
Na osnovu člana 17. stav 3. i člana 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04), i člana 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 saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 62. sjednici održanoj 3. septembra 2013. godine, donijelo je

PRAVILNIK
O METODAMA ANALIZA TERMIČKI OBRADENOG
MLIJEKA ZA ISHRANU LJUDI
DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Član 1.

(Predmet propisa)

- (1) Ovim pravilnikom propisuju se referentne metode uzimanja uzoraka i referentne metode analiza termički obrađenog mlijeka namijenjenog za ishranu ljudi radi kontrole kvaliteta.
- (2) Referentne metode analiza termički obrađenog mlijeka su sljedeće:
 - a) određivanje udjela ukupne suhe tvari;
 - b) određivanje udjela masti;
 - c) određivanje udjela bezmasne suhe tvari;
 - d) određivanje udjela ukupnog dušika;
 - e) određivanje udjela proteina;
 - f) određivanje specifične mase.

Član 2.

(Izvedba referentnih metoda)

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

Član 3.

(Metode ispitivanja)

Metode iz člana 1. ovog pravilnika propisane su u Aneksu II. koji je sastavni dio ovog pravilnika.

DIO DRUGI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Član 4.

(Službena kontrola i inspeksijski nadzor)

Službena kontrola i inspeksijski nadzor provodi se u skladu s važećim propisima.

Član 5.

(Prestanak važenja odredbi)

Danom stupanja na snagu ovog pravilnika prestaju važiti odredbe Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka te metodama hemijskih 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-hemijske analize mlijeka i 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 termički obrađeno mlijeko.

Član 6.

(Primjena Pravilnika)

Mlijeko uzorkovano i analizirano u skladu s odredbama propisa navedenim u članu 4. ovog pravilnika može se stavljati na tržište 12 mjeseci od dana stupanja na snagu ovog pravilnika.

Član 7.

(Stupanje na snagu)

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH".

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

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Vjekoslav Bevanda, s. r.

ANEKS I.**DIO I. OPĆE ODREDBE****1. UVOD**

Propisane su opće odredbe vezane za reagense, opremu, izražavanje rezultata, preciznosti i analitičke izvještaje. Laboratoriji zaduženi za provođenje uzorkovanja i ispitivanja mlijeka moraju zadovoljavati odredbe ovog 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 drugačije navedeno.

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

2.2. Hemijske tvari

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

3. OPREMA**3.1. Spisak opreme**

Spiskovi 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 drugačije navedeno, rezultati navedeni u analitičkom izvještaju iz tačke 6. ovog aneksa odnose se na aritmetičku vrijednost dobivenu iz dvije analize koje zadovoljavaju kriterij ponovljivosti iz tačke 5.1.1. ovoga aneksa naveden za tu metodu. Ako kriterij ponovljivosti nije zadovoljen, analiza mora biti ponovljena, ako je to moguće, ili rezultat proglašen nevažećim.

4.2. Izračunavanje masenog udjela

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

5. KRITERIJI PRECIZNOSTI: PONOVLJIVOST I OBNOVLJIVOST

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

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

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

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

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

6. ANALITIČKI IZVJEŠTAJ

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

DIO II. UZORKOVANJE TERMIČKI OBRAĐENOG MLIJEKA**1. OBIM I OBLAST PRIMJENE**

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

2. OPĆE ODREDBE

Uzorkovanje termički obrađenog mlijeka u spremnicima i drugom provest će stručno lice koje je prošlo odgovarajuću obuku prije uzorkovanja mlijeka.

Ako je to potrebno, nadležno tijelo ili ispitni laboratorij mora osoblje koje radi uzorkovanje podučiti tehnikama

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

Ako je to potrebno, nadležno tijelo ili ispitni laboratorij moraju uputiti osoblje koje radi uzorkovanje na obuku označavanja uzorka kako bi se osigurao nedvosmisleni 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. Kašika mora imati čvrstu ručku dovoljne dužine kako bi se omogućilo uzimanje uzorka na bilo kojoj dubini u spremniku. Kapacitet kašike 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 uticati na rezultate analize. Sve površine opreme za uzorkovanje i spremnika za uzorke moraju biti čiste i suhe, glatke i bez pukotina, i rubovi im trebaju biti zaobljeni.

