietiletar bez peroksida koji sadrži više od 2mg/kg antioksidansa i zadovoljava zahtjeve slijepe probe.

4.5. Petroletar sa opsegom ključanja između 30°C i 60°C.

4.6. Smješa rastvarača napravljena neposredno prije upotrebe miješanjem jednakih zapremina dietiletera iz podtačke 4.4 ove tačke i petroletra iz podtačke 4.5 ove tačke.

5. Oprema i pribor

Električna oprema koja se koristi mora biti u skladu sa posebnim propisima koji se odnose na korišćenje tih rastvarača jer određivanje uključuje korišćenje isparljivih i zapaljivih rastvarača.

Pored uobičajene laboratorijske opreme, koriste se:

5.1. Analitička vaga

5.2. Centrifuga u kojoj se mogu koristiti baloni za ekstrakciju masti ili epruvete u skladu sa podtačkom 5.6 ove tačke sa rotacionom frekvencijom od 500 do 600 obrtaja u minuti kako bi se stvorilo gravitaciono polje od 80g do 90g na spoljašnjim krajevima balona ili epruveta.

Napomena: Korišćenje centrifuge nije obavezno iz stava 5 podtačke 6.5. tačke 6 ovog dijela.

5.3. Destilaciona aparatura ili aparatura za uparavanje kojom se omogućava destilovanje rastvarača i etanola iz balona ili isparavanje iz čaša i posuda (pogledati tačke 6.5.12. i tačke 6.5.15.) na temperaturi koja ne prelazi 100°C.

5.4 Sušnica koja se zagrijava električnim putem, sa potpuno otvorenim ventilacionim otvorom/otvorima u kojoj se temperatura može održavati na $(102 \pm 2)^\circ\text{C}$ na cijelom radnom prostoru. Sušnica mora biti opremljena odgovarajućim termometrom.

5.5. Vodeno kupatilo u kojem se temperatura može održavati na 35°C - 40°C .

5.6. Baloni (tikvice) za ekstrakciju masti tipa Mojonnier

Napomena: Moguće je koristiti i epruvete za ekstrakciju masti sa sifonom ili nastavcima boce štrcaljke u skladu sa dijelom VII ovog priloga.

Baloni (ili epruvete) moraju imati čepove od brušenog stakla, kvalitetne plute ili drugog materijala na koji ne djeluju reagensi koji se koriste.

Čepove od plute treba ekstrahovati dietiletrom iz podtačke 4.4 tačka 4 ovog dijela, potopiti u vodu na 60°C ili više, najmanje 15 minuta, a nakon toga ostaviti da se ohlade u vodi kako bi ostali zasićeni pri korišćenju.

5.7. Stalak za držanje balona (ili epruveta) za ekstrakciju masti u skladu sa podtačkom 5.6. ove tačke.

5.8. Špric boca - za korišćenje smješe rastvarača iz podtačke 4.6. tačka 4 ovog dijela, ne može se koristiti plastična špric boca.

5.9. Posude za sakupljanje masti, (baloni sa ravnim dnom) ili Erlenmeyer-ove tikvice kapaciteta 125ml-250ml ili metalne posude. Ako se koriste metalne posude najbolje je da budu od nerđajućeg čelika, sa ravnim dnom, po mogućnosti sa izlivom i prečnikom od 80mm do 100mm i visine oko 50mm.

5.10. Sredstva za poboljšanje ključanja, bez masti, od neporoznog porcelana ili silicijum-karbida ili staklene kuglice (nije obavezno u slučaju metalnih posuda).

5.11. Menzure kapaciteta 5ml i 25ml.

5.12. Pipete sa označenom skalom kapaciteta 10ml.

5.13. Metalna kliješta za držanje balona, čaša ili posuda.

6. Postupak

Napomena: Druga mogućnost koja je opisana u Dijelu VII ovog priloga, je korišćenje epruveta za ekstrakciju masti sa sifonom ili nastavcima špric boce u skladu sa podtačkom 5.6. tačka 5 ovog dijela.

6.1. Priprema uzorka za ispitivanje

Prilagoditi temperaturu laboratorijskog uzorka na otprilike 35°C-40°C 15 minuta i to pomoću vodenog kupatila, prema potrebi i temeljno, ali lagano promiješati uzorak stalnim okretanjem boce sa uzorkom tako da ne nastane pjenušanje ili mućkanje i brzo ohladiti na otprilike 20°C.

6.2. Ispitivani uzorak

Promiješati uzorak za ispitivanje iz podtačke 6.1. ove tačke laganim prevrtanjem boce tri ili četiri puta i odmah izvagati, sa tačnošću od 1mg, 10g do 11g uzorka za ispitivanje, direktno ili iz razlike, i prenijeti ga u balon za ekstrakciju u skladu sa podtačkom 5.6. tačka 5 ovog dijela.

Ispitivani uzorak mora u cjelini biti u donjem (manjem) dijelu balona za ekstrakciju.

6.3. Slijepa proba

Istovremeno uraditi slijepu probu korišćenjem istog postupka i istog reagensa, ali tako da se umjesto ispitivanog uzorka stavi 10ml do 11ml vode.

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

6.4. Priprema posude za sakupljanje masti

Osušiti posudu iz podtačke 5.9 tačka 5 ovog dijela zajedno sa nekoliko komada sredstva za poboljšanje ključanja u skladu sa podtačkom 5.10 tačka 5 ovog dijela kako bi se uspostavilo lagano vrenje tokom narednog uklanjanja rastvarača u sušnici u skladu sa podtačkom 5.4 tačka 5 ovog dijela u trajanju od jedan sat.

