

- b) određivanje udjela masti;
- c) određivanje udjela bezmasne suhe tvari;
- d) određivanje udjela ukupnog dušika;
- e) određivanje udjela proteina;
- f) određivanje specifične mase.

Članak 2.

(Izvedba referentnih metoda)

Izvedba referentnih metoda analiza, određivanja kriterija pouzdanosti i uzorkovanja provodi se sukladno odredbama propisanim u Aneksu I, koji je sastavni dio ovoga pravilnika.

Članak 3.

(Metode ispitivanja)

Metode iz članka 1. ovoga pravilnika propisane su u Aneksu II, koji je sastavni dio ovoga pravilnika.

DIO DRUGI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 4.

(Službena kontrola i inspekcijски nadzor)

Službena kontrola i inspekcijски nadzor provode se sukladno važećim propisima.

Članak 5.

(Prestanak važenja odredaba)

Danom stupanja na snagu ovoga pravilnika prestaju važiti odredbe Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka te metodama kemijskih i fizikalnih analiza mlijeka i mliječnih proizvoda ("Službeni list SFRJ", broj 32/83, i "Službeni list RBiH", broj 2/92) koje se odnose na metode uzorkovanja i fizikalno-kemijske analize mlijeka, te odredbe Uputstva o načinu uzimanja uzoraka za vršenje analiza i superanaliza namirnica i predmeta opće upotrebe ("Službeni list SFRJ", broj 60/78 i "Službeni list RBiH", broj 2/92) koje se odnose na toplinski obrađeno mlijeko.

Članak 6.

(Primjena Pravilnika)

Mlijeko uzorkovano i analizirano sukladno odredbama propisa navedenim u članku 4. ovoga pravilnika može se stavljati na tržište 12 mjeseci od dana stupanja na snagu ovoga pravilnika.

Članak 7.

(Stupanje na snagu)

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u "Službenom glasniku BiH".

VM broj 216/13
3. rujna 2013. godine
Sarajevo

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Vjekoslav Bevanda, v. r.

Na temelju članka 17. stavak 3. i članka 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i članka 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine, u suradnji s nadležnim tijelima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 62. sjednici održanoj 3. rujna 2013. godine, donijelo je

PRAVILNIK

O METODAMA ANALIZA TOPLINSKI OBRADENOG MLIJEKA ZA PREHRANU LJUDI

DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Članak 1.

(Predmet propisa)

- (1) Ovim se pravilnikom propisuju referentne metode uzimanja uzoraka i referentne metode analiza toplinski obrađenog mlijeka namijenjenog za prehranu ljudi radi kontrole kakvoće.
- (2) Referentne metode analiza toplinski obrađenog mlijeka su:
 - a) određivanje udjela ukupne suhe tvari;

ANEKS I.

DIO I. OPĆE ODREDBE

1. UVOD

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

2. REAGENSI

2.1. Voda

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

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

2.2. Kemijske tvari

Sve kemijske tvari koje se koriste moraju imati priznatu analitičku čistoću, osim ako nije drukčije navedeno.

3. OPREMA

3.1. Popis opreme

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

3.2. Analitička vaga

Pojam "analitička vaga" odnosi se na vagu osjetljivosti 0,1 mg.

4. IZRAŽAVANJE REZULTATA

4.1. Rezultati

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

4.2. Izračun masenog udjela

Ako nije drukčije navedeno, rezultati se moraju izračunavati kao maseni udio uzorka.

5. KRITERIJI PRECIZNOSTI: PONOVLJIVOST I OBNOVLJIVOST

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

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

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

5.1.3. Ako nije drukčije navedeno, za svaku pojedinu metodu vrijednosti kriterija ponovljivosti i obnovljivosti svakog postupka predstavljaju intervale s razinom pouzdanosti od 95% u skladu s odredbom članka 13. stavka (2) Zakona o standardizaciji Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", broj 19/01) BAS ISO 5725.

