

ANALITSKE METODE DEHIDRIRANEGA KONZERVIRANEGA MLEKA**1. SPLOŠNO****2. DOLOČANJE SUHE SNOVI v:**

- nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe z uporabo metode 1 iz II. dela te priloge,
- nesladkanem kondenziranem mleku z uporabo metode 1 iz II. dela te priloge,
- nesladkanem kondenziranem delno posnetem mleku z uporabo metode 1 iz II. dela te priloge,
- nesladkanem kondenzirane posnetem mleku z uporabo metode 1 iz II. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem mleku z uporabo metode 1 iz II. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku z uporabo metode 1 iz II. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem posnetem mleku z uporabo metode 1 iz II. dela te priloge.

3. DOLOČANJE VLAGE v:

sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe z uporabo metode 2 iz III. dela te priloge,

- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu z uporabo metode 2 iz III. dela te priloge,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu z uporabo metode 2 iz III. dela te priloge,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu z uporabo metode 2 iz III. dela te priloge.

4. DOLOČANJE MAŠČOBE v:

nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe z uporabo metode 3 iz IV. dela te priloge,

- nesladkanem kondenziranem mleku z uporabo metode 3 iz IV. dela te priloge,
- nesladkanem kondenziranem delno posnetem mleku z uporabo metode 3 iz IV. dela te priloge,
- nesladkanem kondenziranem posnetem mleku z uporabo metode 3 iz IV. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem mleku z uporabo metode 3 iz IV. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku z uporabo metode 3 iz IV. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem posnetem mleku z uporabo metode 3 iz IV. dela te priloge,
- sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe z uporabo metode 4 iz V. dela te priloge,
- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu z uporabo metode 4 iz V. dela te priloge,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu z uporabo metode 4 iz V. dela te priloge,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu z uporabo metode 4 iz V. dela te priloge.

5. DOLOČANJE SAHAROZE v:

- sladkanem kondenziranem mleku z uporabo metode 5 iz VI. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku z uporabo metode 5 iz VI. dela te priloge,
- sladkanem kondenziranem posnetem mleku z uporabo metode 5 iz VI. dela te priloge.

6. DOLOČANJE MLEČNE KISLINE IN LAKTATOV v:

- sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe z uporabo metode 6 iz VII. dela te priloge,
- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu z uporabo metode 6 iz VII. dela te priloge,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu z uporabo metode 6 iz VII. dela te priloge,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu z uporabo metode 6 iz VII. dela te priloge.

7. DOLOČANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE v:

- sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mlečnem prahu z visoko vsebnostjo maščobe z uporabo metode 7 ali 8 iz VIII. oziroma IX. dela te priloge,
- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu z uporabo metode 7 ali 8 iz VIII. oziroma IX. dela te priloge,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu z uporabo metode 7 ali 8 iz VIII. oziroma IX. dela te priloge,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu z uporabo metode 7 ali 8 iz VIII. oziroma IX. dela te priloge.

I. SPLOŠNE DOLOČBE

1. Priprava vzorca za kemijsko analizo

- 1.1 *nesladkano kondenzirano mleko z visoko vsebnostjo maščobe*
nesladkano kondenzirano mleko
nesladkano kondenzirano delno posneto mleko
nesladkano kondenzirano posneto mleko

Zaprto konzervo stresemo in obrnemo. Odpremo konzervo in počasi zlijemo mleko v drugo posodo, ki se jo da nepredušno zapreti, ter mešamo s ponavljajočim prelivanjem. Zagotoviti moramo, da je vsa preostala maščoba in mleko, ki se trdno drži sten in koncev konzerve premešana z vzorcem. Posodo zapremo. Če vsebina ni homogena, segrejemo posodo v vodni kopeli pri 40 °C. Močno stresemo vsakih 15 minut. Po dveh urah odstranimo posodo iz vodne kopeli in jo ohladimo na sobno temperaturo. Odstranimo pokrov in temeljito premešamo vsebino posode z žlico ali lopatico (če se je maščoba ločila, se vzorca ne sme analizirati). Shranimo na hladnem.

- 1.2 *sladkano kondenzirano mleko*
sladkano kondenzirano delno posneto mleko
sladkano kondenzirano posneto mleko

Konzerve: Zaprto konzervo segrevamo v vodni kopeli pri 30 do 40 °C približno 30 minut. Konzervo odpremo in temeljito premešamo vsebino z lopatico ali žlico z gibi navzgor, navzdol in krožnimi gibi, da dobimo dobro mešanico zgornjih in spodnjih plasti z vso vsebino. Zagotoviti moramo, da je preostalo mleko, ki se drži sten in koncev konzerve vključeno v vzorec. Kolikor je mogoče, vsebino prelijemo v drugo posodo z nepredušnim pokrovom. Zapremo posodo in jo shranimo na hladno.

Tube: Prerežemo na vrhu in prelijemo vsebino v posodo z nepredušnim pokrovom. Nato prerežemo tube po dolžini. Postrgamo ves material, ki se drži notranjosti in ga previdno zmešamo s preostalo vsebino. Posodo shranimo na hladno.

- 1.3 *sušeno mleko z visoko vsebnostjo maščobe ali mleko v prahu z visoko vsebnostjo maščobe*
sušeno polno mleko ali polnomastno mleko v prahu
sušeno delno posneto mleko ali delno posneto mleko v prahu
sušeno posneto mleko ali posneto mleko v prahu

Mleko v prahu prenesemo v čisto, suho posodo (z nepredušnim pokrovom), ki ima dvakratno prostornino mleka v prahu. Posodo takoj zapremo in mleko v prahu temeljito premešamo s ponavljajočim tresenjem in obračanjem posode. Med pripravo vzorca se je treba, kolikor je le mogoče, izogibati izpostavljanju mleka v prahu atmosferi, da zmanjšamo absorpcijo vlage.

2. Reagenti

2.1 *Voda*

2.1.1 Kadar se omenja uporaba vode za raztapljanje, redčenje ali izpiranje, uporabljamo destilirano vodo ali demineralizirano vodo vsaj enakovredne čistosti.

2.1.2 Kadar se omenja 'raztapljanje', 'raztopina' ali 'redčenje' brez dodatnih navedb, to pomeni 'raztapljanje v vodi', 'raztopina v vodi' in 'redčenje v vodi'.

2.2 *Kemikalije*

Vse uporabljene kemikalije morajo biti prepoznane kakovosti za analizo (p.a.), razen če s to prilogo ni drugače določeno.

3. Oprema

3.1 *Seznami opreme*

Seznami opreme vsebujejo samo predmete za posebno uporabo in predmete s posebno specifikacijo.

3.2 *Analitska tehtnica*

Analitska tehtnica pomeni tehtnico s točnostjo 0,1 mg.

4. Podajanje rezultatov

4.1 Izračun odstotkov

Razen če ni drugače določeno, so rezultati izračunani kot masni delež, izražen v odstotkih, glede na vzorec, ki ga je prejel laboratorij.

4.2 Število signifikantnih števil

Rezultat ne sme vsebovati več signifikantnih števil, kot je to upravičeno glede na natančnost uporabljene analitske metode.

5. Preskusno poročilo

Preskusno poročilo mora navesti uporabljeno analitsko metodo kot tudi dobljene rezultate. Poleg tega mora vsebovati vse podrobnosti postopka, ki niso opredeljeni v analitski metodi ali so opcija, kot tudi vse okoliščine, ki bi lahko vplivale na dobljene rezultate. Preskusno poročilo mora podati vse informacije potrebne, za popolno identifikacijo vzorca.

II. DOLOČANJE VSEBNOSTI SUHE SNOVI (sušilnik 99 °C)

METODA 1

1. Namen in področje uporabe

Ta postopek določa vsebnost suhe snovi v:

- nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe
- nesladkanem kondenziranem mleku
- nesladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,
- nesladkanem kondenziranem posnetem mleku,
- sladkanem kondenziranem mleku,
- sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,
- sladkanem kondenziranem posnetem mleku.

2. Definicija

Vsebnost suhe snovi v kondenziranem mleku: vsebnost suhe snovi kot je določena z navedeno metodo.

3. Princip metode

Znano količino vzorca razredčimo z vodo, premešamo s peskom in posušimo na temperaturi $99\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Masa po sušenju je masa suhe snovi in se izračuna kot masni delež, izražen v odstotkih, glede na vzorec.

4. Reagenti

Kremenčev pesek ali morski pesek, obdelan z klorovodikovo kislino (velikost zrn: 0,18 do 0,5 mm, ki se preseje skozi sito 500 mikronov in ki ostane na situ 180 mikronov). Le-ta mora ustrezati naslednjemu kontrolnemu testu:

Dve uri segrevamo približno 25 g peska v sušilniku (5.3), kot je opisano v 6.1 do 6.3. Dodamo 5 ml vode, ponovno segrevamo v sušilniku dve uri, ohladimo in ponovno stehamo. Razlika med dvema masama ne sme preseči 0,5 mg.