Ostaviti posudu da se ohladi (ne u eksikatoru, ali zaštićeno od prašine) na temperaturi prostorije za mjerenje (staklene posude pustiti da se hlade najmanje jedan sat, metalne posude najmanje 30 minuta).

Koristiti kliješta za stavljanje posude na vagu i mjeriti sa tačnošću od 0,1mg, pri čemu treba izbjegavati promjene temperature.

6.5. Određivanje

Dodati 2 ml rastvora amonijaka iz podtačke 4.1 tačka 4 ovog dijela ili odgovarajuću zapreminu rastvora amonijaka veće koncentracije i temeljno promiješati sa ispitivanim uzorkom u manjem dijelu balona i nakon što se doda amonijak, izvršiti određivanje bez odlaganja.

Dodati 10ml etanola iz podtačke 4.12 tačka 4 ovog dijela i lagano, ali temeljno promiješati dozvoljavajući da sadržaj balona teče naprijed i nazad između njegova dva dijela; izbjegavati da

tečnost dođe preblizu vratu balona, zatim dodati dvije kapi rastvora kongo crvenog ili krezol crvenog u skladu sa podtačkom 4.3 tačka 4 ovog dijela, po slobodnom izboru.

Dodati 25ml dietiletera u skladu sa podtačkom 4.4 tačka 4 ovog dijela, zatvoriti balon plutanim čepom ili zatvaračem, natopljenim vodom u skladu sa podtačkom 5.6 tačka 5 ovog dijela i protresati balon umjerenom jačinom (kako bi izbjegli stvaranje postojećih emulzija) jedan minut u vodoravnom položaju, tako da manji dio stoji prema gore, povremeno dopustiti da se tečnost iz većeg dijela pretoči u manji dio, i prema potrebi ohladiti balon u tekućoj vodi, a zatim pažljivo ukloniti čep od plute ili drugi zatvarač, a onda pomoću špric boce iz podtačke 5.8 tačka 5 ovog dijela isprati čep i vrat balona sa malo smješe rastvarača iz podtačke 4.6 tačka 4 ovog dijela tako da isprani sadržaj uđe u balon.

Dodati 25ml petroletra iz podtačke 4.5 tačka 4 ovog dijela, ponovo zatvoriti balon natopljenim plutanim čepom ili drugim zatvaračem (ponovno nakvasiti uranjanjem u vodu) i lagano protresati balon 30 sekundi na način iz stava 3 ove podtačke.

Centrifugirati zatvoreni balon 1 do 5 minuta rotacionom frekvencijom od 500 do 600 obrtaja u minutu u skladu sa podtačkom 5.2 tačka 5 ovog dijela, a ako centrifuga nije na raspolaganju ostaviti zatvoreni balon da stoji na stalku u skladu sa podtačkom 5.7 tačka 5 ovog dijela najmanje 30 minuta dok se gornji sloj jasno i vidljivo ne odvoji od vodenog sloja, zatim, prema potrebi ohladiti balon pod tekućom vodom.

Pažljivo ukloniti plutani čep ili drugi zatvarač, isprati čep i unutrašnju stranu vrata balona sa malo smješe rastvarača u skladu sa podtačkom 4.6 tačka 4 ovog dijela tako da isprani sadržaj uđe u balon, a ako se granica nalazi ispod kraja vrata balona, malo ga podići iznad tog nivoa lagano ulivajući vodu niz zidove balona tako da se olakša prelivanje rastvarača.

Držeći balon za ekstrakciju za manji dio, pažljivo prelići najveću moguću količinu gornjeg sloja u pripremljene posude za sakupljanje masti u skladu sa podtačkom 6.4. ove tačke koje sadrže nekoliko komada sredstva za poboljšanje ključanja u skladu sa podtačkom 5.10 tačka 5 ovog dijela izbjegavajući izlivanje vodenog sloja.

Isprati spoljašnju stranu vrata balona za ekstrakciju sa malo smješe rastvarača u skladu sa podtačkom 4.6 tačka 4 ovog dijela, sakupljajući isprani sadržaj u posudu za sakupljanje masti i pazeći da se smješa rastvarača ne prelije preko spoljašnjeg dijela balona za ekstrakciju, a prema želji se rastvarač ili dio rastvarača mogu ukloniti iz posude destilacijom ili isparavanjem u skladu sa stavom 12 ove podtačke.

Dodati 5ml etanola u skladu sa podtačkom 4.2 tačka 4 ovog dijela sadržaju balona za ekstrakciju, pri tom koristeći etanol za ispiranje unutrašnjosti vrata balona i izmiješati u skladu sa stavom 2 ove podtačke.

Izvršiti drugu ekstrakciju ponavljanjem radnji opisanih u st. 3 do 8 ovog podtačke, ali koristeći samo 15ml dietiletra iz podtačke 4.4 tačka 4 ovog dijela i 15ml petroletra iz podtačke 4.5 tačka 4 ovog dijela, koristiti etar za ispiranje unutrašnjosti vrata balona za ekstrakciju, te podići granicu na sredinu vrata balona kako bi se omogućilo da konačno izlivanje rastvarača bude što potpunije, prema potrebi.