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

6. ANALITIČKO IZVJEŠĆE

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

DIO II. UZORKOVANJE TOPLINSKI OBRADENOG MLJEKA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. OPĆE ODREDBE

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

Ukoliko je to potrebno, nadležno tijelo ili ispitni laboratorij mora podučiti osoblje koje radi uzorkovanje tehnikama uzorkovanja, kako bi se osiguralo da uzorak bude reprezentativan i sukladan s cijelom serijom.

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

3. OPREMA ZA UZORKOVANJE

3.1. Opće odredbe

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

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

Materijali od kojih je izrađena oprema za uzorkovanje (uključujući spremnike i poklopce) ne smiju uzrokovati nikakve promjene na uzorcima koje bi mogle utjecati na rezultate analize. Sve površine opreme za uzorkovanje i spremnika za uzorke moraju biti čiste i suhe, glatke i bez pukotina, a rubovi im trebaju biti zaobljeni.

4. TEHNIKE UZORKOVANJA

4.1. Opće odredbe

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

Uzorak treba uzeti odmah nakon miješanja, dok se mlijeko još giba. Volumen uzorka treba odgovarati zahtjevima analize. Kapacitet korištenih spremnika za uzorke treba biti takav da su gotovo potpuno ispunjeni uzorkom i da se time omogući odgovarajuće miješanje sadržaja prije analize i izbjegne bućkanje tijekom transporta.

4.2. Ručno uzorkovanje

4.2.1. Uzorkovanje iz više posuda

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

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

4.2.2.1. Miješanje mlijeka odgovarajućim postupkom prije uzorkovanja.

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

Vrijeme miješanja odgovara vremenskom razdoblju u kojemu je mlijeko mirovalo. Potrebno je dokazati da učinkovitost postupka miješanja koji se primijeni pod bilo kojim okolnostima odgovara potrebama predviđene analize; kriterij učinkovitosti miješanja naročito utječe na sličnost

rezultata analize provedene na uzorcima uzetima ili iz različitih dijelova pošiljke, ili iz ispusta spremnika u razmacima tijekom pražnjenja. Postupak miješanja (neobrađenog ili punomasnog) mlijeka smatrat će se učinkovitim ako razlika u količini masti koju sadrže dva uzorka uzeta pod tim uvjetima iznosi manje od 0,1%. U velikoj posudi s ispuštom za izlivanje na dnu može na točki izlivanja postojati manja količina mlijeka koja nije reprezentativna za cjelokupni sadržaj, čak ni nakon miješanja. Stoga je bolje uzimati uzorke kroz gornji otvor. Ukoliko se uzorci uzimaju na ispustu za izlivanje, treba pustiti dovoljnu količinu mlijeka da proteče kako bi se osigurala reprezentativnost uzoraka u odnosu na cjelinu.

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

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

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

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

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

5. IDENTIFIKACIJA UZORKA

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

6. ČUVANJE, TRANSPORT I SKLADIŠTENJE UZORAKA

Laboratorij koji provodi analize dužan je pripremiti upute vezane za uvjete čuvanja (kemijske, temperaturne, prijevoza, skladištenja i vremenskih razdoblja između uzorkovanja i analize mlijeka prema vrsti mlijeka i postupku analize koji se koristi.

Upute trebaju sadržavati sljedeće:

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

ANEKS II.

DIO I. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNE SUHE TVARI 1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. NAČELO

Isparavanje vode iz uzorka za analizu na temperaturi od $102 \pm 2^\circ\text{C}$ u sušioniku.

4. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Potrebna laboratorijska oprema, a naročito:

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

5. PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU

Uzorak mlijeka treba zagrijati na temperaturu između 20 i 25°C . Temeljito promiješati kako bi se osigurala ravnomjerno raspoređivanje masti u cijelom uzorku. Izbjegavati previše snažno miješanje da ne bi došlo do pjenjenja mlijeka ili bućkanja masti. U slučaju da se pokaže da je teško raspršiti sloj vrhnja, treba polako zagrijati na temperaturu između 25 i 40°C i pažljivim miješanjem umiješati svo vrhnje sa stjenke spremnika. Brzo ohladiti uzorak na $20\text{--}25^\circ\text{C}$.