Če je potrebno, tri dni obdelujemo pesek s 25 % raztopino klorovodikove kisline, ter občasno premešamo. Operemo z vodo, da ni več kisle reakcije ali dokler ni voda brez klorida. Posušimo pri 160 °C in ponovno preskusimo, kot je navedeno zgoraj.

5. Oprema

5.1 Analitska tehtnica

5.2 *Kovinske posode*, po možnosti iz niklja, aluminija ali nerjavečega jekla. Posode morajo imeti pokrove, ki se dobro prilegajo in se z lahkoto odstranijo. Posode primerne dimenzije imajo premer od 60 do 80 mm in globino približno 25 mm.

5.3 *Sušilnik za sušenje pri atmosferskem tlaku*, z dobrim prezračevanjem, s termostatsko regulacijo temperature na $99\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Temperatura mora biti enakomerna v celotnem sušilniku.

5.4 *Eksikator*, ki vsebuje sveže aktiviran silikagel z indikatorjem za vsebnost vode ali enakovredno sušilo.

5.5 *Steklene palčke*, sploščene na enem delu, z dolžino, ki se prilagaja notranjosti kovinskih posodic (5.2).

5.6 *Vodna kopel*, pri temperaturi vrelišča vode.

6. Postopek

6.1 V posodo (5.2) damo približno 25 g peska (4) in kratko stekleno palčko (5.5).

6.2 Ne da bi jo pokrili, posodo z vsebino in s pokrovom postavimo v sušilnik (5.3) in segrevamo dve uri.

6.3 Posodo pokrijemo s pokrovom in jo prenesemo v eksikator (5.4). Pustimo, da se shladi na sobno temperaturo in natančno stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_0).

6.4 Posodo nagnemo, da pesek zdrsne na eno stran posode. Na izpraznjeni prostor damo približno 1,5 g vzorca sladkanega zgoščenega mleka ali 3,0 g nesladkanega kondenziranega mleka. Pokrijemo s pokrovom in stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_1).

6.5 Odstranimo pokrov, dodamo 5 ml vode in s stekleno palčko najprej premešamo tekočini ter nato še pesek in tekoči del. Palčko pustimo v mešanici.

6.6 Postavimo posodo v vrelo vodno kopel (5.6), dokler voda ne izpari. To ponavadi traja 20 minut. S palčko občasno premešamo mešanico, da je masa dobro prezračena in da se ne sprime, ko je suha. Palčko položimo v posodo.

6.7 Posodo in pokrov postavimo v sušilnik za eno uro in pol.

6.8 Ponovno pokrijemo posodo, jo prenesemo v eksikator (5.4) in pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo ter jo nato stehtamo s točnostjo 0,1 mg.

6.9 Posodo in pokrov ponovno postavimo v sušilnik, posodo odkrijemo in jo odkrito segrevamo s pokrovom še eno uro.

6.10 Ponovimo postopek 6.8.

6.11 Ponovimo opisane postopke 6.9 in 6.10, dokler ni razlika v masi dveh zaporednih tehtanj manj kot 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do porasta mase, v izračunu (7.1) uporabimo najnižjo dobljeno maso. Končna zabeležena masa naj bo M_2 , izražena v g.

7. Podajanje rezultatov

7.1 Metoda izračuna

Vsebnost suhe snovi, izračunane kot masni delež, izražen v odstotkih, glede na vzorec, se izraža kot:

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

kjer je:

M_0 – masa posode, pokrova in peska po postopku 6.3, v g;

M_1 – masa posode, pokrova, peska in vzorca po postopku 6.4, v g;

M_2 – masa posode, pokrova, peska in posušenega vzorca po postopku 6.11, v g.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultata dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presegati 0,2 g suhe snovi na 100 g izdelka.

8. Izračun skupne suhe snovi mleka in suhe snovi mleka brez maščobe

8.1 *Skupna vsebnost suhe snovi sladkanega kondenziranega mleka* se določi z:
skupna suha snov (dobljena z metodo 1, II. dela) - saharoza (dobljena z metodo 5, II. dela).

8.2 *Vsebnost suhe snovi sladkanega kondenziranega mleka brez maščobe* se določi z:

skupna suha snov (dobljena z metodo 1, II. dela) - (vsebnost saharoze dobljena z metodo 5, II. dela) in vsebnost maščobe (dobljena z metodo 3, II. dela).

8.3 *Vsebnost suhe snovi nesladkanega kondenziranega mleka brez maščobe* se določi z:
skupna suha snov (dobljena z metodo 1, II. dela) - vsebnost maščobe (dobljena z metodo 3, II. dela).

III. DOLOČANJE VLAGE (sušilnik 102 °C)

METODA 2

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda določa izgubo mase po sušenju:

- sušenega mleka z visoko vsebnostjo maščobe ali mleka v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,
- sušenega polnega mleka ali polnomastnega mleka v prahu,
- sušenega delno posnetega mleka ali delno posnetega mleka v prahu,
- sušenega posnetega mleka ali posnetega mleka v prahu.

2. Definicija

Vsebnost vlage: izguba mase po sušenju, kot je določena z navedeno metodo.

3. Princip

Preostala masa preiskovanega dela se določi po sušenju pri atmosferskem tlaku v sušilniku pri $102\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ do konstantne mase. Izguba mase se izračuna kot masni delež, izražen v odstotkih, glede na vzorec.

4. Oprema

4.1 *Analitska tehnica.*

4.2 *Posode*, ki so po možnosti iz niklja, aluminija, nerjavečega jekla ali stekla. Posode morajo imeti pokrove, ki se dobro prilegajo, vendar se z lahkoto odstranijo. Primerne dimenzije so: premer 60 do 80 mm in globina približno 25 mm.

4.3 *Sušilnik za sušenje pri atmosferskem tlaku*, z dobrim prezračevanjem, s termostatsko regulacijo temperature (pri $102\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$). Temperatura mora biti enakomerna v celotnem sušilniku.

4.4 *Eksikator*, ki vsebuje sveže aktiviran silikagel z indikatorjem za vsebnost vode ali ekvivalentno sušilo.

5. Postopek

5.1 Odstranimo pokrov s posode (4.2) in postavimo posodo skupaj s pokrovom v sušilnik (4.3) ter segrevamo približno eno uro.

5.2 Posodo pokrijemo in le-to prenesemo v eksikator (4.4). Pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo in stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_0).

5.3 V posodo damo 2 g posušenega vzorca mleka, posodo pokrijemo s pokrovom in pokrito posodo čim hitreje stehtamo s točnostjo 0,1 mg (M_1).

5.4 Posodo odkrijemo in jo postavimo skupaj s pokrovom v sušilnik za dve uri.

5.5 Ponovno pokrijemo posodo, ter pokrito prenesemo v eksikator, pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo in čim hitreje stehtamo s točnostjo 0,1 mg.

5.6 Posodo odkrijemo in jo tako, skupaj s pokrovom, eno uro segrevamo v sušilniku.

5.7 Ponovimo postopek 5.5.

5.8 Ponovimo postopka 5.6 in 5.5, dokler zmanjšanje mase med zaporednimi tehtanji ne preseže 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do povečanja mase, v izračunu (6.1) uporabimo najnižjo dobljeno maso. Zadnja zabeležena masa naj bo M_2 , izražena v g.

6. Podajanje rezultatov

6.1 *Metoda izračuna*

Izgubo mase po sušenju vzorca, izraženo kot masni delež, izražen v odstotkih, glede na vzorec, se izračuna po naslednji formuli:

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

kjer je:

M_0 – masa posode in njenega pokrova po postopku 5.2, v g;

M_1 – masa posode, njenega pokrova in vzorca po postopku 5.3, v g;

M_2 – masa posode, njenega pokrova in končnega vzorca po postopku 5.5, v g.

6.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatom dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presežati 0,1 g vlage na 100 g izdelka.

IV. DOLOČANJE VSEBNOSTI MAŠČOBE V KONDENZIRANEM MLEKU (METODA RÖSE-GOTTLIEB)

METODA 3

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda določa vsebnost maščobe v:

- nesladkanem kondenziranem mleku z visoko vsebnostjo maščobe,
- nesladkanem kondenziranem mleku,
- nesladkanem kondenzirano delno posnetem mleku,
- nesladkanem kondenziranem posnetem mleku,
- sladkanem kondenziranem mleku,
- sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,
- sladkanem kondenziranem posnetem mleku.

2. Definicija

Vsebnost maščobe kondenziranega mleka: vsebnost maščobe kot je določena z navedeno metodo.

3. Princip

Vsebnost maščobe določamo z ekstrakcijo maščobe iz amonijalkalne alkoholne raztopine vzorca z dietiletrom in petroletrrom, ki ji sledi odhlapevanje topil in tehtanje preostanka in izračun masnega deleža, izraženega v odstotkih, glede na vzorec, skladno s principom Röse-Gottlieb.

4. Reagenti

Vsi reagenti morajo ustrezati zahtevam določenim v točki slepi preskus (6.1). Kolikor je potrebno, lahko reagente ponovno destiliramo v prisotnosti približno 1 g mlečne maščobe za 100 ml topila.