Izvršiti treću ekstrakciju daljim ponavljanjem radnji u skladu sa st. 3 do 8 ovog podtačke, ali koristeći samo 15ml dietil etra iz podtačke 4.4 tačka 4 ovog dijela i 15ml petroletra iz podtačke 4.5 tačka 4 ovog dijela, koristiti etar za ispiranje unutrašnjosti vrata balona za ekstrakciju, te podići granicu na sredinu vrata balona kako bi omogućili da konačno izlivanje rastvarača bude što potpunije, prema potrebi. Treća ekstrakcija se može preskočiti kod obranog mlijeka.

Rastvarače (uključujući etanol) iz balona ukloniti što potpunije postupkom destilacije, ili isparavanjem iz čaše ili posude u skladu sa podtačkom 5.3 tačka 5 ovog dijela, ispirajući

unutrašnjost vrata balona sa malo miješanog rastvarača u skladu sa podtačkom 4.6 tačka 4 ovog dijela prije započinjanja destilacije.

Posudu za sakupljanje masti zagrijavati (sa tikvicom pored nje kako bi para rastvarača isparila) jedan sat u sušnici u skladu sa podtačkom 5.3 tačka 5 ovog dijela, zatim ukloniti posudu za sakupljanje masti iz sušnice, ostaviti da se ohladi (ne u eksikatoru, ali zaštititi od prašine) na temperaturi prostorije za mjerenje (staklene posude treba da stoje najmanje sat vremena, a metalne posude najmanje 30 minuta) i izvršiti mjerenje sa tačnošću od 0,1mg., ne brisati posudu neposredno prije mjerenja, staviti je na vagu korišćenjem klijesta i naročito izbjegavati promjene temperature.

Ponavljati radnje iz stava 13 ove podtačke dok se masa posude za sakupljanje masti ne smanji za 0,5mg ili manje ili poveća između dva uzastopna mjerenja i zabilježiti najmanju izmjerenu masu posude za sakupljanje masti i ekstrahovane supstance.

Dodati 25ml petroletra u posudu za sakupljanje masti kako bi provjerili je li ekstrahovana supstanca u potpunosti rastvorljiva.

Lagano zagrijati i miješati rastvarač dok se sva mast ne istopi, a ako je ekstrahovana supstanca u potpunosti rastvorljiva u petroletru, uzima se da je masa masti razlika između konačne mase posude koja sadrži ekstrahovanu supstancu u skladu stavom 14 ove podtačke i početne mase iz podtačke 6.4. tačka 6 ovog dijela.

Ako je ekstrahovana supstanca u potpunosti rastvorljiva u petroletru, ili u slučaju sumnje, u potpunosti ekstrahovati mast iz posude ponavljanim ispiranjem toplim petroletru.

Pustiti sve tragove nerastvorne supstance da se slegnu i pažljivo izliti petroletrar bez uklanjanja nerastvorne supstance i ponoviti ovaj postupak još tri puta korišćenjem petroletra za ispiranje unutrašnjosti vrata posude.

Na kraju isprati spoljašnji dio vrha posude smješom rastvarača tako da se rastvarač ne proširi preko spoljašnje strane posude. Ukloniti paru petroletra iz posude jednosatnim zagrijavanjem posude u sušnici, pustiti da se ohladi i izmjeriti kako je opisano u st. 13 i 14 ove podtačke.

Uzima se da je masa masti razlika mase određene u stavu 14 ove podtačke i ove konačne mase.

7. Izražavanje rezultata

7.1. Izračunavanje i formula

Sadržaj masti izračunava se formulom:

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

gdje je:

F = sadržaj masti,

m_0 = masa ispitivanog uzorka iz podtačke 6.2 tačka 6 ovog dijela, u gramima;

m_1 = masa posude za sakupljanje masti i ekstrahovane supstance određene u stavu 14 podtačka 6.5 tačka 6 ovog dijela, u gramima;

m_2 = masa pripremljene posude za sakupljanje masti ili, u slučaju nerastvorljivih supstanci, posude za sakupljanje masti i nerastvorljivog taloga određenog u tački stavu 16 podtačka 6.5 tačka 6 ovog dijela, u gramima;

m_3 = masa posude za sakupljanje masti korišćene u slijepoj probi iz podtačke 6.3 tačka 6 ovog dijela i sav ekstrahovani materijal određen u stavu 14 podtačka 6.5 tačka 6 ovog dijela, u gramima,

m_4 = masa pripremljene posude za sakupljanje masti u skladu sa podtačkom 6.4 tačka 6 ovog dijela korišćene u slijepoj probi iz podtačke 6.3 tačka 6 ovog dijela ili, u slučaju nerastvorljive supstance, posude za sakupljanje masti i nerastvorljivog taloga određenog u stavu 16 podtačka 6.5 tačka 6 ovog dijela, u gramima.

Prikazati rezultat sa tačnošću od 0,01%.

7.2. Preciznost

Ponovljivost (r):

- za punomasno mlijeko i djelimično obrano mlijeko: 0,02g masti na 100g proizvoda,
- za obrano mlijeko: 0,0g masti na 100g proizvoda.

Obnovljivost (R):

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

Dio III

ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNE SUVE MATERIJBE BEZ MASTI

1. Primjena metode

Sadržaj ukupne suve materije bez masti u termički obrađenom mlijeku određuje se na osnovu referentne metode.

Ukupna suva materija bez masti mora se izraziti kao maseni procenat.

Sadržaj bezmasne suve materije je:

Sadržaj ukupne suve materije bez masti u skladu sa Dijelom I ovog priloga umanjen za sadržaj masti u skladu sa Dijelom II ovog priloga.