4. TEHNIKE UZORKOVANJA

4.1. Opće odredbe

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

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

4.2. Ručno uzorkovanje

4.2.1. Uzorkovanje iz više posuda

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

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

4.2.2.1. Miješanje mlijeka odgovarajućim postupkom prije uzorkovanja.

Za miješanje sadržaja velikih posuda ili skladišnih, željezničkih i drumskih spremnika savjetuje se korištenje mašinske miješalice u skladu s tačkom 4.2.2.2. ovog aneksa.

Vrijeme miješanja odgovara vremenskom periodu u kojem je mlijeko mirovalo. Potrebno je dokazati da efikasnost postupka miješanja koji se primijeni pod bilo kojim okolnostima odgovara potrebama predviđene analize; kriterij efikasnosti miješanja naročito utiče na sličnost rezultata analize provedene na uzorcima uzetim ili iz različitih dijelova pošiljke, ili iz ispusta spremnika u razmacima tokom pražnjenja. Postupak miješanja (neobrađenog ili punomasnog) mlijeka smatrat će se efikasnim ako razlika u količini masti koju sadrže dva uzorka uzeta pod ovim uslovima iznosi manje od 0,1%. U velikoj posudi sa ispustom za izlivanje na dnu može na tački izlivanja postojati manja količina mlijeka koja nije

reprezentativna za cjelokupni sadržaj čak ni nakon miješanja. Stoga je bolje uzimati uzorke kroz gornji otvor. Ako 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 drumskih spremnika može se provesti na sljedeće načine:

- mašinskom 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 drumskih 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 pritisak i volumen zraka kako bi se spriječilo nastajanje užeglosti.

4.3. Uzorkovanje termički obrađenog mlijeka za ishranu ljudi u maloprodajnoj ambalaži

Uzorci termički obrađenog mlijeka za ishranu ljudi u maloprodajnoj ambalaži moraju biti u originalnom pakiranju. Ako je moguće, uzorke treba uzeti iz mašine 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 termički obrađenog mlijeka (pasteriziranog, UHT- obrađenog i steriliziranog) i to u broju koji odgovara analizama koje će se vršiti i u skladu s uputstvima koja je propisao laboratorij koji provodi ispitivanja ili drugo nadležno tijelo.

5. IDENTIFIKACIJA UZORKA

Uzorak treba biti označen identifikacionim kodom tako da se može odmah identificirati prema uputstvima laboratorija koji provodi analize ili drugog nadležnog tijela.

6. ČUVANJE, TRANSPORT I SKLADIŠTENJE UZORAKA

Laboratorij koji provodi analize dužan je pripremiti uputstva vezana za uslove čuvanja (hemijske, temperature), transporta, skladištenja i vremenskih perioda između uzorkovanja i analize mlijeka prema vrsti mlijeka i postupku analize koji se koristi.

Uputstva treba da sadržavaju sljedeće:

- Tokom transporta i skladištenja treba preduzeti preventivne mjere kojima će se spriječiti izlaganje stranim mirisima i direktnoj 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. OBIM I OBLAST PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. PRINCIP

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

4. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Potrebna laboratorijska oprema, a naročito:

- 4.1. Analitička vaga
- 4.2. Eksikator, s efikasnim 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 20 do 25 mm, promjera 50 do 75 mm, i od odgovarajućeg materijala, zajedno s poklopcima koji dobro prijanjaju i lako se uklanjaju.
- 4.5. Vruće vodeno kupatilo
- 4.6. Homogenizator

5. PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU

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

Može se koristiti homogenizator kao pomagalo pri raspršivanju masti.