4.1 *raztopina amoniaka*, približno 25 % (m/m) NH_3 (gostota pri 20 °C približno 0,91 g/ml) ali močnejša raztopina znane koncentracije.

4.2 *etanol*, 96 ± 2 % (v/v) ali, če ta ni na razpolago, etanol denaturiran z metanolom, etil metil keton ali petroleter.

4.3 *dietileter*, brez peroksida.

Opombe

1. Za testiranje na prisotnost peroksidov dodamo k 10 ml etra, v majhen valj s steklenim zamaškom, ki smo ga prej sprali z etrom, 1 ml sveže pripravljene 10 % raztopine kalijevega jodida. Stresemo in pustimo stati 1 minuto. V nobeni od obeh faz se ne sme pojaviti rumena barva.

2. Dietileter lahko ohranjamo brez peroksidov, tako da dodamo mokro cinkovo folijo, ki smo jo popolnoma namočili za eno minuto v razredčeno kislno raztopino bakrovega sulfata ter nato sprali z vodo. Na liter uporabimo približno 8 000 mm² cinkove folije; razrežemo jo na trakove, ki so dovolj dolgi, da lahko sežejo vsaj do polovice posode.

4.4 *Petroleter*, z vreliščem med 30 in 60 °C.

4.5 *Mešano topilo*, pripravljeno tik pred uporabo, tako da mešamo enaka volumna dietiletra (4.3) in petroletra (4.4) (kadar je navedena uporaba mešanega topila, se le-ta lahko nadomesti z dietiletrom ali samo s petroletrrom).

5. Oprema

5.1 *Analitska tehtnica*.

5.2 *Primerne epruvete ali bučke za ekstrahiranje* z brušenimi zamaški ali drugimi zamaški, odpornimi na uporabljena topila.

5.3 *Bučke*, s tankimi stenami in ravnim dnom, s kapaciteto 150 do 250 ml.

5.4 *Sušilnik za sušenje pri atmosferskem tlaku*, z dobrim prezračevanjem in s termostatsko regulacijo (prilagojen za vzdrževanje temperature pri $102 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$).

5.5 *Vrelni kamenčki*, brez maščobe, ki med uporabo niso porozni in niso drobljivi, npr. steklene kroglice ali delci silicijevega karbida (uporaba tega materiala je poljubna, glej 6.2.1).

5.6 *Sifon* (odvodna cev), ki se prilega epruvetam za ekstrahiranje.

5.7 *Centrifuga* (opcija).

6. Postopek

6.1 Slepi preskus

Istočasno ko določamo vsebnost maščobe v vzorcu, izvedemo tudi določanje v slepem vzorcu v 10 ml vode. Pri tem uporabimo isto aparaturo za ekstrahiranje, iste reagente v istih količinah in isti postopek, kot je opisan v nadaljevanju, razen 6.2.2. Če slepi vzorec presega 0,5 mg, je potrebno preveriti reagente ter nečisti reagent oziroma reagente očistiti ali zamenjati.

6.2 Določanje

6.2.1 Bučko (5.3) (če je potrebno, skupaj z nekaj vrelnimi kamenčki (5.5), da pospešimo rahlo vrenje med odstranitvijo topil, ki sledi) posušimo v sušilniku (5.4) od pol do ene ure. Pustimo, da se bučka ohladi na temperaturo tehtalnega prostora ter ohlajeno bučko stehtamo s točnostjo 0,1 mg.

6.2.2 Premešamo pripravljene vzorec in takoj odtehtamo, s točnostjo 1 mg, 2 do 2,5 g sladkanega vzorca ali 4 do 5 g nesladkanega vzorca direktno, ali z diferenčnim tehtanjem, v aparaturo za ekstrahiranje (5.2). Dodamo 10,5 ml vode in rahlo stresamo pri zmernem segrevanju (40 do 50 °C) dokler ni izdelek popolnoma razpršen. Vzorec se mora popolnoma razpršiti, sicer je treba določanje ponoviti.

6.2.3 Dodamo 1,5 ml amoniaka (25 %) (4.1) ali odgovarjajočega volumna močnejše raztopine in dobro premešamo.

6.2.4 Dodamo 10 ml etanola (4.2) in rahlo, vendar temeljito premešamo tekočine v nezaprta aparaturi.

6.2.5 Dodamo 25 ml dietiletra (4.3). Ohladimo pod tekočo vodo. Aparaturo zapremo in temeljito stresamo in obračamo eno minuto.

6.2.6 Previdno odstranimo zamašek in dodamo 25 ml petroletra (4.4), nekaj ml ga uporabimo, da speremo zamašek in notranjost vratu aparature, pri tem pa moramo paziti da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Zapremo, tako da ponovno zamašimo ter stresamo in obračamo 30 sekund. Ne smemo stresati preveč temeljito, če v 6.2.7 ni predvidena uporaba centrifugiranja.

6.2.7 Aparaturo pustimo stati, dokler se gornja faza ne zbistri in jasno loči od spodnje vodne faze. Alternativno izvedemo separacijo z uporabo primerne centrifuge (5.7).

Opomba

Kadar se uporabi centrifuga, ki je ne poganja trifazni motor, lahko pride do iskrenja in je treba paziti, da ne pride do eksplozije ali ognja zaradi eterskih hlapov, ki na primer, lahko prihajajo iz počene epruvete.

6.2.8 Zamašek odstranimo. Zamašek in notranjost vratu aparature speremo z nekaj ml mešanega topila (4.5) tako, da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Gornjo fazo previdno prenesemo, kolikor jo je le mogoče, tako da jo odlijemo ali uporabimo sifon (5.6) v pripravljeno bučko (6.2.1).

Opomba

Če prenosa ne naredimo, tako da uporabimo sifon, je mogoče dobro dodati malo vode, da povečamo površino med dvema fazama, ter tako lažje oddekantiramo.

6.2.9 Zunanost in notranjost vratu aparature oziroma vrh in spodnji del sifona speremo z nekaj ml mešanega topila (4.5). Po izpiranju naj raztopina teče iz zunanosti aparature v bučko, raztopina iz notranjosti vratu in iz sifona pa v aparaturo za ekstrahiranje.

6.2.10 Opravimo drugo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek od 6.2.5 do vključno 6.2.9, pri tem uporabimo samo 15 ml dietiletra in 15 ml petroletra.

6.2.11 Opravimo tretjo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek 6.2.10 vendar brez zadnjega izpiranja (6.2.9).

Opomba

Kadar analiziramo vzorce posnetega nesladkanega kondenziranega mleka in posnetega sladkanega kondenziranega mleka, tretja ekstrakcija ni obvezna.

6.2.12 Previdno izparevamo ali oddestiliramo čim več topila (vključno etanola). Če ima bučka majhno kapaciteto, je potrebno, kot je navedeno zgoraj, po vsaki ekstrakciji odstraniti nekaj topila.

6.2.13 Kadar ni več znatnega vonja po topilu, bučko postrani položimo v sušilnik in segrevamo eno uro.

6.2.14 Bučko odstranimo iz sušilnika, jo ohladimo do temperature tehtalnega prostora in točno stehtamo s točnostjo 0,1 mg.

6.2.15 Ponovimo postopek 6.2.13 in 6.2.14, s segrevanjem 30 do 60 minut, dokler razlika v masi med dvema zaporednima tehtanjema ni manj kot 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do povečanja mase, v izračunu (7.1) uporabimo najnižjo dobljeno maso. Zadnja zabeležena masa naj bo M_1 , izražena v g.

6.2.16 Da potrdimo, da je ekstrahirana snov popolnoma topna, dodamo 15 do 25 ml petroletra. Rahlo segrevamo in premešamo topilo, dokler se vsa maščoba ne raztopi.

6.2.16.1 Če je ekstrahirana snov popolnoma topna v petroletru, je masa maščobe razlika med masami, določenimi v 6.2.1 in 6.2.15.

6.2.16.2 Če je prisotna katera koli netopna snov, ali če smo v dvomih, popolnoma ekstrahiramo maščobi iz bučk, tako da ponovno izpiramo s toplim petroletram, ter pred vsakim odlitjem pustimo, da se neraztopljeni material posede. Zunanost vratu bučke trikrat izperemo. V sušilniku eno uro segrevamo bučko, ki jo položimo na stran, potem jo kot prej (6.2.1) ohladimo na temperaturo tehtalnega prostora in stehtamo s točnostjo 0,1 mg. Masa maščobe je razlika med maso, dobljeno v 6.2.15 in to končno maso.

7. Podajanje rezultatov

7.1 Izračun

Masa ekstrahirane maščobe je (v g):

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

in vsebnost maščobe vzorca, izražena v odstotkih, je:

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

kjer je:

M_1 – masa bučke M z maščobo po fazi 6.2.15, v g;

M_2 – masa bučke M po fazi 6.2.1 ali v primeru neraztopljenega materiala ali dvoma, po fazi 6.2.16.2, v g;

B_1 – masa bučke B slepega vzorca po fazi 6.2.15, v g;

B_2 – masa bučke B po fazi 6.2.1 ali v primeru neraztopljenega materiala ali dvoma, po fazi 6.2.16.2, v g;

S – masa uporabljenega vzorca v g,

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatom dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presežati 0,05 g maščobe na 100 g izdelka.