Dio IV

ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNOG AZOTA

1. Primjena metode

Sadržaj ukupnog azota u sirovom mlijeku i punomasnom mlijeku, djelimično obranom mlijeku i obranom mlijeku određuje se na osnovu referentne metode..

2. Definicija

Sadržaj ukupnog azota u mlijeku je sadržaj azota, izražen kao maseni procenat, koji je određen metodom po Kjeldahl-u.

3. Princip

Izmjerena količina uzorka mlijeka tretira se koncentrovanom sumpornom kisjelinom i kalijum-sulfatom i bakar(II)-sulfatom kao katalizatorom, kako bi se azot iz organskih jedinjenja preveo u amonijum-sulfat.

Amonijak se oslobađa dodavanjem rastvora natrijum-hidroksida, a zatim se destiluje i apsorbuje u rastvor borne kisjeline, koji se titruje kisjelim rastvorom.

4. Reagensi

4.1. Kalijum-sulfat (K_2SO_4)

4.2. Rastvor bakar-sulfata: Rastvoriti 5,0g bakar(II)-sulfata pentahidrata ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) u vodi i razblažiti do 100 ml (na 20 °C) u normalnom sudu.

4.3. Sumporna kisjeline, najmanje 98,0% (m/m) H_2SO_4 .

4.4. Rastvor natrijum-hidroksida, 47% (m/m): 704g NaOH/l (20°C).

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

4.5. Rastvor borne kisjeline: Rastvoriti 40g borne kisjeline (H_3BO_3) u 1 litru vruće vode, ostaviti da se ohladi i čuvati u boci od borosilikatnog stakla.

4.6. Rastvor indikatora: Rastvoriti 0,01g metil crvenog, 0,02g bromtimol plavog i 0,06g bromkrezol zelenog u 100ml etanola.

Rastvor čuvati u zatvorenoj braon boci, na hladnom i tamnom mjestu.

4.7. Volumetrijski rastvor: $c(\frac{1}{2} \text{H}_2\text{SO}_4)$ ili $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ standardizovan sa tačnošću od 0,0001 mol/l.

4.8. Saharoza bez azota

4.9. Amonijum so, čista, kao što je amonijum-oksalat $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, H_2O ili amonijum-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 mono- ili dihidrohlorid lizin ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ HCl ili $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$).

Napomena: Čistoća reagensa u skladu sa podtačkama 4.9 i 4.10 ove tačke trebala bi da bude veća od stepena „analitičke čistoće“, a ako je na raspolaganju, trebao bi se koristiti sertifikovani rastvor amonijum soli u skladu sa podtačkom 4.9 ove tačke.

5. Oprema i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, koriste se:

5.1. Kjeldahl-ove tikvice kapaciteta 500ml.

5.2. Odgovarajuća sredstva za poboljšanje ključanja, npr. staklene kuglice prečnika oko 5mm, Hengar-ove granule, kamen plavac.

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

5.4. Graduisane menzure, staklene, kapaciteta 50, 100 i 250ml.

5.5. Aparatura za digestiju u nagnutom položaju (oko 45°), sa električnim grijačima ili plinskim plamenicima koji ne zagrijavaju tikvicu iznad nivoa njenog sadržaja, sa sistemom za odvod para.

5.6. Destilaciona aparatura, napravljena od borosilikatnog stakla na koju se može spojiti Kjeldahl-ova tikvica iz podtačke 5.1 ove tačke.

Aparatura se sastoji od efikasne prskalice povezane sa efikasnim hladnjakom koji ima pravu unutrašnju cijev i odvodne cijevi povezane sa njegovim donjim krajem.

Crijeva za povezivanje i čep/čepovi moraju dobro prijanjati i po mogućnosti biti od neoprenske gume.

5.7. Pipeta ili automatska pipeta, sa mogućnošću odmjeravanja 0,10ml.

5.8. Konusne tikvice, kapaciteta 500ml, graduisane na 200ml.

5.9. Bireta kapaciteta 50ml, graduisana na 0,1ml, sa maksimalnom mogućnošću greške $\pm 0,05\text{ml}$.

5.10. Lupa za očitavanje birete u skladu sa podtačkom 5.9 ove tačke.

5.11. pH metar

5.12. Automatska bireta.

6. Postupak

6.1. U Kjeldahl-ovu tikvicu iz podtačke 5.1 tačka 5 ovog dijela dodati sredstva za poboljšanje ključanja iz podtačke 5.2 tačka 5 ovog dijela (tri staklene kuglice), 15g kalijum-sulfata iz podtačke 4.1 tačka 4 ovog dijela, 1,0ml rastvora bakar-sulfata iz podtačke 4.2 tačka 4 ovog dijela, otprilike 5g uzorka mlijeka (izmjerene sa tačnošću od 0,001g) i 25ml sumporne kiseline iz podtačke 4.3 tačka 4 ovog dijela, koristiti kiselinu za ispiranje rastvora bakar-sulfata, kalijum-sulfata ili mlijeka sa vrata tikvice i lagano promiješati sadržaj.

Napomena: Budući da organska supstanca troši sumpornu kiselinu tokom ključanja, za digestiju umjesto 25ml koristiti 30ml H_2SO_4 iz podtačke 4.3 tačka 4 ovog dijela, ako mlijeko sadrži više od 5,0% (m/m) masti. Isto bi trebalo učiniti i u slijepoj probi.

6.2. Zagrijati svaku Kjeldahl-ovu tikvicu na digestoru iz podtačke 5.5 tačka 5 ovog dijela u početku vrlo polako tako da crna pjena ostane unutar trbušastog dijela tikvice.