Ne može se očekivati dobivanje tačnih rezultata ako uzorak sadrži odvojenu tekuću mast ili vidljive odvojene bijele čestice nepravilnog oblika koje prijanjaju uz zidove 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 $102 \pm 2^\circ\text{C}$, bar 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 tačnošću od 0,1 mg.

6.2. Uzorak za analizu

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

6.3. Određivanje

6.3.1. Predsušiti posudu 30 minuta grijući je na vrućem vodenom kupatilu (4.5.).

6.3.2. Zagrijavati posudu, s poklopcem pored 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 tačnošću od 0,1 mg.

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

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

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

7.1. Izračunavanje i formula

Izračunavanje masenog udjela suhe tvari iz:

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

pri čemu je

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

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

m_1 = masa posude, poklopca i uzorka za analizu prije

sušenja (pogledati 6.2.), u gramima,

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

Zaokružiti dobivenu vrijednost s tačnošću 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. OBIM I OBLAST PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. PRINCIP

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

4. REAGENSI

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

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

4.1. Rastvor amonijaka, koji sadrži otprilike 25% (m/m) NH_3 . Može se koristiti i rastvor amonijaka veće koncentracije (pogledati 6.5.1. i A.1.5.1.).

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

4.3. Rastvor kongo crvenila ili krezol crvenila
Rastvoriti 1 g kongo crvenila ili krezol crvenila u vodi i razvodniti do 100 ml.

Napomena: Korištenje ovog rastvora, koji omogućava da se lakše vidi granica između sloja rastvarača i vodenog sloja, nije obavezno (pogledati 6.5.2.). Mogu se koristiti i drugi vodeni rastvori u boji ako ne utiču na rezultate određivanja.

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

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

4.6. Smjesa rastvarača, pripremljena 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 rastvarača, sva korištena električna

oprema mora biti u skladu s propisima koji se odnose na korištenje tih rastvarača.

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.) rotacionom frekvencijom od 500 do 600 okretaja u minuti kako bi se proizvelo gravitaciono polje od 80 do 90 g na vanjskim krajevima tikvica ili epruveta.
Napomena: Korištenje centrifuge nije obavezno (6.5.5.).
- 5.3. Destilator ili instrument za isparavanje, kako bi se omogućilo destiliranje rastvarača i etanola iz tikvica ili isparavanje iz čaša i zdjela (pogledati 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 ventilacionim otvorom(ima), i u kojem se temperatura može održavati na $102 \pm 2^\circ\text{C}$ na cijelom radnom prostoru. Sušionik bi trebalo da bude opremljen odgovarajućim termometrom.
- 5.5. Vodeno kupatilo, u kojem se temperatura može održavati na 35 – 45°C.
- 5.6. Tikvice za ekstrakciju masti tipa Mojonnier
Napomena: Moguće je koristiti i epruvete za ekstrakciju sifonom ili nastavcima boce štrcaljke, ali u tom slučaju je postupak drugačiji te je naveden u dodatku.
Tikvice (ili epruvete) moraju imati čepove od brušenog stakla, kvalitetnog pluta ili drugog materijala na koje ne djeluju reagensi koji se koriste. Čepove od pluta treba ekstrahirati dietileterom (4.4.), namakati u vodi pri 60°C ili najmanje 15 minuta, a nakon toga ostaviti da se ohladi u vodi kako bi ostali zasićeni pri korištenju.
- 5.7. Stalak, za držanje tikvica (ili epruveta) za ekstrakciju masti (pogledati 5.6.).
- 5.8. Boca štrcaljka, za korištenje smjese rastvarača (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. Ako se koriste metalne posude, najbolje je da su od nehrđajućeg čelika, s ravnim dnom, po mogućnosti s noscem, i treba da budu promjera 80 do 100 mm i visine oko 50 mm.
- 5.10. Pomagala za ključanje, bez masti, od neporoznog porculana ili silicijevog karbida ili staklenih kuglica (neobavezno u slučaju metalnih zdjela).
- 5.11. Menzure, kapaciteta 5 i 25 ml.
- 5.12. Pipete, s označenom skalom, kapaciteta 10 ml.
- 5.13. Klijesta, 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 vodenog kupatila. Temeljito, ali lagano promiješati uzorak stalnim okretanjem 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 okretanjem boce tri ili četiri puta i odmah izvagati, s tačnošću od 1 mg, 10 do 11 g uzorka za analizu, direktno ili na osnovu razlike, i prenijeti ga u tikvicu za ekstrakciju (5.6.).