V. DOLOČANJE VSEBNOSTI MAŠČOBE V SUŠENEM MLEKU (RÖSE-GOTTLIEB METODA)

METODA 4

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda določa vsebnost maščobe v:

- sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,
- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu.

2. Definicija

Vsebnost maščobe sušenega mleka: vsebnost maščobe, kot je določena z navedeno metodo.

3. Princip metode

Vsebnost maščobe se določa z ekstrakcijo maščobe iz amonijalkalne raztopine vzorca z dietiletrom in petroletram, ki ji sledi izparevanje topil in tehtanje preostanka in izračun masnega deleža, izraženega v odstotkih, glede na vzorec, v skladu s principom Röse-Gottlieb.

4. Reagenti

Vsi reagenti morajo ustrezati zahtevam, določenim v točki slepi vzorec (6.1). Če je potrebno, se reagente lahko ponovno destilira v prisotnosti približno 1g mlečne maščobe na 100 ml topila.

4.1 *Raztopina amoniaka*, približno 25 % (m/m) NH_3 (gostota pri 20 °C je približno 0,91 g/ml), ali močnejša raztopina znane koncentracije.

4.2 Etanol, 96 ± 2 % (v/v) ali, če to ni dosegljivo, etanol denaturiran z metanolom, etil metil keton ali petroleter.

4.3 *Dietileter*, brez peroksida

Opombe

1. Za testiranje prisotnosti peroksidov dodamo 1 ml sveže pripravljene 10 % raztopine kalijevega jodida k 10 ml etra v majhnem cilindru s steklenim zamaškom, ki smo ga predhodno sprali z etrom. Stresemo in pustimo stati eno minuto. V nobeni fazi se ne sme pojaviti rumena barva.

2. Dietileter lahko ohranjamo brez peroksidov, tako da dodamo mokro cinkovo folijo, ki smo jo za eno minuto popolnoma namočili v razredčeni kisli raztopini bakrovega sulfata ter nato sprali z vodo. Na liter uporabimo približno 8 000 mm² cinkove folije; razrežemo jo na trakove, ki so dovolj dolgi, da lahko sežejo vsaj do polovice posode.

4.4 *Petroleter*, z območjem vrelišča med 30 in 60 °C.

4.5 *Mešano topilo*, pripravljeno tik pred uporabo, tako da mešamo enaka volumna dietiletra (4.3) in petroletra (4.4) (kadar je indicirana uporaba mešanega topila, se ta lahko nadomesti z dietiletrom ali samo s petroletrom).

5. Oprema

5.1 *Analitska tehnica*.

5.2 *Primerne epruvete ali bučke za ekstrahiranje* z brušenimi zamaški ali drugimi zaporami, odpornimi na uporabljena topila.

5.3 *Bučke*, s tankimi stenami in ravnim dnom, s kapaciteto 150 do 250 ml.

5.4 *Sušilnik za sušenje pri atmosferskem tlaku*, z dobrim prezračevanjem in s termostatsko regulacijo (ki omogoča vzdrževanje temperature pri $102 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$).

5.5 *Vrelni kamenčki*, brez maščobe, ki med uporabo niso porozni in niso drobljivi, npr. steklene kroglice ali delci silicijevega karbida (uporaba tega materiala je poljubna, glej 6.2.1).

5.6 *Vodna kopel*, pri 60 do 70 °C

5.7 *Sifon* (odvodna cev), ki se prilega epruvetam za ekstrahiranje

5.8 *Centrifuga* (poljubna).

6. Postopek

6.1 *Slepi preskus*

Istočasno, ko določamo vsebnost maščob v vzorcu, izvedemo tudi določanje v slepem vzorcu v 10 ml vode. Pri tem uporabimo isto aparaturo za ekstrahiranje, iste reagente v istih količinah in isti postopek, kot je opisan v nadaljevanju, razen 6.2.2. Če slepi vzorec presega 0,5 mg, je treba preveriti reagente ter nečisti reagent ali reagente očistiti ali zamenjati.

6.2 *Določanje*

6.2.1 Bučko (5.3) (skupaj z, če je potrebno, nekaj vrelnimi kamenčki (5.5), da bi pospešili rahlo vrenje med odstranjevanjem topil, ki sledi) posušimo v sušilniku (5.4), od pol do ene ure. Pustimo, da se bučka ohladi na temperaturo tehtalnega prostora, potem pa jo ohlajeno stehamo s točnostjo 0,1 mg.

6.2.2 Pripravljene vzorec premešamo in takoj stehamo približno 1 g polnomastnega mleka v prahu ali približno 1,5 g delno posnetega ali posnetega mleka v prahu, s točnostjo 1 mg, direktno, ali z diferenčnim tehtanjem, v aparaturo za ekstrahiranje (5.2). Dodamo 10 ml vode in rahlo stresamo, dokler ni mleko v prahu popolnoma razpršeno (za nekatere vzorce je potrebno segrevanje).

6.2.3 Dodamo 1,5 ml amoniaka (25 %) (4.1) ali odgovarjajoči volumen močnejše raztopine ter segrevamo na vodni kopeli (5.6) 15 minut pri 60 do 70 °C, pri tem pa občasno mešamo. Ohladimo, na primer pod tekočo vodo.

6.2.4 Dodamo 10 ml etanola (4.2) in rahlo, vendar temeljito premešamo tekočine v nezaprto aparaturo.

6.2.5 Dodamo 25 ml dietiletra (4.3). Ohladimo pod tekočo vodo. Aparaturo zapremo in temeljito stresamo ter obračamo eno minuto.

6.2.6 Previdno odstranimo zamašek in dodamo 25 ml petroletra (4.4), tako da s prvimi nekaj mililitri speremo zamašek in notranjost vratu aparature, pri tem pa pazimo da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Zapremo, tako da ponovno zamašimo, ter stresamo in obračamo 30 sekund. Če v 6.2.7 ni predvidena uporaba centrifugiranja, ne smemo stresati preveč temeljito.

6.2.7 Aparaturo pustimo stati, dokler se gornja faza ne zbistri in jasno loči od spodnje vodne faze. Alternativno izvedemo separacijo z uporabo primerne centrifuge (5.8).

Opomba

Kadar se uporabi centrifuga, ki jo ne poganja trifazni motor, lahko pride do iskrenja in je treba paziti, da ne pride do eksplozije ali ognja zaradi eterskih hlapov, ki lahko prihajajo iz počene epruvete.

6.2.8 Zamašek odstranimo, ter potem le-tega in notranjost vratu aparature speremo z nekaj mililitri mešanega topila (4.5) in dovolimo, da raztopina po izpiranju odteče v aparaturo. Gornjo fazo previdno prenesemo, kolikor jo je le mogoče, tako da odlijemo ali uporabimo sifon (5.7) v pripravljeno bučko (6.2.1).

Opomba

Če prenosa ne naredimo tako da uporabimo sifon, je mogoče dobro da dodamo malo vode, da povečamo površino med dvema fazama, ter tako lažje oddekantiramo.

6.2.9 Zunanost in notranost vratu aparature oziroma vrh in spodnji del sifona speremo z nekaj mililitri mešanega topila. Po izpiranju naj raztopina teče iz zunanosti aparature v bučko, raztopina iz notranosti vratu in iz sifona pa v aparaturo za ekstrahiranje.

6.2.10 Opravimo drugo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek od 6.2.5 do vključno 6.2.9, pri tem uporabimo samo 15 ml dietiletra in 15 ml petroletra.

6.2.11 Opravimo tretjo ekstrakcijo, tako da ponovimo postopek 6.2.10 vendar brez zadnjega izpiranja (6.2.9).

Opomba

Kadar analiziramo vzorce posušenega posnetega mleka v prahu tretja ekstrakcija ni obvezna.

6.2.12 Previdno izparevamo ali oddestiliramo čim več topila (vključno etanola). Če ima bučka majhno kapaciteto je potrebno odstraniti nekaj topila, kot je navedeno zgoraj, po vsaki ekstrakciji.

6.2.13 Kadar ni več občutnega vonja po topilu, bučko postrani položimo v sušilnik in segrevamo eno uro.

6.2.14 Bučko odstranimo iz sušilnika, jo ohladimo do temperature tehtalnega prostora, kot zgoraj navedeno (6.2.1) in stehamo s točnostjo 0,1 mg.

6.2.15 Ponovimo 6.2.13 in 6.2.14, medtem ko segrevamo 30 do 60 minut, dokler razlika v masi med dvema zaporednima tehtanjema ni manj kot 0,5 mg ali dokler se masa ne poveča. Če pride do povečanja mase, v izračunu (7.1), uporabimo najnižjo dobljeno maso. Zadnja zabeležena masa naj bo M_1 , izražena v g.

6.2.16 Da potrdimo, da je ekstrahirana snov popolnoma topna, dodamo 15 do 25 ml petroletra. Rahlo segrevamo in premešamo topilo, dokler se vsa maščoba ne raztopi.