Kada prestane početno pjenjenje i pojavi se obilna bijela para, snažno prokuvati (kisela para će se kondenzovati 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 kuvati najmanje 1,5 sat.

Naročito treba obratiti pažnju na sljedeće:

- a) ne bi trebalo da prođe više od 1 sata da sadržaj tikvice postane bistar, a razgradnja ukupno ne smije trajati manje od 2,5 sata, a ako je potrebno više od jednog sata za razbistravanje, ukupno trajanje razgradnje povećava se prema tome.
- b) kalijum-sulfat koji je dodat podstiče digestiju jer podiže temperaturu ključanja smješe. Ako je preostala zapremina H_2SO_4 manja za otprilike 15ml na kraju razgradnje, azot je možda izgubljen zbog prekomjernog zagrijavanja. Kod plinskog grijanja tikvicu treba zagrijavati na ploči od toplotnog izolacionog materijala, sa kružnim otvorom takvog prečnika da slobodni plamen samo dodiruje dio tikvice koja je ispod površine tečnog sadržaja u skladu sa podtačkom 5.5 tačka 5 ovog dijela.
- c) ako crne čestice uđu u vrat tikvice i ne speru se u potpunosti u trbušasti dio tikvice kretanjem kiseline u početnim fazama perioda snažnog zagrijavanja (to bi se moglo olakšati okretanjem tikvice) treba pustiti da se tikvica dovoljno ohladi, zatim je pažljivo isprati minimalnom količinom vode i nakon toga nastaviti razgradnju kako je gore opisano.

6.3. Kada se Kjeldahl-ove tikvice u potpunosti ohlade, dodati 300ml vode (pogledati napomenu) u svaku, tako da se pažljivo ispere vrat tikvice i temeljno promiješa sadržaj pazeći na to da se rastvore kristali koji su se odvojili.

Dodati sredstva za poboljšanje ključanja iz podtačke 5.2 tačka 5 ovog dijela kako bi se obezbijedilo jednolično ključanje, zatim u svaku tikvicu dodati 70ml rastvora natrijum-hidroksida iz podtačke 4.4 tačka 4 ovog dijela (pogledati napomenu), lagano ulivajući rastvor kroz iskošeni vrat tikvice da se stvori donji sloj u trbušastom dijelu, ne kvasiti vrh vrata rastvorom natrijum-hidroksida.

Napomena: Neophodno je da zajednička zapremina vode i rastvora natrijum-hidroksida iznosi 370ml kako bi se omogućilo sakupljanje oko 150ml destilata prije nego što počne neujednačeno ključanje („lupanje”) u skladu sa podtačkom 6.4. ove tačke.

Ako se doda veća odgovarajuća zapremina rastvora natrijum-hidroksida koncentracije manje od 47% (m/m), zapremina dodate vode smanjuje se prema tome (npr: ako se doda 85ml 40% (m/m) ili 125ml 30% (m/m) rastvora natrijum-hidroksida, zapremina dodate vode iznosiće 285ml odnosno 245ml).

6.4. Odmah spojiti svaku Kjeldahl-ovu tikvicu na destilator iz podtačke 5.6 tačka 5 ovog dijela. Pobriniti se da vrh odvodne cijevi hladnjaka bude uronjen u 50ml borne kiseline iz podtačke 4.5 tačka 4 ovog dijela, zajedno sa 0,20ml (5-6 kapi) rastvora indikatora iz podtačke 4.6 tačka 4 ovog dijela u konusnoj tikvici iz podtačke 5.8 tačka 5 ovog dijela.

Kružno okrenuti sadržaj svake Kjeldahl-ove tikvice kako bi se u potpunosti promiješao i dovesti ga do ključanja, ali u početku lagano kako bi se spriječilo pretjerano stvaranje pjene, a nakon što se sakupi 100ml do 125ml destilata, spuštati svaku konusnu tikvicu dok se vrh odvodne cijevi hladnjaka ne nađe na otprilike 40mm iznad oznake za 200ml. Nastaviti sa svakom pojedinačnom destilacijom dok ne počne neujednačeno vrenje („lupanje”), a zatim odmah prestati sa zagrijavanjem i odvojiti sve Kjeldahl-ove tikvice i isprati vrh odvodnih cijevi hladnjaka pomoću malo vode, sakupljajući isprani sadržaj u konusnu tikvicu.

Naročito treba obratiti pažnju na sljedeće:

- a) stepen destilacije mora biti takav da se otprilike 150ml destilata sakupi kada započne neujednačeno vrenje („lupanje”), a zapremina sadržaja svake konusne tikvice tada će iznositi otprilike 200ml.

b) efikasnost svakog hladnjaka trebala bi biti takva da temperatura sadržaja svake konusne tikvice ne prelazi 25°C tokom destilacije.

6.5. Titrovati svaki destilat sa standardnim volumetrijskim rastvorom iz podtačke 4.7 tačka 4 ovog dijela dok pH ne bude $4,6 \pm 0,1$ i pri tome koristiti pH-metar i automatsku biretu, po želji.

Dodavanje indikatora pomaže pri provjeravanju pravilnog toka titracije.

Očitati vrijednosti na bireti sa tačnošću od 0,01ml pomoću lupe iz podtačke 5.10 tačka 5 ovog dijela, izbjegavajući greške vezane za meniskus.

Titriranje se može vršiti samo sa indikatorom.