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

6.3. Slijepa proba

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

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

6.4. Priprema posude za sakupljanje masti

Osušiti posudu (5.9.) zajedno s nekoliko pomagala za ključanje (5.10.) kako bi se potaknulo lagano ključanje tokom narednog uklanjanja rastvarača u sušioniku (5.4.) u trajanju 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 bar jedan sat, a metalne posude bar 30 minuta). Koristiti klijesta za stavljanje posude na vagu i provedite vaganje s tačnošću od 0,1 mg, te pri tome treba izbjegavati promjene temperature.

6.5. Određivanje

6.5.1. Dodati 2 ml rastvora amonijaka (4.1.) ili odgovarajući volumen rastvora amonijaka veće koncentracije i temeljito pomiješati sa 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 rastvora 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 pokvašenim vodom (pogledati 5.6.), i tresti tikvicu umjerenom jačinom (kako bi se izbjeglo stvaranje postojećih emulzija) jednu minutu s tikvicom u vodoravnom položaju, tako da manji dio stoji prema gore. Povremeno dopustiti da se tekućina iz većeg dijela pretoči u manji dio. Prema potrebi, ohladiti tikvicu u vodi iz slavine, a zatim pažljivo ukloniti čep od pluta ili drugi zatvarač i pomoću boce štrcaljke (5.8.) isprati njega i vrat tikvice s malo smjese rastvarača (4.6.) tako da isprani sadržaj uđe u tikvicu.

6.5.4. Dodati 25 ml petroletera (4.5.), zatvoriti tikvicu ponovo nakvašenim čepom od pluta ili drugim zatvaračem (ponovo pokvasiti uranjanjem u vodu), i lagano tresti tikvicu 30 sekundi kako je opisano u tački 6.5.3.

6.5.5. Centrifugirati zatvorenu tikvicu 1 do 5 minuta rotacionom brzinom od 500 do 600 okretaja u minuti (5.2.). Ako centrifuga nije na raspolaganju (pogledati napomenu uz 5.2.), ostaviti zatvorenu tikvicu da stoji na stalku (5.7.) bar 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 unutrašnju stranu vrata tikvice s malo smjese rastvarača (4.6.) tako da isprani sadržaj uđe u tikvicu.

Ako se granica nalazi ispod kraja vrata tikvice, isprani sadržaj treba podignuti nešto iznad tog nivoa lagano ulijevajući vodu niz zid tikvice tako da se olakša prelijevanje rastvarača.

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

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

rastvarača ne prelije preko vanjskog dijela tikvice za ekstrakciju.

Prema želji se rastvarač ili dio rastvarača može ukloniti iz posude destilacijom ili isparavanjem kako je opisano u tački 6.5.12.

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

6.5.10. Provesti drugu ekstrakciju ponavljanjem radnji opisanih u tačkama 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 izlivanje rastvarača bude što potpunije.

6.5.11. Provesti treću ekstrakciju daljnjim ponavljanjem radnji opisanih u tačkama 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 izlivanje rastvarača bude što potpunije. Treća ekstrakcija može se ispustiti kod obranog mlijeka.

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

6.5.13. Grijati posudu za sakupljanje masti (s tikvicom pored nje kako bi para rastvarača 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 bar sat vremena, a metalne posude bar 30 minuta) i izvršiti mjerenje s tačnošću od 0,1 mg.

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

6.5.14. Ponavljati radnje opisane u tački 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 topiva. Lagano zagrijati i miješati rastvarač dok se sva mast ne rastvori.