Može se koristiti homogenizator kao pomagalo pri raspršivanju masti.

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

6. POSTUPAK

6.1. Priprema posuda

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

6.2. Uzorak za analizu

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

6.3. Određivanje

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

6.3.2. Zagrijavati posudu, s poklopcem pokraj nje, u sušioniku (4.3.) dva sata na konstantnoj temperaturi od $102 \pm 2^\circ\text{C}$. Staviti poklopac na posudu i izvaditi je iz sušionika.

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

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

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

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

7.1. Izračun i formula

Izračun masenog udjela suhe tvari iz:

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

pri čemu je

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

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

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

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

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

7.2. Preciznost

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

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

DIO II. ODREĐIVANJE UDJELA MASTI

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. NAČELO

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

4. REAGENSI

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

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

4.1. Otopina amonijaka, koja sadrži otprilike 25% (m/m) NH_3 . Može se koristiti u točki 6.3. Koristiti praznu tikvicu, čašu ili metalnu zdjelu (5.8.) za mjerenje, pripremljene u skladu s točkom 6.4., kao taru (kako bi se omogućilo ispravljanje učinka promjena u atmosferskim prilikama na rezultate mjerenja). Ukoliko talog ispravljen za očitu promjenu mase tare prelazi 2,5 mg, potrebno je odvojeno odrediti talog otapala isparavanjem 100ml dietiletera (4.4.) i 100 ml petroletera (4.5.), tim redosljedom. Također koristiti taru za mjerenje. U slučaju da je talog veći od 2,5 mg, potrebno je pročistiti otapalo destilacijom ili ga zamijeniti.

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

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

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

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

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

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

5. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Upozorenje: Budući da određivanje uključuje korištenje hlapljivih i zapaljivih otapala, sva korištena električna oprema mora biti sukladna s propisima koji se odnose na korištenje tih otapala.

Potrebna laboratorijska oprema, a naročito:

5.1. Analitička vaga

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

Napomena: Korištenje centrifuge nije obvezno (6.5.5.).

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

5.4. Sušionik, koji se zagrijava električnim putem, s potpuno otvorenim ventilacijskim otvorom(ima), i u kojemu se temperatura može održavati na $102 \pm 2^\circ C$ na cijelom radnom prostoru. Sušionik bi trebao biti opremljen odgovarajućim termometrom.

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

5.6. Tikvice za ekstrakciju masti tipa Mojonnier

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

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

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

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

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

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

5.11. Menzure, kapaciteta 5 i 25ml.

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

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

6. POSTUPAK

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

6.1. Priprema uzorka za analizu

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

6.2. Uzorak za analizu

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

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

6.3. Slijepa proba

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

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

6.4. Priprema posude za sakupljanje masti

Osušiti posudu (5.9.) zajedno s nekoliko pomagala za ključanje (5.10.) kako bi se potaknulo lagano ključanje tijekom sljedećeg uklanjanja otapala u sušioniku (5.4.) u trajanju od jednog sata. Ostavite posudu da se ohladi (ne u eksikatoru, ali zaštitite od prašine) na sobnoj temperaturi za mjerenje (staklene posude pustiti da se hlade barem jedan sat, a metalne posude barem 30 minuta). Koristiti kliješta za stavljanje posude na vagu i provedite vaganje s točnošću od 0,1 mg, te pritom treba izbjegavati promjene temperature.

6.5. Određivanje

6.5.1. Dodati 2 ml otopine amonijaka (4.1.) ili odgovarajući volumen otopine amonijaka veće koncentracije i temeljito pomiješati s uzorkom za analizu u manjem dijelu tikvice. Nakon dodavanja amonijaka provesti analizu bez odgađanja.

