

31992D0608

31.12.1992

ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ

L 407/29

РЕШЕНИЕ НА СЪВЕТА
от 14 ноември 1992 година
за определяне на методи за анализ и изследване на топлинно обработеното мляко, предназначено за
пряка консумация от човека

(92/608/ЕИО)

СЪВЕТЪТ НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 85/397/ЕИО на Съвета от 5 август 1985 г. относно здравните и ветеринарно-санитарните проблеми, засягащи търговията в Общността с топлинно обработено мляко ⁽¹⁾, и по-специално член 11, параграф 6 от нея,

като взе предвид предложението на Комисията,

като има предвид, че съгласно член 11, параграф 6 от Директива 85/397/ЕИО, Съветът се задължава да регламентира подробни условия за провеждане на проверките, залегнали в член 11, параграф 2; като има предвид, че целта на тези проверки, които следва да се извършват от млекопреработвателните предприятия под контрола на официалните органи, които осъществяват периодични инспекции, е да осигури съответствие с разпоредбите на Директива 85/397/ЕИО, и по-специално изискванията на член 3, параграф А, точка 3 от нея,

като има предвид, че регламентирането на процедурите за контрол включва определянето на методи за тяхното прилагане,

като има предвид необходимостта от установяването на методи за определяне на общото съдържание на сухото вещество, маслеността, сухия безмаслен остатък, съдържанието на азот, протеини и плътността на топлинно обработеното мляко, предназначено за пряка консумация от човека,

като има предвид, че поради технически причини е необходимо първоначално да се определят референтни методи за анализ и

изследване, гарантиращи изпълнението на стандартите на член 3, параграф А, точка 3 от Директива 85/397/ЕИО; като има предвид, че е изключително важно да се проучат условията, при които се прилагат рутинните методи за анализ и изпитване; като има предвид, че в очакване на резултатите от проучването компетентните органи трябва да предприемат мерки, гарантиращи използването на съответните рутинни методи с оглед изпълнението на стандартите,

като има предвид, че определянето на горепосочените методи включва по-специално изработването на методики за анализ и критерии за надеждност на изследванията, с които да се създадат условия за еднаквата интерпретация на резултатите,

ПРИЕ НАСТОЯЩОТО РЕШЕНИЕ:

Член 1

Методите за анализ и изследване на топлинно обработеното мляко са, както следва:

- определяне общото съдържание на сухото вещество,
- определяне маслеността на млякото,
- определяне на общия сух безмаслен остатък,
- определяне съдържанието на азот,
- определяне съдържанието на протеини,
- определяне плътността на млякото.

⁽¹⁾ ОВ L 226, 24.8.1985 г., стр. 13. Директива, последно изменена с Директива 89/662/ЕИО (ОВ L 395, 30.12.1989 г., стр. 13).

Член 2

Прилагането на референтните методи за анализ и изследване, определянето на критериите за надеждност, както и вземането на проби се извършва съгласно установените в приложение I правила.

Член 3

Описание на определените в член 1 методи се съдържа в приложение II.

Член 4

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 14 ноември 1992 година.

За Съвета

Председател

J. GUMMER

ПРИЛОЖЕНИЕ I

I. ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Определят се общите разпоредби по отношение на реактивите, апаратурата, изчисляването на резултатите, точността на определяне и докладите от изследваните проби, които компетентните органи на държавите-членки и контролните лаборатории, отговорни за вземането на проби и изследването на млякото, се задължават да съблюдават.

2. РЕАКТИВИ

2.1. Вода

2.1.1. Освен ако не е предвидено друго, под вода за целите на разтвор, разреждане или промиване се разбира дестилирана, дейонизирана или деминерализирана вода с равностойна чистота.

2.1.2. Под „разтвор“ или „разреждане“, за които няма допълнителни указания, се разбира „разтвор във вода“ или „разреждане с вода“.

2.2. Химикали

Освен ако не е предвидено друго, използваните химикали трябва да бъдат чисти за анализ субстанции.

3. АПАРАТУРА

3.1. Списък на апаратурата

Апаратурата, описана за прилагането на отделните референтни методи, трябва да се състои единствено от части, предназначени за специализирана употреба, и части, които са обект на конкретна спецификация.

3.2. Аналитични везни

Под „аналитични везни“ се разбират везни със стойност на едно деление от скалата 0,1 mg.

4. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

4.1. Резултати

Освен ако не е предвидено друго, обявените в доклада от изследването (точка 6) резултати се изчисляват като средната аритметична стойност, получена от две паралелни изследвания, които отговарят на критерия за повторемост (точка 5.1.1.), определен за съответния метод. В случай че критерият за повторемост не е изпълнен, изследването се повтаря. Ако повторението е невъзможно, резултатът от първия тест се обявява за невалиден.

4.2. Изчисляване на процентното съдържание

Освен ако не е предвидено друго, резултатите от изследванията се изчисляват като процент от масата на пробата.

5. КРИТЕРИИ ЗА ТОЧНОСТ НА ОПРЕДЕЛЯНЕТО: ПОВТОРЯЕМОСТ И ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

5.1. Критериите за точност на определянето за всеки отделен метод са, както следва:

5.1.1. *Повторяемост (r)*: стойността, под която се отчита абсолютната разлика между резултатите от две отделни изследвания, получени чрез прилагането на една и съща процедура върху идентичен тест-материал при еднакви условия на провеждане (лице, което провежда изследването, апаратура, лаборатория и през кратък интервал от време).

5.1.2. *Възпроизводимост (R)*: стойността, под която се отчита абсолютната разлика между резултатите от две отделни изследвания, получени при прилагането на една и съща процедура върху идентичен тест-материал, но в различни условия (различни лица, провеждащи изпитването, апаратура, лаборатории и/или време на провеждане).

5.1.3. Освен ако не е предвидено друго за всеки отделен метод, стойностите за изпълнение на критериите за повторемост и възпроизводимост за всяка процедура трябва да са в доверителните граници на 95 %, определени в стандарт ISO 5725 (второ издание, 1986 г.).

5.1.4. Задължителните съвместни опити и проучвания се планират и провеждат в съответствие с международно признатите нормативи на работа.

6. ДОКЛАД ОТ ИЗСЛЕДВАНЕТО

В доклада се отбелязва използваният метод на анализ и получените от изследването резултати, като допълнително се записва подробна информация за приложената неспецифична и незадължителна за метода на анализа процедура, както и всички останали обстоятелства, които биха могли за повлияят на получените резултати. Докладът трябва да съдържа всички необходими данни за пълната идентификация на пробата.

II. ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ ОТ ТОПЛИННО ОБРАБОТЕНО МЛЯКО

1. ПРЕДМЕТ И ПОЛЕ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Настоящата процедура определя референтния метод за вземане на проби от топлинно обработено мляко, тяхното транспортиране и съхранение.

2. ОБЩИ ПРАВИЛА ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

Вземането на проби от топлинно обработено мляко от цистерни и др. се извършва от квалифициран персонал, преминал през необходимото за целта предварително обучение.

По преценка на компетентните органи или контролните лаборатории персоналят, отговарящ за вземането на проби, може да бъде обучен на специални техники и начини за вземане на пробите, гарантиращи представителността и съответствието на пробата с цялата партида мляко.

По преценка на компетентните органи или контролните лаборатории, персоналят, взимаш проби, може да бъде обучен на начините за маркиране на изследвания материал, осигуряващи нееднозначното обозначение и идентифициране на пробите.

3. ОБОРУДВАНЕ, ПРЕДНАЗНАЧЕНО ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

3.1. Общи изисквания

Оборудването, предназначено за вземане на проби, трябва да бъде от неръждаема стомана или друг подходящ материал с необходимата якост, конструирано за съответната цел (разбъркване, вземане на проби и т.н.). Буталата (сондите) и бъркалките, използвани за разбъркване на течности, съдържащи се в контейнери, трябва да имат достатъчна площ, осигуряваща правилното разбъркване на продукта без да дават отражение на вкуса (гранисалост). Лъжиците трябва да имат достатъчно дълга и здрава дръжка, която да позволява вземането на млечна проба на всяка дълбочина на контейнера. Вместимостта на лъжицата трябва да бъде не по-малко от 50 ml.

Контейнерите, в които се поставят пробите, и запушалките трябва да бъдат от стъкло или подходящ метал и пластмаса.

Материалът, от който е направено оборудването за вземане на проби (включително и контейнерите и запушалките), не трябва да предизвиква промени в пробата, които биха могли да повлияят на резултатите от изследването. Всички повърхности на използваните приспособления и апаратура за вземане на проби трябва да бъдат чисти и сухи, гладки без пукнатини и със заоблени ръбове.

4. СПОСОБИ И ТЕХНИКИ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

4.1. Общи изисквания

Независимо от характера на изследванията, които ще се провеждат, преди вземането на проба млякото трябва да бъде добре разбъркано чрез ръчни или механични средства.

Пробата се взима непосредствено след разбъркването на млякото, преди течността да е достигнала състояние на покой.