Ako je ekstrahirana tvar u potpunosti topiva 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. Ako je ekstrahirana tvar u potpunosti topiva u petroleteru, ili u slučaju sumnje, u potpunosti ekstrahirati mast iz posude ponavljanjem ispiranjem toplim petroleterom. Pustiti sve tragove netopive tvari da se slegnu i pažljivo izliti petroleter bez da se ukloni netopiva tvar. Ponoviti ovaj postupak još tri puta korištenjem petroletera za ispiranje unutrašnjosti vrata posude.

Na kraju isprati vanjski dio vrha posude smjesom rastvarača tako da se rastvarač 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 tačkama 6.5.13. i 6.5.14.

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

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

7.1. Izračunavanje 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 tački 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 tački 6.5.16., u gramima,

m_3 = masa posude za sakupljanje masti korištene u slijepoj probi (6.3.) i sav ekstrahirani materijal određen u tački 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 netopljenog materijala, posude za sakupljanje masti i netopivog taloga određenog u tački 6.5.16., u gramima.

Prikazati rezultat s tačnošću od 0,01 mg.

7.2. Preciznost

7.2.1. Ponovljivost (r):

- za punomasno mlijeko i djelimično 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 djelimično 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. OBIM I OBLAST PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA I IZRAČUNAVANJE

Udio bezmasne suhe tvari izražava se kao maseni udio.

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

DIO IV. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNOG DUŠIKA

1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. PRINCIP

Izmjerena količina uzorka mlijeka tretira se koncentriranom sumpornom kiselinom i kalijevim sulfatom i bakar(II)-sulfatom kao katalizatorom, kako bi se dušik iz

organskih spojeva preveo u amonijev sulfat. Amonijak se oslobađa dodavanjem rastvora natrijevog hidroksida, a zatim se destilira i apsorpira u rastvor borne kiseline. To se titrira kiselim rastvorom.

4. REAGENSI

- 4.1. Kalijev sulfat (K_2SO_4).
 - 4.2. Rastvor bakar-sulfata. Rastvoriti 5,0 g bakar(II) - sulfata pentahidrata ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) u vodi i razvodniti do 100 ml (na 20°C) u odmjernoj tikvici.
 - 4.3. Sumporna kiselina, bar 98,0 % (m/m) H_2SO_4 .
 - 4.4. Rastvor natrijevog hidroksida, 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (20°C).
- Napomena: može se koristiti i rastvor natrijevog hidroksida manje koncentracije, npr. 40 % (m/m) 572 g/l, 20°C; ili 30 % (m/m) 399 g/l, 20°C.
- 4.5. Rastvor borne kiseline. Rastvoriti 40 g borne kiseline (H_3BO_3) u jednom litru vruće vode, ostaviti da se ohladi i spremiti u bocu od borosilikatnog stakla.
 - 4.6. Indikatorski rastvor. Rastvoriti 0,01 g crvenog metila, 0,02 g plavog bromtimola i 0,06 g zelenog bromkrezola u 100 ml etanola. Spremiti rastvor u smeđu zatvorenu bocu na hladno i tamno mjesto.
 - 4.7. Volumetrijski rastvor $c(1/2 H_2SO_4)$ ili $c(HCl) = 0,1$ mol/l standardizirana s tačnošću od 0,0001 mol/l.
 - 4.8. Saharoza bez dušika.
 - 4.9. Amonijeva so, 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 dihidrohlorid ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ ili $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$).