6.2.16.1 Če je ekstrahirana snov popolnoma topna v petroletru, je masa maščobe razlika med masami, določenimi v fazah pod 6.2.1 in 6.2.15.

6.2.16.2 Če je prisotna katera koli netopna snov, ali če smo v dvomih, popolnoma ekstrahiramo maščobi iz bučk, tako da ponovno speremo s toplim petroletram, ter pred vsakim odlitjem pustimo, da se neraztopljeni material posede. Zunanost vratu bučke izperemo trikrat.

V sušilniku eno uro segrevamo bučko, ki jo položimo na stran, potem pa jo kot prej (6.2.1) ohladimo na temperaturo tehtalnega prostora in stehamo s točnostjo 0,1 mg. Masa maščobe je razlika med maso, dobljeno v 6.2.15 in to končno maso.

7. Podajanje rezultatov

7.1 Izračun

Masa, v gramih, ekstrahirane maščobe je:

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

in vsebnost maščobe vzorca, izražena v odstotkih, je:

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

kjer je:

M_1 – masa bučke M z maščobo po fazi 6.2.15, v g;

M_2 – masa bučke M po fazi 6.2.1 ali, v primeru neraztopljenega materiala ali dvoma, po fazi 6.2.16.2, v g;

B_1 – masa bučke B slepega vzorca po fazi 6.2.15, v g;

B_2 – masa bučke B po fazi 6.2.1 ali v primeru neraztopljenega materiala ali dvoma, po fazi 6.2.16.2, v g;

S – masa uporabljenega vzorca, v g.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatom dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presegati 0,2 g maščobe na 100 g izdelka z izjemo posnetega mleka v prahu, za katerega razlika ne sme presegati 0,1 g maščobe na 100 g izdelka.

VI. DOLOČANJE VSEBNOSTI SAHAROZE (POLARIMETRIJSKA METODA)

METODA 5

1. Namen in področje uporabe

S to metodo določamo vsebnost saharoze v:

- sladkanem kondenziranem mleku,
- sladkanem kondenziranem delno posnetem mleku,
- sladkanem kondenziranem posnetem mleku.

Vzorci ne smejo vsebovati invertnega sladkorja.

2. Definicija

Vsebnost saharoze sladkanega kondenziranega mleka: vsebnost saharoze kot je določena z navedeno metodo.

3. Princip metode

Metoda je osnovana na principu Clergetove inverzije, ki temelji na rahli obdelavi vzorca s kislino, ki povzroči popolno hidrolizo saharoze, vendar pa skoraj ne hidrolizira laktoze ali drugih sladkorjev. Vsebnost saharoze se dobi iz spremembe v rotaciji raztopine.

Bistri filtrat vzorca, brez mutarotacije laktoze, pripravimo tako, da raztopino obdelamo z amoniakom, sledi nevtralizacija in bistrenje z zaporednim dodajanjem raztopin cinkovega acetata in kalijevega heksacianoferata II. V delu filtrata se saharoza hidrolizira na poseben način.

Vsebnost saharoze izračunamo iz rotacije filtrata pred in po inverziji z uporabo primernih formul.

4. Reagenti

4.1 *Raztopina cinkovega acetata*, 1 M: v vodi raztopimo 21,9 g kristaliziranega cinkovega acetata dihidrata ($Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$) in 3 ml ledocetne kisline ter z vodo dopolnimo do 100 ml.

4.2 *Raztopina kalijevega heksacianoferata (II)*, 0,25 M: v vodi raztopimo 10,6 g kristaliziranega kalijevega heksacianoferata (II) trihidrata ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) ter z vodo dopolnimo do 100 ml.

4.3 *Raztopina klorovodikove kisline*, $6,35 \pm 0,20$ M (20 do 22 %) ali $5,0 \pm 0,2$ M (16 do 18 %).

4.4 *Raztopina amoniaka*, $2,0 \pm 0,2$ M (3,5 %).

4.5 *Raztopina oetne kisline*, $2,0 \pm 0,2$ M (12 %).

4.6 *Indikator bromtimol modro*, 1 % (m/v) raztopina v etanolu.

5. Oprema

5.1 *Tehnica*, občutljivost 10 mg.

5.2 *Polarimetrijska cevka*, 2 dm, s točno kalibrirano dolžino.

5.3 *Polarimeter ali saharimeter*:

a) polarimeter z natrijevo svetlobo ali živosrebrno zeleno svetlobo (svetloba živosrebrnih hlapov s prizmo ali posebni Wratten zaslon št. 77 A), s točnostjo najmanj 0,05 kotnih stopinj.

b) saharimeter z mednarodno sladkorno lestvico, z uporabo bele svetlobe, ki gre skozi 15 mm filter 6 % raztopine kalijevega dikromata, ali natrijeve svetlobe, s točnostjo najmanj $0,1^\circ$ na mednarodni sladkorni lestvici.

5.4 *Vodna kopel*, ki omogoča vzdrževanje temperature pri $60^\circ C \pm 1^\circ C$.

6. Postopek

6.1 Kontrolno določanje

Da bi standardizirali postopek, reagente in aparature, izvedemo kontrolno določanje v dveh paralelnih določitvah, kot je opisano spodaj in sicer tako da uporabimo mešanico 100 g mleka in 18 g čiste saharoze ali mešanico 110 g posnetega mleka in 18 g čiste saharoze, vsaka odgovarja 40 g zgoščenega mleka, ki vsebuje 45 % saharoze. Vsebnost sladkorja izračunamo, tako da uporabimo formulo pod 7 poglavjem, tega dela priloge, in sicer tako da za M, F in P v formuli 1 uporabimo količino odvzetega mleka in vsebnost maščob in beljakovin tega mleka in za M v formuli 2, vrednost 40,00. Razlika povprečnih dobljenih vrednosti ne sme biti večja od 0,2 % pri 45,0 %.

6.2 Določanje

6.2.1 Približno 40 g dobro premešanega vzorca odtehtamo s točnostjo 10 mg, v 100 ml stekleno čašo. Dodamo 50 ml vroče vode (80 do $90^\circ C$) in dobro premešamo.

6.2.2 Kvantitativno prenesemo mešanico v 200 ml merilno bučko, čašo izpiramo večkrat z vodo pri 60 °C, dokler ni celoten volumen med 120 in 150 ml. Premešamo in ohladimo na sobno temperaturo.

6.2.3 Dodamo 5 ml razredčene raztopine amoniaka (4.4), ponovno premešamo in pustimo stati 15 minut.

6.2.4 Amoniak nevtraliziramo tako da dodamo ekvivalentno količino razredčene raztopine očetne kisline (4.5). Točno porabo v ml določimo vnaprej s titracijo raztopine amoniaka, tako da uporabimo bromtimol modro kot indikator. Premešamo.

6.2.5 12,5 ml raztopine cinkovega acetata dodamo med rahlim mešanjem, tako da nagnjeno bučko vrtimo.

6.2.6 12,5 ml raztopine kalijevega heksacianoferata (II) (4.2) dodamo na enak način kot raztopino acetata.

6.2.7 Vsebino bučke ohladimo na 20 °C in z vodo dopolnimo do oznake, 200 ml, pri 20 °C.

Opomba

Med, do zdaj opisanimi fazami, je treba dodajati vodo ali reagent na tak način, da se ne tvorijo mehurčki zato pazimo, da mešamo vedno tako, da bučko rotiramo in ne stresamo. Če ugotovimo prisotnost zračnih mehurčkov preden dopolnimo do volumna 200 ml, jih je možno odstraniti tako, da bučko za kratek čas priključimo na vakuumsko črpalko in jo rotiramo.

6.2.8 Bučko zamašimo s suhim zamaškom in vsebino temeljito premešamo z močnim stresanjem.

6.2.9 Pustimo stati nekaj minut in nato filtriramo skozi suh filter papir. Prvih 25 ml filtrata zavržemo.

6.2.10 Direktna polarizacija: določimo optično rotacijo filtrata pri 20 °C ± 1 °C.

6.2.11 Inverzija: odpipetiramo 40 ml gornjega filtrata v 50 ml merilno bučko. Dodamo 6,0 ml 6,35 M klorovodikove kisline ali 7,5 ml 5,0 M klorovodikove kisline (4.3).

Bučko postavimo za 15 minut na vodno kopel, ki ima 60 °C, pri čimer zagotovimo, da je celotno telo bučke pod vodo. Mešamo tako, da prvih pet minut vrtimo. V tem času vsebina bučke doseže temperaturo kopeli. Ohladimo na 20 °C in z vodo, s temperaturo 20 °C, dopolnimo do oznake. Premešamo in pustimo stati eno uro na tej temperaturi.

6.2.12 Invertna polarizacija

Določimo rotacijo invertne raztopine pri 20 °C ± 0,2 °C (vendar če se med merjenjem temperatura T tekočine v polarizacijski epruveti spremeni za več kot 0,2 °C, je treba uporabiti korekcijo temperature, ki je omenjena pod 7.2).