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

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

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

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

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

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

6.5.7. Držeći tikvicu za ekstrakciju za manji dio, pažljivo prelići najveću moguću količinu gornjeg sloja u pripremljene posude za sakupljanje masti (6.4.) koje

sadrže nekoliko pomagala za ključanje (5.10.) u slučaju tikvice (po izboru s metalnim posudama), izbjegavajući izlijevanje vodenog sloja.

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

Prema želji se otapalo ili dio otapala može ukloniti iz posude destilacijom ili isparavanjem kako je opisano u točki 6.5.2.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.5.16. Ukoliko je ekstrahirana tvar u potpunosti topljiva u petroleteru ili u slučaju sumnje, u potpunosti ekstrahirati mast iz posude ponavljanim ispiranjem toplim petroleterom. Pustiti sve tragove netopljive tvari da se slegnu i pažljivo izliti petroleter bez uklanjanja netopljive tvari. Ponoviti ovaj postupak još tri puta korištenjem petroletera za ispiranje unutrašnjosti vrata posude.

Na kraju isprati vanjski dio vrha posude smjesom otapala tako da se otapalo ne proširi preko vanjske strane posude.

Ukloniti paru petroletera iz posude jednosatnim zagrijavanjem posude u sušioniku, pustiti da se ohladi i izmjeriti kako je opisano u točkama 6.5.13. i 6.5.14.

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

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

7.1. Izračun i formula

Izračunajte maseni udio masti iz:

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

pri čemu je

F = udio masti,

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

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

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

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

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

Prikazati rezultat s točnošću od 0,01 mg.

7.2. Preciznost

7.2.1. Ponovljivost (r):

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

7.2.2. Obnovljivost (R):

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

DIO III. ODREĐIVANJE UDJELA BEZMASNE SUHE TVARI

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA I IZRAČUN

Udio bezmasne suhe tvari izražava se kao maseni udio.

Udio bezmasne suhe tvari jest udio ukupne suhe tvari (pogledati Odjeljak I.) umanjen za udio masti (pogledati Odjeljak II.).

DIO IV. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNOG DUŠIKA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. NAČELO

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

4. REAGENSI

- 4.1. Kalijev sulfat (K_2SO_4).
- 4.2. Otopina bakrovog sulfata. Otopiti 5,0 g bakar(II)-sulfata pentahidrata ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) u vodi i razvodniti do 100 ml (na 20°C) u odmjerne tikvici.
- 4.3. Sumporna kiselina, barem 98,0% (m/m) H_2SO_4 .
- 4.4. Otopina natrijevog hidroksida, 47% (m/m) 704 g NaOH/ (20°C).
Napomena: Može se koristiti i otopina natrijevog hidroksida manje koncentracije, npr.: 40% (m/m) 572 g/l, 20°C; ili 30% (m/m) 399 g/l, 20°C.
- 4.5. Otopina borne kiseline. Otopiti 40 g borne kiseline (H_3BO_3) u jednoj litri vruće vode, ostaviti da se ohladi i spremi u bocu od borosilikatnog stakla.
- 4.6. Indikatorska otopina. Otopiti 0,01 g crvenog metila, 0,02 g plavog bromtimola i 0,06 g zelenog bromkrezola u 100 ml etanola. Spremiti otopinu u smeđu zatvorenu bocu na hladno i tamno mjesto.
- 4.7. Volumetrijska otopina $c(HCl) = 0,1$ mol/l standardizirana s točnošću od 0,0001 mol/l.
- 4.8. Saharoza bez dušika.
- 4.9. Amonijeva sol, čista, kao što su amonijev oksalat ($(NH_4)_2C_2O_4$, H_2O ili amonijev sulfat $(NH_4)_2SO_4$.
- 4.10. Triptofan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$), fenacetin ($C_{10}H_7CH_2CONH_2$) ili lizin mono- ili dihidroklorid ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ ili $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$).
Napomena: Čistoća reagensa u točkama 4.9. i 4.10. trebala bi biti iznad stupnja "analitičke čistoće". Ukoliko je na raspolaganju, trebala bi se koristiti certificirana otopinu amonijeve soli (4.9.).

5. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

- Potrebna laboratorijska oprema, a naročito:
- 5.1. Kjeldahlove tikvice kapaciteta 500 ml.
 - 5.2. Odgovarajuća pomagala za ključanje, npr. staklene kuglice promjera oko 5 mm, Hengarove granule, kamen plavac.
 - 5.3. Birete ili automatska pipeta, za doziranje 1,0 ml.
 - 5.4. Menzure s označenim ljestvicama, staklene, kapaciteta 50, 100 i 250 ml.
 - 5.5. Digestor u nagnutom položaju (oko 45°), s električnim grijačima ili plinskim plamenicima koji ne zagrijavaju tikvicu iznad razine njenog sadržaja, sa sustavom za ekstrahiranje dima.
 - 5.6. Destilator, izrađen od borosilikatnog stakla, na koji se može spojiti Kjeldahlovu tikvicu (5.1.) i koji se sastoji od učinkovite glave štrcaljke povezane s učinkovitim hladilom s ravnom unutarnjom cijevi i odvodnom cijevi povezanom s njegovim donjim završetkom; povezne cijevi i zatvarač(i) moraju dobro prijanjati i po mogućnosti biti od neoprenske gume.
 - 5.7. Pipeta ili automatska pipeta, za 0,1 ml.
 - 5.8. Čunjaste tikvice, kapaciteta 500 ml, građirane na 200 ml.
 - 5.9. Bireta kapaciteta 50 ml, građirana na 0,1 ml, s maksimalnom mogućnošću pogreške $\pm 0,05$ ml.
 - 5.10. Povećalo, za očitavanje birete (5.9.).

5.11. pH-metar

5.12. Automatska bireta.

6. POSTUPAK

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

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

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

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

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

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

6.3. Kada se Kjeldahlove tikvice potpuno ohlade, dodati 300 ml vode (pogledati napomenu) u svaku tako da se pažljivo ispere vrat tikvice, te temeljito promiješati sadržaj pazeći na to da se otope kristali koji su se odvojili. Dodati pomagala za ključanje (5.2.) kako bi se osiguralo jednolično ključanje. Zatim u svaku tikvicu dodati 70 ml otopine natrijevog hidroksida (4.4.) (pogledati napomenu) lagano ulijevajući otopinu kroz nakošeni vrat tikvice da se stvori donji sloj u trbušastom dijelu; ne močiti vrh vrata otopinom natrijevog hidroksida.

Napomena: Potrebno je da zajednički volumen vode i otopine natrijevog hidroksida iznosi 370 ml kako bi se omogućilo sakupljanje oko 150 ml destilata upravo prije nego što uslijedi neujednačeno ključanje. Stoga, ako se doda veći odgovarajući volumen otopine natrijevog hidroksida koncentracije manje od 47% (m/m), volumen dodane vode smanjit će se prema tome. Primjerice, ukoliko se doda 85 ml od 40% (m/m) ili 125 ml od 30% (m/m) otopine natrijevog hidroksida, volumen dodane vode iznositi će 285 ml ili 245 ml.

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

Treba znati sljedeće:

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

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

6.5. Titrirati svaki destilat sa standardnom volumetrijskom otopinom (4.7.) dok pH ne bude $4,6 \pm 0,1$, te pritom koristiti pH-metar i po želji automatsku biretu. Dodavanje indikatora pomaže pri provjeravanju pravilnog tijeka titracije. Očitati vrijednosti na bireti s točnošću od 0,1 ml pomoću povećala (5.10.), izbjegavajući greške vezane za menisk.