Обемът на пробата трябва да съответства на изискванията на изследването. Контейнерите, в които се поставят пробите, трябва да имат вместимост, която да позволява те да бъдат почти напълно напълнени с пробите, осигуряваща добро смесване на съдържанието преди тестването, но препятстваща отделянето на мазнини при транспортиране.

4.2. Ръчно вземане на проби

4.2.1. Вземане на проби от партида мляко в различни контейнери

В случай че млякото, от което ще се взима проба, е поставено в повече от един контейнер, от всеки контейнер се взима представително количество, като се отчита неговото качество. Части от представителните количества се смесват пропорционално на количеството мляко, съдържащо се в контейнера, от който е взета пробата, освен ако млечните проби от всеки контейнер не се изследват поотделно. Една или повече проби от съответните пропорционални количества мляко в контейнерите се взимат след разбъркване.

4.2.2. Вземане на проби от големи съдове – цистерни, предназначени за съхранение и железопътен и автомобилен транспорт на млякото

4.2.2.1. Преди вземане на пробите млякото се разбърква, като се прилага съответната за целта процедура.

За смесване на съдържанието в големи съдове, предназначени за съхранение, железопътен или автомобилен транспорт на млякото, се препоръчва механично разбъркване (точка 4.2.2.2).

Степента на разбъркване трябва да съответства на времето, в което млякото е било в покой. Ефективността на разбъркването за всеки отделен случай зависи от целите на предвидения анализ; критерият за ефективност на процедурата по разбъркване на млякото влияе на сходността на резултатите от изследването на проби, взети от различни части на пратката, или от отвора на танка през различни интервали на изпразване на съда. Разбъркването на млякото (необработено или пълноценно) е резултатно и ефективно, ако разликата в масленото съдържание на две проби, взети при тези условия, е по-малка от 0,1 %.

В големите съдове с долно изпускане е възможно събирането на малко количество мляко при отвор, което не е представително за цялото съдържание на съда дори и след разбъркване. Затова се препоръчва вземането на проби да става посредством ревизионен отвор (люк). За да се осигури представителността на пробата за цялото количество при вземане на проби от отвора за източване, се изпуска достатъчно количество мляко.

4.2.2.2. Разбъркването в големи съдове, предназначени за съхранение и железопътен или автомобилен превоз на млякото, се осъществява чрез:

- механична бъркалка, вградена в танка и задвижвана от електромотор;
- перка или бъркалка, потопена в млякото, задвижвана от електромотор и монтирана на ревизионния отвор;
- в цистерни за железопътен и автомобилен превоз на млякото – чрез рецикулация на млякото през ръкава (маркуча) за прехвърляне на течността, прикрепен към източващото помпено устройство на цистерната, въведен през ревизионния отвор;
- чрез чист филтриран въздух под налягане, като в случая се използват минимално въздушно налягане и обем, за да се избегне създаването на неприятен, грабясал мирис.

4.3. **Вземане на проби от топлинно обработено мляко, предназначено за пряка консумация от човека, в разфасовки на дребно**

Пробите от топлинно обработено мляко в разфасовки на дребно, предназначено за пряка консумация от човека, не се взимат в отделни съдове, а се представят в цели фабрични опаковки. При възможност пробите трябва да се взимат директно от опаковъчната машина или охладителна зала на предприятието непосредствено след преработката, а за пастеризираното мляко в деня на преработката.

Пробите от всеки отделен вид топлинно обработено мляко (пастеризирано, произведено по УНТ технология или стерилизирано) се взимат в брой, съответстващ на броя на предстоящите изследвания, съгласно указанията на контролната лаборатория или друг компетентен орган.

5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ПРОБАТА

Пробата се маркира с идентификационен код, който при използване указанията на контролната лаборатория или друг компетентен орган, позволява тя да бъде лесно и бързо идентифицирана.

6. КОНСЕРВИРАНЕ, ТРАНСПОРТИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

В съответствие с изискванията на националните компетентни органи контролната лаборатория изготвя инструкции относно условията за консервиране (химическо, термично), транспортиране, съхранение и допустимото време между вземането на пробата и анализа на млякото в зависимост от вида мляко и методиката на последващия анализ.

Инструкциите трябва да включват следните изисквания:

- предпазни мерки по време на транспорта и съхранението с цел пробите да не се излагат на пряка слънчева светлина и вредни миризми. Ако контейнерът, в който е поставена пробата, е направен от прозрачна материя, той трябва да се съхранява на тъмно.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

I. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУХОТО ВЕЩЕСТВО (ОБЩ СУХ ОСТАТЪК)

1. ПРЕДМЕТ И ПОЛЕ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне на сухото вещество.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сухо вещество: масата на сухия остатък, получен след изсушаване, и изразен в проценти от масата.