Potrebno je nastaviti titraciju dok boja destilata ne postane jednaka boji prethodno pripremljenog rastvora od 150ml vode u koju je dodato 50ml rastvora borne kiseline i 0,20ml indikatora sadržanog u konusnoj tikvici iz podtačke 5.8 tačka 5 ovog dijela.

6.6. Slijepu probu vršiti u skladu sa podtač. 6.1 do 6.5 ove tačke, ali umjesto uzorka mlijeka za postupak uzeti 5ml destilovane vode i otprilike 0,1g saharoze bez azota.

Napomena: Za titraciju slijepog destilata potrebna je jako mala zapremina standardnog volumetrijskog rastvora iz podtačke 4.7 tačka 4 ovog dijela.

6.7. Redovno provjeravati tačnost postupka korišćenjem dvije probe za utvrđivanje prinosa metode prateći postupak u skladu sa podtač. 6.1 do 6.5 ove tačke.

Provjeriti dolazi li do gubitka azota zbog pretjeranog zagrijavanja ili mehaničkih curenja tokom destilacije i to korišćenjem uzorka koji se sastoji od 0,15g amonijum-oksalata ili sulfata iz podtačke 4.7 tačka 4 ovog dijela izmjerenog sa tačnošću od 0,001g i 0,1g saharoze bez azota.

Procenat prinosa azota mora iznositi između 99,0 i 100,0%.

Niži ili viši rezultati ukazuju na propuste u postupku i/ili netačne koncentracije standardnih rastvora iz podtačke 4.7 tačka 4 ovog dijela.

Provjeriti je li postupak razgradnje dovoljan za oslobađanje cjelokupnog proteinskog azota korišćenjem uzorka koji se sastoji od 0,20g čistog triptofana, 0,35g fenacetina ili 0,20g lizin hidrohlorida iz podtačke 4.10 tačka 4 ovog dijela.

Sva mjerenja trebala bi da budu izvršena sa tačnošću od 0,001g, a procenat prinosa azota trebao bi biti najmanje 98-99%.

7. Mjere bezbjednosti

Pri radu sa koncentrovanom sumpornom kiselinom i natrijum-hidroksidom i pri rukovanju sa Kjeldahl-ovim tikvicama, uvijek treba nositi laboratorijski mantil, zaštitne naočare i rukavice otporne na kiselinu a Kjeldahl-ove tikvice ne ostavljati bez nadzora tokom destilacije.

Zbog potencijalne opasnosti odmah zaustaviti destilaciju ako sadržaj tikvice prejako „lupa“.

Ako je struja isključena više od dva do tri minuta, spustite tikvicu za sakupljanje tako da destilacioni vršak bude van tečnosti.

8. Izražavanje rezultata

8.1. Izračunavanje i formula

Izračunavanje sadržaja azota (W_N), izraženo u gramima azota na 100g proizvoda, vrši se po sljedećoj formuli:

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

gdje je:

W_N =procenat azota;

V =zapremina standardnog volumetrijskog rastvora kiseline korišćene pri određivanju, u mililitrima,

V_0 =zapremina standardnog volumetrijskog rastvora kiseline korišćene u slijepoj probi, u

mililitrima;

c =koncentracija, izražena u molovima po litru standardnog volumetrijskog rastvora kiseline iz podtačke 4.7 tačka 4 ovog dijela;

m =masa ispitivanog uzorka u gramima.

Rezultat se zaokružuje na 0,001g na 100g.

8.2. Preciznost

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

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

9. Izmjene postupka

9.1. Koristiti opremu za digestiju sa cilindričnim tikvicama, umjesto digestora i Kjeldahl-ovih iz podtač. 5.1 i 5.5 tačka 5 ovog dijela.

U tom slučaju svaki uređaj treba zasebno provjeriti kako bi se utvrdile potencijalne nepravilnosti u skladu sa podtačkom 6.7 tačka 6 ovog dijela.

9.2. Koristiti destilaciju parom umjesto direktnog zagrijavanja tikvica iz podtačke 6.4 tačka 6 ovog dijela.

Kada instrument ne dopušta korišćenje destilovane vode, treba obratiti pažnju da li voda sadrži isparljive kiseline ili baze.

9.3. Ispitivani uzorak od 1g mlijeka (semi-makro Kjeldahl) može se koristiti umjesto 5g iz podtačke 6.1 tačka 6 ovog dijela ako:

- se količine reagensa korišćenog za mineralizaciju u skladu sa podtačkom 6.1 tačka 6 ovog dijela: H_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, K_2SO_4 , smanje u istom odnosu (1/5).
- se ukupno trajanje razgradnje u skladu sa podtačkom 6.2 tačka 6 ovog dijela smanji na 75 minuta.
- se količina rastvora natrijum-hidroksid u skladu sa podtačkom 6.4 tačka 6 ovog dijela smanji u istom odnosu (1/5).
- se mora koristiti standardni kisjeli rastvor iz podtačke 4.7 tačka 4 ovog dijela niže koncentracije (0,02 do 0,03 mol/l).

Napomena: Korišćenje jedne ili više od ovih mogućnosti prihvatljivo je samo ako su vrijednost ponovljivosti iz stava 1 podtačka 8.2 tačka 8 ovog dijela i rezultati dva ispitivanja tačnosti u skladu sa podtačkom 6.7. tačka 6 ovog dijela i u skladu sa uslovima propisanim ovom metodom.

Dio V

ODREĐIVANJE SADRŽAJA PROTEINA

1. Primjena metoda

Sadržaj proteina u termički obrađenom mlijeku određuje se referentnom metodom.