7. Podajanje rezultatov

7.1 Metoda izračuna

Vsebnost saharoze izračunamo z naslednjo formulo:

$$(1) \quad v = \frac{M}{100} (1,08F + 1,55P)$$

$$(2) \quad S = \frac{D - 1,25I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times M} \quad (\%)$$

kjer je:

S – vsebnost saharoze,

M – masa odtehtanega vzorca, v g,

F – odstotek maščobe v vzorcu,

P – odstotek beljakovin (N x 6,38) v vzorcu,

V – volumen v ml, na katerega se vzorec razredči pred filtracijo,

v – korekcija v ml za volumen oborine, ki se tvori med bistenjem

I – polarimetrijski odčitek po inverziji,

L – dolžina polarimetrijske cevi, v dm,

Q – inverzijski faktor, katerega vrednosti so dane spodaj.

Opombe

a) Kadar odtehtamo točno 40,00 g kondenziranega mleka in uporabimo polarimeter z natrijevo svetlobo, kotnimi stopinjami in 2 dm polarimetrijsko cevko pri 20,0 °C ± 0,1 °C, lahko vsebnost saharoze normalno zgoščene mleka (C = 9) izračunamo na podlagi naslednje formule:

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

b) Če je invertna polarizacija merjena na temperaturi, ki ni 20 °C, se številke množi s:

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

7.2 Vrednosti inverzijskega faktorja Q

Točne vrednosti za Q , za različne vire svetlobe, s popravki za koncentracijo in temperaturo, dobimo s pomočjo naslednjih formul:

natrijeva svetloba in polarimeter s kotnimi stopinjami:

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

Živosrebrna zelena svetloba in polarimeter s kotnimi stopinjami:

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

Bela svetloba z dikromatnim filtrom in saharimetrom s stopinjami po mednarodni sladkorni lestvici:

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

kjer je:

C – odstotek skupnega sladkorja v invertni raztopini kot je polarizirana,

T – temperatura invertirane raztopine pri polarimetrijskem odčitku.

Opombe

1. Odstotek skupnega sladkorja C v invertirani raztopini se lahko izračuna iz neposrednega odčitka in spremembe inverzije na običajen način, z uporabo običajnih vrednosti za specifične rotacije saharoze, laktoze in invertnega sladkorja.

Popravek $0,0006 (C - 9)$ itd., je točen samo, kadar je C približno 9; za normalno kondenzirano mleko se to korekcijo lahko zanemari, ker je C blizu 9.

2. Nihanje temperature pri 20 ± 1 °C pomeni majhno razliko v neposrednem odčitku, medtem ko nihanja za več kot 0,2 °C v invertnem odčitku zahteva korekcijo. Korekcija $- 0,0033 (T - 20)$ itd., je točna samo med 18 °C in 22 °C.

7.3 Ponovljivost

Razlika med rezultatom dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presegati 0,3 g saharoze na 100 g kondenziranega mleka.

VII. DOLOČANJE VSEBNOSTI MLEČNE KISLINE IN LAKTATOV

METODA 6

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda določa mlečno kislino in laktate, izražene kot mlečna kislina, v:

- sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,
- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu.

2. Definicija

Vsebnost mlečne kisline in laktatov v sušenem mleku: mlečna kislina in laktati, izraženi kot mlečna kislina, vsebnost določena z navedeno metodo.

3. Princip metode

Iz raztopine vzorca istočasno odstranimo maščobo, beljakovine in laktozo, tako da dodajamo bakrov sulfat in kalcijev hidroksid, ter nato filtriramo.

Mlečna kislina in laktati v filtratu se s koncentrirano žveplovo kislino v prisotnosti bakrovega II sulfata spremenijo v acetaldehid.

Vsebnost mlečne kisline se določi kolorimetrijsko z uporabo p-hidroksidifenila.

Vsebnost mlečne kisline in laktatov je izražena kot mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe.

4. Reagenti

4.1 *Raztopina bakrovega (II) sulfata*: raztopimo 250 g bakrovega (II) sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) v vodi in razredčimo z vodo do 1 000 ml.

4.2 *Suspenzija kalcijevega hidroksida*.

4.2.1 300 g kalcijevega hidroksida (Ca(OH)_2) stremo v terilnici z vodo; skupaj uporabimo 900 ml vode. Suspenzijo moramo sveže pripraviti tik pred uporabo.

4.2.2 Suspenzijo kalcijevega hidroksida: 300 g kalcijevega hidroksida (Ca(OH)_2) stremo v terilnici z vodo, tako da skupaj uporabimo 1 400 ml. Suspenzijo moramo sveže pripraviti tik pred uporabo.

4.3 *Raztopina žveplove kisline - bakrovega (II) sulfata*: K 300 ml žveplove kisline 95,9 do 97,0 % (m/m) H_2SO_4 , dodamo 0,5 ml raztopine bakrovega (II) sulfata (4.1).

4.4 *Raztopina p-hidroksidifenila ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$)*: raztopimo, tako da stresamo in rahlo segrevamo 0,75 g p-hidroksidifenila v 5 ml vodne raztopine natrijevega hidroksida, ki vsebuje 5 g NaOH na 100 ml. V merilni bučki razredčimo z vodo na 50 ml. Raztopino hranimo v steklenici iz rjavega stekla na temnem in hladnem. V kolikor pride do spremembe barve ali motnosti raztopine ne smemo uporabiti. Najdaljša doba uporabnosti je 72 ur.

4.5 *Standardna raztopina mlečne kisline*: v vodi raztopimo, tik pred uporabo, 0,1067 g litijevega laktata ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$) in razredčimo do 1 000 ml v merilni bučki. 1 ml te raztopine odgovarja 0,1 mg mlečne kisline.

4.6 *Standardno rekonstituirano mleko*: vnaprej analiziramo več vzorcev visoko kvalitetnega sušenega mleka. Za pripravo umeritvene krivulje izberemo vzorec, ki ima najnižjo vsebnost mlečne kisline, ki ne vsebuje več kot 30 mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe. Upoštevamo postopek opisan pod 6.2.1 in 6.2.2. spodaj.

5. Oprema

5.1 *Analitska tehtnica*.

5.2 *Spektrofotometer* primeren za odčitke pri valovni dolžini 570 nm.

5.3 *Vodna kopel* pri $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

5.4 *Terilnica in pestilo*.

5.5 *Filter papir* (Schleicher in Schull 595, Whatman I ali enakovreden papir).

5.6 *Epruvete* iz pireksa ali enakovrednega materiala (dimenzije 25 x 150 mm).

Opomba

Vsa steklovina mora biti povsem čista in namenjena izključno uporabi za to določanje. Steklovino, ki vsebuje ostanke oborine, pred pranjem speremo s koncentrirano klorovodikovo kislino.

6. Postopek

6.1 *Slepi preskus*

Slepi preskus izvedemo tako, da vlijemo 30 ml vode v 50 ml graduirane epruvete in s to epruveto postopamo kot je opisano v 6.2.4 do vključno 6.2.11. Če slepi vzorec, merjen proti vodi, presega ekvivalentno koncentracijo 20 mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe, je treba preveriti reagente ter nečisti reagent ali reagente zamenjati. Slepni preskus izvedemo istočasno kot analizo vzorca.

6.2 Določanje

Opomba: Izogibamo se kontaminacije z nečistočami, posebno slino in znojem.

6.2.1 Določimo vsebnost suhe snovi brez maščobe (a) g vzorca tako da od 100 odštejemo vsebnost maščob (ki jo dobimo z metodo 4) in vsebnost vlage (ki jo dobimo z metodo 2).

6.2.2 Stehtamo (1000 / (a-10)) g vzorca s točnostjo 0,1 g. Zatehtani količini vzorca dodamo 100 ml vode in temeljito premešamo.

6.2.3 5 ml dobljene raztopine odpipetiramo v 50 ml graduirano epruveto in razredčimo z vodo do 30 ml.

6.2.4 Med stresanjem počasi dodajamo 5 ml raztopine bakrovega (II) sulfata (4.1) in pustimo stati 10 minut.

6.2.5 Med stresanjem počasi dodajamo 5 ml suspenzije kalcijevega hidroksida (4.2.1) ali 10 ml suspenzije kalcijevega hidroksida (4.2.2).

6.2.6 Razredčimo z vodo do 50 ml, temeljito stresamo in pustimo stati 10 minut. Nato filtriramo. Prvi del filtrata zavržemo.

6.2.7 1 ml filtrata odpipetiramo v epruveto (5.6).

6.2.8 Z bireto ali graduirano pipeto dodamo v epruveto 6,0 ml raztopine žveplove kisline-bakrovega (II) sulfata (4.3). Premešamo.

6.2.9 Segrevamo na vreli vodni kopeli pet minut. Pod tekočo vodo ohladimo na sobno temperaturo.

6.2.10 Dodamo dve kapljici p-hidroksidifenil reagenta (4.4) in temeljito stresamo, da se reagent enakomerno porazdeli po tekočini. Epruveto postavimo na vodno kopel pri $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pustimo stati 15 minut in občasno stresamo.