3. ПРИНЦИП

Изпаряване на водата от тест-порцията (Част от пробата за изпитване) в сушилня при температура 102 ± 2 °C.

4. АПАРАТУРА И ЛАБОРАТОРНА СЪГЛАДИЯ

Стандартно лабораторно оборудване, и по-специално:

4.1. Аналитични везни

4.2. Ексикатор със съответния сикатив (например прясно стрит силикагел с хигрометричен индикатор)

4.3. Сушилня с отдушник и терморегулатор за поддържане на температура 102 ± 2 °C в цялото работно пространство

4.4. Плоскодънни съдове — тегловни стъкла с височина от 20 до 25 mm и диаметър 50—75 mm, направени от подходящ материал, с добре прилепващи и лесно отстраними капачки.

4.5. Кипяща водна баня

4.6. Хомогенизатор

5. ПОДГОТОВКА НА ПРОБАТА

Пробата се загрява до температура 20—25 °C, като се разбърква добре за постигане на хомогенно разпределение на мазнините в нея и се избягва енергичното разбъркване, за да не се отделят мазнини и образува пяна. Ако полепналият слой сметана се диспергира трудно, пробата се загрява бавно до температура 25—40 °C. Полепналата по стените на контейнера сметана се смесва с останалото съдържание чрез внимателно разбъркване. Пробата се охлажда бързо до температура 20—25 °C.

По желание диспергирането на мазнините може да се улесни с хомогенизатор.

Не могат да се очакват верни резултати, ако пробата съдържа отделила се втечнена мазнина или се наблюдават бели, неправилно оформени частици, полепнали по стените на контейнера.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. Подготовка на тегловното стъкло

Тегловното стъкло (точка 4.4) и капачката му, поставена до него в сушилната (точка 4.3), се сушат при температура 102 ± 2 °C за не по-малко от 30 min. Затваря се с капачката, поставя се незабавно в ексикатор (точка 4.2), охлажда се до стайна температура (най-малко в продължение на 30 min) и се претегля с точност до 0,1 mg.

6.2. Тест-порция

Три до пет грама от подготвената проба (точка 5) се отмерват веднага с точност до 0,1 mg и се поставят в тегловното стъкло (точка 6.1).

6.3. Определяне

6.3.1. Тегловното стъкло се изсушава предварително за 30 min чрез нагряване на кипяща водна баня (точка 4.5).

- 6.3.2. Тегловното стъкло и капачката му се нагреват заедно в сушилния (точка 4.3) при температура $102 \pm 2^\circ\text{C}$ в продължение на два часа, след което стъклото се затваря с капачката и се отстранява от сушилния.
- 6.3.3. Съдът се temperира в ексикатора (точка 4.2) до стайна температура (за не по-малко от 30 min) и претегля с точност до 0,1 mg.
- 6.3.4. Тегловното стъкло с капачката до него се нагрева отново в сушилния. Затваря се с капачката и се изважда от сушилния, като се оставя да се охлади в ексикатора за приблизително 30 min, след което се претегля с точност до 0,1 mg.
- 6.3.5. Операциите, описани в точка 6.3.4, се повтарят докато разликата между две последователни измервания е не по-голяма от 0,5 mg. Записва се стойността на по-малкото претегляне.

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7.1. Начин на изчисляване и формули

Общото сухо вещество се определя като проценти от масата по следната формула:

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

където

W_T = общото съдържание на сухо вещество (общ сух остатък) в грамове на 100 g продукт;

m_0 = масата в грамове на тегловното стъкло и капачката (точка 6.1);

m_1 = масата в грамове на тегловното стъкло, капачката и тест-порцията (точка 6.2);

m_2 = масата в грамове на тегловното стъкло, капачката и тест-порцията след сушене (точка 6.3.5).

Получената стойност се закръглява с точност до 0,01 % (проценти от масата).

7.2. Точност на измерването

7.2.1. *Повторяемост (r)*: 0,10 g общ сух остатък на 100 g продукт.

7.2.2. *Възпроизводителност (R)*: 0,20 g общ сух остатък на 100 g продукт.

II. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАСЛЕНОТО СЪДЪРЖАНИЕ НА МЛЯКОТО

1. ПРЕДМЕТ И ПОЛЕ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне масленото съдържание на суровото, пълномасленото, частично обезмасленото и обезмасленото мляко.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Масленост на млякото: цялото вещество, получено по определения метод, изразено в проценти от масата.