Termički obrađeno mlijeko namijenjeno za direktnu ishranu ljudi ima masu ne manju od 1.030 g/l utvrđenu u mlijeku na 15°C ili ekvivalentnu vrijednost dobijenu u potpuno bezmasnom mlijeku na 20°C i sadrži najmanje 28g/l proteina i ne manje od 8,50% bezmasne suve materije. Ovo podrazumijeva da se strožiji zahtjevi ne mogu postaviti za mlijeko namijenjeno za industriju.

2. Definicija

Sadržaj proteina je vrijednost koja se dobija množenjem sadržaja ukupnog azota, izraženog kao maseni procenat.

3. Izračunavanje

Sadržaj proteina u mlijeku kao maseni procenat = $6,38 \times$ sadržaj ukupnog azota N u mlijeku u %.

Dio VI ODREĐIVANJE SPECIFIČNE MASE

1. Predmet i područje primjene

Ovaj postupak definiše referentnu metodu za određivanje specifične mase sirovog mlijeka i punomasnog mlijeka, djelimično obranog mlijeka i obranog mlijeka na 20°C.

2. Definicija

Specifična masa mlijeka je odnos mase određene zapremine mlijeka na 20°C i mase iste zapremine vode na 20°C.

3. Princip

Specifična masa na 20°C određuje se hidrometrom.

4. Oprema i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, koriste se:

4.1. Hidrometar

Specifični gravitacioni hidrometar 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 i uporedna je sa njim; gornji dio cjevčice je zatvoren.

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

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

4.2. Cilindri (stakleni ili od nerđajućeg čelika).

Njihove minimalne dimenzije trebale bi biti sljedeće:

- unutrašnji prečnik približno 35mm;
- unutrašnja visina približno 225mm.

4.3. Vodeno kupatilo podešeno na $(20,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

4.4. Vodeno kupatilo podešeno na $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$.

4.5. Termometar, graduisan na 0,5°C.

5. Postupak

5.1. Promiješati uzorak okretanjem kako bi se raspršila mast i staviti ga u vodeno kupatilo iz podtačke 4.4 tačka 4 ovog dijela.

Pustiti da uzorak dostigne temperaturu od 40°C i održavati tu temperaturu pet minuta.

Temeljno promiješati laganim okretanjem kako bi bili sigurni da se mast ravnomjerno rasporedila. Ohladiti na 20°C u vodenom kupatilu iz podtačke 4.3 tačka 4 ovog dijela.

5.2. Temeljno promiješati uzorak laganim okretanjem kako bi se izbjegao ulazak vazduha.

Mlijeko usuti u cilindar iz podtačke 4.2 tačka 4 ovog dijela koji se mora držati nagnut kako bi izbjegli stvaranje pjene ili balončića. Koristiti dovoljnu količinu uzorka mlijeka kako bi bili sigurni da će se dio preliti iz cilindra kada se u uzorak uroni hidrometar iz podtačke 4.1 tačka 4 ovog dijela, pažljivo spustiti hidrometar u mlijeko i pustiti ga da slobodno pluta dok ne postigne ravnotežu.

Cilindar treba postaviti vertikalno.

Hidrometar treba biti namješten u sredini stuba tečnosti i ne bi trebao da dodiruje zidove cilindra.

5.3. Kada hidrometar postigne ravnotežu očitati oznaku na vrhu meniskusa.

5.4. Odmah nakon što se izvrši očitavanje na hidrometru staviti termometar iz podtačke 4.5 tačka 4 ovog dijela u uzorak i očitati temperaturu sa tačnošću od 0,5°C.

Temperatura ne smije odstupati više od $\pm 2^{\circ}\text{C}$ od 20°C .

6. Korekcija temperature

Ako temperatura uzorka mlijeka ne iznosi tačno 20°C pri mjerenju specifične mase, onda se dobijeni rezultat mora korigovati dodavanjem određenoj specifičnoj masi 0,0002 za svaki stepen Celzijusa iznad 20°C ili oduzimanjem 0,0002 za svaki stepen Celzijusa ispod 20°C .

Ova korekcija je jedino validna ako temperatura uzorka mlijeka odstupa do 5°C od 20°C .

7. Izražavanje rezultata

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

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

gdje je

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

MG = sadržaj masti u uzorku u g/l;

0,92 = gustina masti.

8. PRECIZNOST

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

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

Dio VII

ALTERNATIVNI POSTUPAK KOJI UKLJUČUJE KORIŠĆENJE EPRUVETA ZA EKSTRAKCIJU MASTI SA SIFONOM ILI NASTAVKOM ŠPRIC BOCE

1. Postupak

1.1. Priprema ispitivanog uzorka vrši se u skladu sa podtačkom 6.1 tačka 6 Dio II ovog priloga.

1.2. Ispitivani uzorak

Postupak se sprovodi u skladu sa podtačkom 6.2 tačka 6 Dio II ovog priloga, ali pri tome treba koristiti epruvete za ekstrakciju masti iz podtačke 5.6 tačka 5 Dio II ovog priloga.

Ispitivani uzorak treba u potpunosti staviti na dno epruvete za ekstrakciju.

1.3. Slijepa proba se vrši u skladu sa podtačkom 6.3 tačka 6 Dio II ovog priloga.

1.4. Priprema posude za sakupljanje masti se vrši u skladu sa podtačkom 6.4 tačka 6 Dio II ovog priloga.

2. Određivanje

2.1. Dodati 2ml rastvora amonijaka iz podtačke 4.1 tačka 4 Dio II ovog priloga ili jednaku zapreminu rastvora amonijaka veće koncentracije i temeljno promiješati sa prethodno pripremljenim ispitivanim uzorkom na dnu epruvete, a nakon dodavanja amonijaka izvršiti određivanje bez odgađanja.