6.2.11 Epruveto postavimo na vrelo vodno kopel za 90 sekund. Pod tekočo vodo ohladimo na sobno temperaturo.

6.2.12 Izmerimo optično gostoto proti slepemu vzorcu (6.1) v času treh ur pri valovni dolžini določeni pod 5.2.

6.2.13 Če absorbanca presega absorbanco najvišje točke standardne krivulje, ponovimo preskus, tako da uporabimo ustrezno razredčen filtrat, ki ga dobimo pod 6.2.6.

6.3 Priprava standarda

6.3.1 Odpipetiramo po 5 ml rekonstituiranega mleka (4.6) v pet 50 ml graduiranih epruvet. V te epruvete odpipetiramo 0, 1, 2, 3 in 4 ml standardne raztopine (4.5), da tako dobimo območje standardov, ki odgovarjajo 0, 20, 40, 60 in 80 mg dodane mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe v sušenem mleku.

6.3.2 Razredčimo z vodo do približno 30 ml in postopamo, kot je opisano v fazah od 6.2.4 do 6.2.11.

6.3.3 Izmerimo absorbance standardnih raztopin (6.3.1) proti slepemu vzorcu (6.1) pri valovni dolžini, določeni pod 5.2. V diagramu izrišemo absorbanco proti koncentraciji mlečne kisline, navedene v 6.3.1, t.j. 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg in 80 mg na 100 g suhe snovi brez maščobe. Narišemo premico, ki se najbolj prilega dobljenim točkam in pripravimo standardno umeritveno krivuljo tako, da premico vzporedno premaknemo, da gre skozi koordinatno izhodišče.

7. Podajanje rezultatov

7.1 Metoda izračuna

Absorbanco, ki jo izmerimo pod 6.2.12 ali 6.2.13, pretvorimo v mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe v vzorcu s pomočjo standardne umeritvene krivulje. Kadar je filtrat razredčen na način, opisan v 6.2.13, rezultat pomnožimo s faktorjem redčenja.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presegati 8 mg mlečne kisline na 100 g suhe snovi brez maščobe za vsebino do 80 mg. Za višje vrednosti ta razlika ne sme presegati 10 % najnižje vrednosti.

VII. DOLOČANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE (MODIFICIRAN SANDERS IN SAGER-JEV POSTOPEK)

METODA 7

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda opisuje določanje aktivnosti fosfataze v:

- sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,
- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu.

2. Definicija

Aktivnost fosfataze sušenega mleka je merilo količine prisotne aktivne alkalne fosfataze. Izražena je kot količina fenola v μg , ki se sprosti iz 1 ml rekonstituiranega mleka, kot to določa spodaj opisan postopek.

3. Princip metode

Aktivnost fosfataze sušenega mleka je določena s sposobnostjo fosfataze, da sprosti fenol iz dinatrijevega fenilfosfata. Količina sproščenega fenola, pod predpisanimi pogoji, se določa s spektrofotometričnim merjenjem barve, ki jo razvije Gibbov reagent.

4. Reagenti

4.1 *Raztopina A*: pufer barijevega borat hidroksida: pH $10,6 \pm 0,1$ pri $20\text{ }^\circ\text{C}$.

Raztopimo: 25,0 g barijevega hidroksida ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) v vodi in razredčimo do 500 ml.

Raztopimo: 11,0 g borove kisline (H_3BO_3) v vodi in razredčimo do 500 ml.

Obe raztopini segrejemo na $50\text{ }^\circ\text{C}$ in premešamo.

Stresamo in ohladimo mešanico na sobno temperaturo.

Z raztopino barijevega hidroksida naravnamo pH na $10,6 \pm 0,1$ in filtriramo.

Raztopino shranimo v tesno zaprti posodi.

Pred uporabo razredčimo pufer z enako količino vode.

4.2 *Raztopina B*: pufer za razvijanje barve.

6,0 g natrijevega metaborata (NaBO_2) (ali 12,6 g $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) in 20,0 g natrijevega klorida (NaCl) raztopimo v vodi in razredčimo z vodo do 1 000 ml.

4.3 *Raztopina C*: raztopina pufernega substrata.

4.3.1 0,5 g dinatrijevega fenil fosfata ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) raztopimo v 4,5 ml raztopine B (4.2). Dodamo 2 kapljici raztopine E (4.5) in pustimo stati 30 minut. Barvo ekstrahiramo z 2,5 ml butanola (4.10). Če je treba, ekstrahiranje barve ponovimo. Butanol po separaciji zavržemo. To raztopino lahko več dni hranimo v hladilniku. Pred uporabo še enkrat razvijemo in ekstrahiramo barvo.

4.3.2 Odpipetiramo 1 ml te raztopine v 100 ml merilno bučko in dopolnimo z raztopino A. Raztopino pufru pripravimo neposredno pred uporabo.

4.4 *Raztopina D*: reagent za obarjanje.

3,0 g cinkovega sulfata ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in 0,6 g bakrovega (II) sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) raztopimo v vodi in dopolnimo do 100 ml z vodo.

4.5 *Raztopina E*: Gibbov reagent

0,040 g 2,6-dibromkinona 1,4-kloroimida ($\text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 \cdot \text{NCl}$) raztopimo v 10 ml 96 % etanola. Raztopino shranimo v steklenico iz temnega stekla in jo hranimo v hladilniku. Ko se reagent razbarva, ga zavržemo.

4.6 *Pufer za redčenje barve*

10 ml raztopine B (4.2), pufru za razvijanje barve, razredčimo z vodo na 100 ml.

4.7 *Raztopina bakrovega sulfata*

0,05 g bakrovega (II) sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) raztopimo v vodi in dopolnimo do 100 ml z vodo.

4.8 *Standardna raztopina fenola*

$0,200 \pm 0,001$ g čistega fenola raztopimo v vodi in v merilni bučki dopolnimo z vodo do 100 ml. To raztopino lahko hranimo več mesecev v hladilniku. Z vodo razredčimo 10 ml te raztopine do 100 ml. Ta razredčena raztopina vsebuje 200 μg fenola v 1 ml in se lahko uporabi za pripravo bolj razredčenih raztopin.

4.9 *Destilirana voda* - prevreta.

4.10 *n-butanol*

5. Oprema

- 5.1 *Analitska tehnica*
- 5.2 *Vodna kopel*, termostatsko regulirana pri $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- 5.3 *Spektrofotometer*, primeren za odčitke pri valovni dolžini 610 nm.
- 5.4 *Filter papir* (Schleicher in Schull 597, Whatman 42 ali enakovreden filter papir).
- 5.5 *Vodna kopel*, vrela
- 5.6 *Aluminijeva folija*

6. Postopek

Varnostni ukrepi

1. Izogibati se je treba direktni sončni svetlobi.
2. Vsa steklovina, zamaški in material za odstranjevanje morajo biti popolnoma čisti. Priporočljivo je, da se sperejo in segrejejo v vodi do vrenja ali obdelajo s paro.
3. Izogibati se je treba uporabi plastičnih materialov (zamaškov na primer), ker lahko vsebujejo fenole.
4. Slina vsebuje fosfatazo, zato se je treba skrbno izogibati kontaminaciji s slino.

6.1 *Priprava vzorca*

6.1.1 S točnostjo 0,1 g tehtamo 10 g vzorca in raztopimo v 90 ml vode. Temperatura za raztapljanje mleka v prahu v nobenem primeru ne sme presegati 35 °C .

6.2 *Določanje*

- 6.2.1 V vsako od obeh epruvet odmerimo 1 ml rekonstituiranega mleka, pripravljenega kot je opisano v 6.1.1.
- 6.2.2 Eno od epruvet segrevamo dve minuti v vreli vodi. Z aluminijevno folijo (5.6) epruveto in vodno kopel (5.5), ki je lahko tudi čaša, pokrijemo, tako da zagotovimo, da se segreva celotna epruveta. Ohladimo v hladni vodi na sobno temperaturo. To epruveto uporabimo za slepi preskus. V vseh naslednjih postopkih z obema epruvetama ravnamo enako.
- 6.2.3 Dodamo 10 ml raztopine C (4.3.2). Premešamo in epruveto postavimo v vodno kopel pri 37 °C (5.2).
- 6.2.4 Inkubiramo 60 minut v vodni kopeli, tako da občasno stresamo.
- 6.2.5 Epruvete takoj prenesemo v vrelo vodno kopel (5.5) in segrevamo dve minuti; ohladimo na sobno temperaturo v hladni vodi.
- 6.2.6 Dodamo 1 ml raztopine D (4.4), premešamo in filtriramo skozi suhi filter papir; prvi filtrat zavržemo, dokler ne dobimo bistre tekočine.
- 6.2.7 5 ml vsakega filtrata damo v epruvete, dodamo 5 ml raztopine B (4.2) in 0,1 ml raztopine E (4.5). Premešamo.
- 6.2.8 Pustimo, da se barva razvija 30 minut na sobni temperaturi, zaščiteno od neposredne sončne svetlobe.
- 6.2.9 Izmerimo absorbanco raztopine vzorca, proti slepemu vzorcu, pri valovni dolžini, ki je navedena v 5.3.
- 6.2.10 Če je absorbanca raztopine nad absorbanco standardne raztopine s koncentracijo $20\text{ }\mu\text{g}$ fenola, pripravljene v skladu s postopkom opisanim v 7. poglavju tega dela priloge, določanje ponovimo. Če je ta meja presežena, razredčimo ustrezen volumen rekonstituiranega mleka v skladu s 6.1.1 s primernim volumnom tega mleka, ki ga previdno segrejemo, kot je navedeno v 6.2.2, da inaktiviramo prisotno fosfatazo.