Napomena: Čistoća reagensa u tačkama 4.9. i 4.10. trebalo bi da bude iznad stepena "analitičke čistoće". Ako je na raspolaganju, trebalo bi da se koristi certificirani rastvor 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 sa označenim skalama, staklene, kapaciteta 50, 100 i 250 ml.
- 5.5. Digestor u nagnutom položaju (oko 45°), s električnim grijačima ili plinskim plamenicima koji ne zagrijavaju tikvicu iznad nivoa njenog sadržaja, sa sistemom za ekstrahiranje dima.
- 5.6. Destilator, izrađen od borosilikatnog stakla, na koji se može spojiti Kjeldahlova tikvica (5.1.) i koji se sastoji od efikasne glave štrcaljke povezane s efikasnim hladilom s ravnom unutrašnjom 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, građuirane na 200 ml.
- 5.9. Bireta kapaciteta 50 ml, građuirana na 0,1 ml, s maksimalnom mogućnošću greške $\pm 0,05$ 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 rastvora bakar-sulfata (4.2.), otprilike 5 g uzorka mlijeka (izmjenjenog s tačnošću od 0,001 g) i 25 ml sumporne kiseline (4.3.). Koristiti kiselinu za ispiranje rastvora bakar-sulfata, kalij-sulfata ili mlijeka na vratu tikvice, i lagano promiješati sadržaj tikvice.

Napomena: Budući da organska tvar troši sumpornu kiselinu tokom 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 plavozelene boje. Tada lagano kuhati bar 1,5 sat. Primiti na znanje sljedeće:

- (a) ne bi trebalo proći više od jednog sata da sadržaj tikvice postane bistar, a razgradnja ukupno ne bi trebalo da traje manje od 2,5 sata. Ako je potrebno više od jednog sata za razbistravanje, ukupno trajanje razgradnje treba se povećati u skladu s tim.
 - (b) dodati kalijev sulfat potiče razgradnju budući da podiže temperaturu ključanja smjese. Ako je preostali volumen H_2SO_4 manji od otprilike 15 ml na kraju razgradnje, dušik je možda izgubljen zbog prekomjernog zagrijavanja. Kod plinskog grijanja trebate zagrijati tikvicu na ploči od toplotno izolacionog materijala, s kružnim otvorom takvog promjera da slobodni plamen samo dodiruje dio tikvice koja je ispod površine tekućeg sadržaja (5.5.).
 - (c) ako crne čestice uđu u vrat tikvice i ne spere ih se u potpunosti u trbuh tikvice kretanjem kiseline u početnim fazama perioda snažnog zagrijavanja (to bi se moglo olakšati okretanjem tikvice), treba pustiti da se tikvica dovoljno ohladi i pažljivo je isprati minimalnom količinom vode. Zatim nastaviti razgradnju kako je gore opisano.
- 6.3. Kada se Kjeldahlove tikvice u potpunosti ohlade, dodati 300 ml vode (pogledati napomenu) u svaku tako da se pažljivo ispere vrat tikvice, i temeljito promiješati sadržaj pazeći na to da se kristali koji su se odvojili otope. Dodati pomagala za ključanje (5.2.) kako bi se osiguralo jednolično ključanje. Zatim u svaku tikvicu dodati 70 ml rastvora natrijevog hidroksida (4.4.) (pogledati napomenu) lagano ulijevajući rastvor kroz nakošeni vrat tikvice da se stvori donji sloj u trbušastom dijelu; ne moćiti vrh vrata rastvorom natrijevog hidroksida.
- Napomena: Potrebno je da zajednički volumen vode i rastvora 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 rastvora natrijevog hidroksida koncentracije manje od 47% (m/m), volumen dodate vode smanjit će se prema tome. Naprimjer, ako se doda 85 ml od 40% (m/m) ili 125 ml od 30% (m/m) rastvora natrijevog hidroksida, volumen dodate 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) indikatorskog rastvora (4.6.) u čunjastoj tikvici (5.8.). Zavrtiti sadržaj svake Kjeldahlove tikvice kako bi

se temeljito promiješao i zakuhao, ali u početku lagano kako bi se spriječio pretjerano pjenjenje. Nakon što se sakupi 100 do 125 ml destilata, spuštati svaku čunjastu tikvicu dok se vršak odvodne cijevi hladila ne nađe na otprilike 40 mm iznad oznake za 200 ml. Nastaviti sa svakom pojedinačnom destilacijom dok ne počne neujednačeno ključanje, a zatim odmah prestati sa zagrijavanjem. Odvojiti sve Kjeldahlove tikvice i isprati vrh odvodnih cijevi hladila pomoću malo vode, sakupljajući isprani sadržaj u čunjastu tikvicu.