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

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

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

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

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

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

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

6.7.2. Provjeriti je li postupak razgradnje dovoljan za oslobađanje ukupnog proteinskog dušika korištenjem uzorka za analizu od 0,20 g čistog triptofana, 0,35 g fenacetina ili 0,20 g lizin hidroklorida (4.10.). Sva mjerenja trebala bi biti provedena s točnošću od 0,001 g. Najmanje 98-99 % dušika trebalo bi biti rekuperirano.

7. SIGURNOSNE MJERE

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

Nikad ne ostavljati Kjeldahlove tikvice bez nadzora tijekom destilacije. Zbog potencijalne opasnosti, odmah

zaustaviti destilaciju ako sadržaj tikvice ključa prejako. Ukoliko je struja isključena više od dvije do tri minute, spustiti tikvicu za sakupljanje tako da destilacijski vršak bude izvan tekućine.

8. IZRAŽAVANJE REZULTATA

8.1. Izračun i formula:

Izračunajte udio dušika (W_N), izraženo u gramima dušika na 100 g proizvoda, pomoću sljedeće formule:

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

pri čemu je:

W_N = udio dušika,

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

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

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

m = masa uzorka za analizu u gramima.

Zaokružiti rezultat na 0,001 g na 100 g.

8.2. Preciznost

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

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

9. IZMJENE POSTUPAKA

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

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

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

- količine reagensa korištenog za mineralizaciju (6.1.): H_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, K_2SO_4 , smanje u istom omjeru (1/5);
- ukupno trajanje razgradnje (6.2.) smanji na 75 minuta;
- količina otopina natrijevog hidroksida (6.3.) smanji u istom omjeru (1/5);
- mora koristiti standardna kisela otopina (4.7.) niže koncentracije (0,02 do 0,03 mol/l).

Napomena: Korištenje jedne ili više ovih mogućnosti prihvatljivo je samo ukoliko su vrijednost ponovljivosti (8.2.1.) i rezultati dviju provjera točnosti (6.7.) sukladni s uvjetima propisanim ovom metodom.

DIO V. ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. IZRAČUN

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

DIO VI. ODREĐIVANJE SPECIFIČNE MASE

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. NAČELO

Specifična masa na 20°C određuje se hidrometrom.

4. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Potrebna laboratorijska oprema, a naročito:

4.1. Hidrometar

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

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

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

4.2. Cilindri (stakleni ili od nehrđajućeg čelika).

Njihove minimalne dimenzije trebale bi biti sljedeće:

- unutarnji promjer otprilike 35 mm,

- unutarnja visina otprilike 225 mm.

4.3. Vodena kupelj regulirana na $20 \pm 0,1^\circ C$.

4.4. Vodena kupelj regulirana na $40 \pm 2^\circ C$.

4.5. Termometar, s označenom ljestvicom podijeljenom na $0,5^\circ C$.

5. POSTUPAK

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

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

5.3. Kada se hidrometar umiri, očitati oznaku na vrhu meniskusa.

5.4. Odmah nakon očitavanja na hidrometru staviti termometar (4.5.) u uzorak i očitati temperaturu s točnošću od $0,5^\circ C$. Temperatura ne smije odstupati $\pm 2^\circ C$ na $\pm 20^\circ C$.

6. ISPRAVAK TEMPERATURE

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

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

pri čemu je

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

MG = udio masti u uzorku, u g/l,

0,92 = gustoća masti.

8. PRECIZNOST

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

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

DODATAK (Aneksu II.)

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

A.1. POSTUPAK

A.1.1. Priprema uzorka za analizu

Pogledati 6.1.

A.1.2. Uzorak za analizu

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

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

A.1.3. Slijepa proba

Pogledati 6.3.

A.1.4. Priprema posude za sakupljanje masti

Pogledati 6.4.

A.1.5. Određivanje

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Treća ekstrakcija se može izostaviti u slučaju obranog mlijeka.

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