7. Priprava standardne umeritvene krivulje

- 7.1 V štiri 100 ml merilne bučke odpipetiramo 1,3,5, in 10 ml standardne raztopine, razredčene v skladu s 4.8 in dopolnimo do oznake z vodo; te raztopine vsebujejo 2, 6, 10 in $20\text{ }\mu\text{g}$ fenola na ml.
- 7.2 V epruvete odpipetiramo 1 ml vode ali 1 ml vsake standardne raztopine (7.1), da dobimo serijo vzorcev, ki vsebujejo 0 (slepa vrednost, ki jo dobimo z uporabo 1 ml vode), 2, 6, 10 in $20\text{ }\mu\text{g}$ fenola.
- 7.3 V vsako epruveto zaporedno odpipetiramo 1 ml raztopine bakrovega (II) sulfata (4.7), 5 ml raztopine puferne raztopine (4.6), 3 ml vode in 0,1 ml raztopine E (4.5). Premešamo.
- 7.4 Epruvete pustimo 30 minut na sobni temperaturi, zaščitene pred neposredno sončno svetlobo.
- 7.5 Izmerimo absorbanco raztopin v vsaki od epruvet, v primerjavi s slepo vrednostjo, pri valovni dolžini, navedeni v 5.3.
- 7.6 Pripravimo standardno umeritveno krivuljo, tako da nanašamo vrednosti absorbance proti količinam fenola v μg , kot je navedeno v 7.2.

8. Podajanje rezultatov

8.1 Izračun

8.1.1 Z uporabo standardne umeritvene krivulje pretvorimo številke pod 6.2.9 v μg fenola.

8.1.2 Izračunamo fosfatazno aktivnost, izraženo kot μg fenola na ml rekonstituiranega mleka v skladu z naslednjo formulo:

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

kjer je:

P – vsebnost fenola v μg v skladu z 8.1.1

8.1.3 Če je treba razredčiti, kot je navedeno pod 6.2.10, pomnožimo rezultat, ki ga dobimo v 8.1.2, s faktorjem redčenja.

8.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatom dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presegati 2 μg fenola, sproščenega iz 1 ml rekonstituiranega mleka.

IX. DOLOČANJE AKTIVNOSTI FOSFATAZE (ASCHAFFENBURGOV IN MÜLLENOV POSTOPEK)

METODA 8

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda opisuje določanje aktivnosti fosfataze v:

- sušenem mleku z visoko vsebnostjo maščobe ali mleku v prahu z visoko vsebnostjo maščobe,
- sušenem polnem mleku ali polnomastnem mleku v prahu,
- sušenem delno posnetem mleku ali delno posnetem mleku v prahu,
- sušenem posnetem mleku ali posnetem mleku v prahu.

2. Definicija

Aktivnost fosfataze sušenega mleka je merilo količine aktivne alkalne fosfataze, ki je prisotna v izdelku. Izraža se kot količina p-nitrofenola, v mikrogramih, sproščenega iz 1 ml rekonstituiranega vzorca, pod opisanimi pogoji.

3. Princip metode

Rekonstituirani vzorec je razredčen s pufrovim substratom pri pH 10,2 in inkubiran pri temperaturi 37 °C dve uri. Kakršna koli alkalna fosfataza, ki je prisotna v vzorcu, bo iz dodanega dinatrijevega p-nitrofenil fosfata v teh okoliščinah sprostila p-nitrofenol. Sproščeni p-nitrofenol se določa z neposredno primerjavo s standardnimi barvnimi stekli v enostavnem komparatorju, tako da uporabimo reflektirano svetlobo.

4. Reagenti

4.1 Raztopina pufru natrijevega karbonata-hidrogenkarbonata

Raztopimo 3,5 g brezvodnega natrijevega karbonata in 1,5 g natrijevega hidrogen karbonata v vodi in razredčimo z vodo do 1000 ml v merilni bučki.

4.2 Substrat pufru

Raztopimo 1,5 g dinatrijevega p-nitrofenilfosfata v puftru natrijevega karbonata-hidrogen karbonata (4.1) in razredčimo s pufrom do 1 000 ml v merilni bučki (4.1).

Ta raztopina je stabilna en mesec, kolikor je shranjena v hladilniku (≤ 4 °C), vendar se mora na tako shranjenih raztopinah izvesti barvni kontrolni test – glej 6. poglavje tega dela priloge, varnostni ukrep št. 3.

4.3 Raztopine za bistrenje

4.3.1 Raztopina cinkovega sulfata

Raztopimo 30,0 g cinkovega sulfata (ZnSO_4) v vodi in v merilni bučki razredčimo z vodo do 100 ml.

4.3.2 Raztopina kalijevega heksacianoferata (II)

17,2 g kalijevega heksacianoferata (II) trihidrata ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) raztopimo v merilni bučki in razredčimo z vodo do 100 ml.

5. Oprema

5.1 *Analitska tehnica*

5.2 *Vodna kopel*, termostatsko regulirana pri $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3 *Komparator s posebnim diskom*, ki vsebuje standardna barvna stekla kalibrirana v μg p-nitrofenola na ml mleka in $2 \times 25\text{ mm}$ kivete.

6. Postopek

Varnostni ukrepi:

1. Po uporabi je treba epruvete izprazniti, izprati z vodo, oprati v vroči vodi, ki vsebuje bazični detergent, ter nato dobro sprati in očistiti z vročo tekočo vodo. Končno jih je treba sprati v vodi in pred uporabo posušiti. Takoj po uporabi je treba pipete temeljito sprati v čisti hladni tekoči vodi, ter nato sprati v vodi in posušiti pred uporabo.
2. Zamaške za epruvete je treba takoj po uporabi temeljito sprati v vroči tekoči vodi, ter nato v vreli vodi za dve minuti.
3. Raztopina pufrovega substrata (4.2) ostane stabilna najmanj en mesec, če je shranjena v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali manj. Kakršna koli nestabilnost se pokaže tako, da se pojavi rumena barva. Medtem ko se rezultati testa vedno odčitajo proti z prevretemu kontrolnemu vzorcu, ki vsebuje isto raztopino barvnega substrata, se priporoča, da se ta raztopina ne uporabi, če je barvni odčitek več kot $10\text{ }\mu\text{g}$, kadar ga odčitamo v 25 mm kiveti v komparatorju merjeno proti destilirani vodi v drugi 25 mm kiveti.
4. Za vsak vzorec uporabimo svojo pipeto in pazimo, da pipete ne kontaminiramo s slino.
5. Test se ne sme nikoli izpostaviti neposredni sončni svetlobi.

6.1 *Priprava vzorca*

10 g mleka v prahu raztopimo v 90 ml vode. Temperatura za raztapljanje mleka v prahu ne sme presegati $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 *Določanje*

6.2.1 V čisto, suho epruveto odpipetiramo 15 ml pufernega substrata (4.2), in dodamo 2 ml rekonstituiranega vzorca (6.1) za testiranje. Zamašimo epruveto, premešamo z obračanjem in postavimo v na vodno kopel pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5.2).

6.2.2 Na vodno kopel istočasno postavimo kontrolno epruveto, ki vsebuje 15 ml pufernega substrata in 2 ml prevretega rekonstituiranega vzorca, ki je podoben tistemu, ki se testira.

6.2.3 Po dveh urah odstranimo obe epruveti iz vodne kopeli, dodamo 0,5 ml cinkovega sulfata za obarjanje (4.3.1), ponovno zamašimo, temeljito stresamo in pustimo stati tri minute. Za obarjanje (4.3.2) dodamo 0,5 ml kalijevega heksacianoferata (II), temeljito premešamo in filtriramo skozi naguban filter papir (5.4) ter zberemo čisti filtrat v čisto epruveto.

6.2.4 Filtrat prenesemo v 25 mm kiveto in ga v komparatorju primerjamo s filtratom prevretega kontrolnega vzorca, tako da uporabimo poseben disk (5.3).

7. Podajanje rezultatov

7.1 *Izračun*

Neposreden odčitek, ki ga dobimo pod 6.2.4 je zabeležen kot μg p-nitrofenol na ml vzorca ali na ml rekonstituiranega vzorca.

7.2 *Ponovljivost*

Razlika med rezultatoma dveh določanj, izvedenih istočasno ali drugo za drugim, na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presegati $2\text{ }\mu\text{g}$ p-nitrofenola sproščenega iz 1 ml rekonstituiranega mleka.