2.2. Dodati 10ml etanola iz podtačke 4.2 tačka 4 Dio II ovog priloga i lagano, ali temeljno promiješati na dnu epruvete, prema potrebi dodati dvije kapi rastvora kongo crvenog ili krezol crvenog iz podtačke 4.3 tačka 4 Dio II ovog priloga.

2.3. Dodati 25ml dietiletra iz podtačke 4.4 tačka 4 Dio II ovog priloga, zatvoriti epruvetu plutenim čepom zasićenim vodom ili zatvaračem natopljenim vodom iz podtačke 5.6 tačka 5 Dio II ovog priloga i snažnije mućkati epruvetu, ali ne previše snažno (kako bi se izbjeglo nastajanje postojanih emulzija), i stalno je okretati jedan minut, prema potrebi, ohladiti epruvetu u tekućoj vodi, a zatim

pažljivo odstraniti pluteni čep ili drugi zatvarač i isprati čep i vrat epruvete sa malo smjese rastvarača iz podtačke 4.6 tačka 4 dio II ovog priloga korišćenjem špric boce iz podtačke 5.8 tačka 5 Dio II ovog priloga tako da isprani sadržaj uđe u epruvetu.

2.4. Dodati 25ml petroletra iz podtačke 4.5 tačka 4 Dio II ovog priloga, zatvoriti epruvetu sa ponovo natopljenim plutanim čepom ili drugim zatvaračem (ponovno ga natopiti uranjanjem u vodu) i lagano tresti epruvetu 30 sekundi u skladu sa podtačkom 2.3 ove tačke.

2.5. Centrifugirati zatvorenu epruvetu jedan do pet minuta sa rotacionom frekvencijom od 500 do 600 okretaja u minutu u skladu sa podtačkom 5.2 tačka 5 Dio II ovog priloga.

Ako centrifuga iz podtačke 5.2 tačka 4 Dio II ovog priloga nije na raspolaganju pustiti zatvorenu epruvetu da stoji u stalku iz podtačke 5.7 tačka 5 Dio II ovog priloga najmanje 30 minuta, dok gornji sloj ne postane bistar i jasno odvojen od vodenog sloja, prema potrebi ohladiti epruvetu pod tekućom vodom.

2.6. Pažljivo odstraniti pluteni čep ili drugi zatvarač i isprati čep i vrat epruvete sa malo smješe rastvarača tako da isprani sadržaj uđe u epruvetu.

2.7. Umetnuti sifonski nastavak ili nastavak špric boce u epruvetu i gurnuti prema dolje dugi unutrašnji kraj nastavka dok dovod ne bude otprilike 3mm iznad granice između slojeva. Unutrašnji krak nastavka treba da bude paralelan sa osom epruvete za ekstrakciju.

Pažljivo prelići gornji sloj iz epruvete u pripremljenu posudu za sakupljanje masti iz podtačke 6.4 tačka 6 Dio II ovog priloga koja sadrži nekoliko komada sredstva za poboljšanje ključanja iz podtačke 5.10 tačka 5 Dio II ovog priloga, u slučaju tikvica (neobavezno sa metalnim posudama), izbjegavajući da se pri tome prenese dio vodenog sloja, zatim isprati odvod nastavka sa malo smjese rastvarača, sakupljajući isprani sadržaj u posudu za sakupljanje masti.

2.8. Otpustiti nastavak iz vrata epruvete, lagano ga podići i isprati donji dio njegovog dužeg unutrašnjeg kraka sa malo smjese rastvarača.

Spustiti i ponovo ubaciti nastavak pa prenijeti isprani sadržaj u posudu za sakupljanje masti.

Isprati odvod nastavka sa malo smjese rastvarača, sakupljajući isprani sadržaj u posudi, a po potrebi rastvarač ili dio rastvarača mogu se ukloniti iz posude destilacijom ili isparavanjem, u skladu sa stavom 12 podtačka 6.5 tačka 6 Dio II ovog priloga.

2.9. Ponovo otpustiti nastavak iz vrata, polako podići nastavak i dodati 5ml etanola u sadržaj epruvete, koristeći etanol za ispiranje dugog unutrašnjeg kraka nastavka i promiješati u skladu sa podtačkom 2.2 ove tačke.

2.10. Izvršiti drugu ekstrakciju ponavljanjem postupka iz podtač. 2.3 do 2.8. ove tačke, ali pri tome koristiti samo 15ml dietiletra iz podtačke 4.4 tačka 4 Dio II ovog priloga i 15ml petroletra iz podtačke 4.5 tačka 4 dio II ovog priloga, upotrijebiti eter za ispiranje dugog unutrašnjeg kraka nastavka, dok se uklanja nastavak iz epruvete nakon prethodne ekstrakcije.

2.11. Izvršiti treću ekstrakciju ponavljanjem postupka iz podtač. 2.3 do 2.8. ove tačke koristeći 15ml dietiletra i 15ml petroletra i ispirajući dugi unutrašnji krak nastavka u skladu sa podtačkom 2.10 ove tačke.

Treća ekstrakcija se može izostaviti kod obranog mlijeka.

2.12. Postupa se u skladu sa st. 12 do 19 podtačka 6.5 tačka 6 Dio II ovog priloga.