Treba znati sljedeće:

- Stepen 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.
- Efikasnost svakog hladila trebalo bi da bude takva da temperatura sadržaja svake čunjaste tikvice ne prelazi 25°C tokom destilacije.

6.5. Titrirati svaki destilat sa standardnim volumetrijskim rastvorom (4.7.) dok pH ne bude $4,6 \pm 0,1$, i pri tome koristiti pH-metar i po želji automatsku biretu. Dodavanje indikatora pomaže pri provjeravanju pravilnog toka titracije. Očitati vrijednosti na bireti s tačnošću 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 pripremljenog rastvora od 150 ml vode u koju je dodato 50 ml rastvora borne kiseline i 0,20 ml indikatora sadržanog u čunjastoj tikvici (5.8.).

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

Napomena: Za titraciju slijepog destilata potreban je mali volumen standardnog volumetrijskog rastvora (4.7.).

6.7. Redovno provjeravati ispravnost postupka korištenjem dva rekuperacijska eksperimenta prateći postupak opisan u tačkama od 6.1. do 6.5.

6.7.1. Provjeriti da li dolazi do gubitka dušika zbog prekomjernog zagrijavanja ili mehaničkih curenja tokom destilacije, i to korištenjem uzorka za analizu od 0,15 g amonijevog oksalata ili sulfata (4.9.) izmjenjenog s tačnošću 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 netačnost koncentracije standardnih rastvora (4.7.).

6.7.2. Provjeriti da li je 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 trebalo bi da budu provedena s tačnošću od 0,001 g. Najmanje 98 - 99% dušika trebalo bi da bude rekuperirano.

7. SIGURNOSNE MJERE

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

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

8. IZRAŽAVANJE REZULTATA

8.1. Izračunavanje i formula:

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

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

Pri čemu je:

W_N = udio dušika,

V = volumen standardnog volumetrijskog rastvora

kiseline korištene pri određivanju, u mililitrima,

V_0 = volumen standardnog volumetrijskog rastvora

kiseline korištene u slijepoj probi, u mililitrima,

c = koncentracija, izražena u molima po litru standardnog volumetrijskog rastvora 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 tačkama 5.5. i 5.1. U tom slučaju svaki uređaj treba zasebno provjeriti kako bi se utvrdile moguće nepravilnosti (6.7.).

9.2. Koristiti parnu destilaciju umjesto direktnog zagrijavanja tikvica (6.4.). Kada instrument ne dozvoljava korištenje destilirane vode, treba obratiti pažnju na to da li voda sadrži 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).
- se ukupno trajanje razgradnje (6.2.) smanji na 75 minuta.
- se količina rastvora natrijevog hidroksida (6.3.) smanji u istom omjeru (1/5).
- se mora koristiti standardni kiseli rastvor (4.7.) niže koncentracije (0,02 do 0,03 mol/l).

Napomena: Korištenje jedne ili više od ovih mogućnosti prihvatljivo je samo ako su vrijednost ponovljivosti (8.2.1.) i rezultati dvije provjere tačnosti (6.7.) u skladu sa uslovima propisanim ovom metodom.

DIO V. ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA

1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

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

2. DEFINICIJA

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

3. IZRAČUNAVANJE

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

DIO VI. ODREĐIVANJE SPECIFIČNE MASE**1. OBIM I OBLAST PRIMJENE**

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

2. DEFINICIJA

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

3. PRINCIP

Specifična masa na 20°C određuje se hidrometrom.

4. OPREMA I STAKLENI PRIBOR

Potrebna laboratorijska oprema, a naročito:

4.1. Hidrometar

Specifični gravitacioni hidrometar je instrument koji se sastoji od staklenog plovka koji je u donjem dijelu širok i težak. Cilindrična staklena cjevčica je spojena na gornji kraj plovka te stoji uporedo s njim; gornji dio cjevčice je zatvoren.

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

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 trebalo bi da budu sljedeće:

- unutrašnji promjer otprilike 35 mm
- unutrašnja visina otprilike 225 mm.

4.3. Vodeno kupatilo regulirano na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.**4.4. Vodeno kupatilo regulirano na $40 \pm 2^\circ\text{C}$.****4.5. Termometar, sa označenom skalom podijeljenom na $0,5^\circ\text{C}$.****5. POSTUPAK**

5.1. Promiješati uzorak okretanjem kako bi se raspršila mast te ga staviti u vodeno kupatilo na 40°C (4.4.). Pustiti da uzorak dostigne temperaturu od 40°C i održavati tu temperaturu pet minuta. Temeljito promiješati laganim okretanjem kako bi se mast ravnomjerno rasporedila. Uzorak ohladiti na 20°C u drugom vodenom kupatilu (4.3.).

5.2. Temeljito promiješati uzorak laganim okretanjem kako bi se izbjeglo miješanje zraka. Ulići mlijeko u cilindar (4.2.) koji se mora držati nagnutim kako bi se izbjeglo stvaranje pjene. Koristiti dovoljnu količinu uzorka mlijeka kako bi bili sigurni da će se dio preliti 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 trebalo da dodiruje stranice cilindra.

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

5.4. Odmah nakon što se izvrši očitavanje na hidrometru, staviti termometar (4.5.) u uzorak i očitati temperaturu s tačnošću od $0,5^\circ\text{C}$. Temperatura ne smije odstupati $\pm 2^\circ\text{C}$ na $\pm 20^\circ\text{C}$.

6. ISPRAVKA TEMPERATURE

6.1. Ako temperatura uzorka mlijeka ne iznosi tačno 20°C pri mjerenju specifične mase, onda se dobiveni rezultat mora ispraviti dodavanjem određenoj specifičnoj masi 0,0002 za svaki stepen celzija iznad 20°C , ili oduzimanjem 0,0002 za svaki stepen celzija ispod 20°C . Ova ispravka

provodi se samo ako temperatura uzorka mlijeka odstupa od 5°C do 20°C .

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

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 pri tome koristiti 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 rastvora amonijaka (4.1.), ili jednaki volumen rastvora 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 rastvora kongo crvenila ili krezol crvenila (4.3.).

A.1.5.3. Dodati 25 ml dietiletera (4.4.), zatvoriti epruvetu plutenim čepom zasićenim vodom ili zatvaračem natopljenim vodom (5.6.), i snažnije tresti epruvetu (kako bi se izbjeglo nastajanje postojećih emulzija) i preokretati je jednu minutu. Ako 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 rastvarača (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 ponovo natopljenim plutenim čepom ili drugim zatvaračem (ponovo ga natopiti uranjanjem u vodu), i lagano tresti epruvetu 30 sekundi kako je opisano u tački A.1.5.3.

A.1.5.5. Centrifugirati zatvorenu epruvetu jednu do pet minuta s rotacionom frekvencijom od 500 do 600 okretaja na minutu (5.2.). Ako centrifuga nije na raspolaganju (pogledati napomenu pod 5.2.), pustiti zatvorenu epruvetu da stoji u stalku (5.7.) bar 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 rastvarača 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 unutrašnji krak nastavka dok dovod ne bude otprilike 3 mm iznad granice između slojeva. Unutrašnji krak nastavka treba biti paralelan sa osom 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 (neobavezno s metalnim zdjelama), izbjegavajući da se pri tome prenese dio vodenog sloja. Isprati odvod nastavka s malo smjese rastvarača, 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 dužeg unutrašnjeg kraka s malo smjese rastvarača. Spustiti i ponovo umetnuti nastavak pa prenijeti isprani sadržaj u posudu za sakupljanje masti.

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

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

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

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

Treća ekstrakcija može se izostaviti kod obranog mlijeka.

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