3. ПРИНЦИП

Амонячно-алкохолен (етанол) разтвор в количество за тест-порция се екстрахира посредством диетилов и петролев етер. Разтворителите се дестилират или изпаряват и се определя масата на екстрахираното вещество, разтворимо в петролев етер. (Процедурата е известна като метода на Розе-Готтлиб.)

4. РЕАКТИВИ

Използват се ч.з.а. реактиви, чиято утайка не трябва да бъде по-голяма от допустимата при определяне на празната проба.

Качеството на реактивите се определя съгласно точка 6.3. За тегловния анализ се използва тарирана колба, Бехерова чаша или метално блюдо (точка 5.8), приготвени съгласно точки 6.4 (за нанасяне на корекции в тегловния резултат вследствие промени в атмосферните условия). Ако утайката, коригирана в съответствие с настъпила промяна в установената маса на тариания съд, е по-голяма от 2,5 mg, утайката или разтворителите се определят поотделно чрез изпаряване съответно на 100 ml диетилов етер (точка 4.4) и 100 ml петролев етер (точка 4.5). За претеглянето също така се използва и тариран съд. Когато утайката е по-голяма от 2,5 mg, разтворителите се промива посредством дестилация или се заменя с друг.

- 4.1. **Амонячен разтвор**, съдържащ приблизително 25 % (m/m) NH_3 . Допуска се използването на амонячен разтвор и с по-голяма концентрация (точки 6.5.1 и A.1.5.1).

- 4.2. **Етилов алкохол**, най-малко 94 % (v/v). Може да се използва и етилов алкохол, денатуриран с метилов алкохол, ако е доказано, че не влияе върху резултатите от определянето.
- 4.3. **Разтвор на Конго червено или крезолово червено**
Един грам Конго червено или крезолово червено се разтваря във вода и се разрежда до 100 ml.
Забележка: Използването на този разтвор, който позволява да се открие по-ясно междинната повърхност между водния слой и разтворителя, не е задължително (точка 6.5.2). Допуска се употребата и на други водни индикаторни разтвори, ако те не влияят на резултатите от определянето.
- 4.4. **Диетилов етер**, свободен от перокиси, съдържащ не повече от 2 mg/kg антиоксиданти, отговарящ на изискванията за празната проба (точка 6.3).
- 4.5. **Петролев етер** с температурен интервал на кипене между 30 и 60 °C.
- 4.6. **Смесен разтворител**, приготвен непосредствено преди употреба от равни обеми диетилов етер (точка 4.4) и петролев етер (точка 4.5).
5. **АПАРАТУРА И ЛАБОРАТОРНА СЪКЛАДИЯ**
Предупреждение: При определянето се използват летливи и лесно възпламеними разтворители. Работата с електрическата апаратура трябва да става в съответствие с нормативните изисквания за употребата на подобни разтворители
Стандартно лабораторно оборудване, и по-специално:
- 5.1. **Аналитични везни**
- 5.2. **Центрофуга** за центрофугиране на екстракционните апарати (колби или епруветки за екстракция на мазнините) (точка 5.6) със скорост на въртене 500 до 600 оборота/min, създаваща гравитационно поле от 80 до 90 g при външния край на колбите или епруветките.
Забележка: Използването на центрофугата не е задължително (точка 6.5.5).
- 5.3. **Апарат за дестилация или изпаряване**, позволяващ дестилацията на разтворителите и етиловия алкохол от колбите или изпаряването им от Бехеровите чаши или блюдата (точки 6.5.12 и 6.5.15) при температура, не по-висока от 100 °C.
- 5.4. **Електрическа сушилня** с отворени вентилационни клапи и терморегулатор за поддържане на температура от 102 ± 2 °C в цялото работно пространство, снабдена с термометър.
- 5.5. **Водна баня** с регулатор на температурата от 35 до 40 °C.
- 5.6. **Колби за екстракция на мазнини тип Mojonnier.**
Забележка: Възможно е използването на апарат за екстракция, снабден със сифон или промивно устройство, но това предполага различна процедура, чието описание е дадено в допълнението към настоящото приложение.
Колбите за екстракция (или епруветките) са снабдени с шлифовани, стъклени или други запушалки, които не се влияят от използваните реактиви. Корковите тапи, които трябва да са от качествен материал, се обработват основно с диетилов етер (точка 4.4), след което се поставят за не по-малко от 15 min във вода с температура 60 °C или повече. Охлаждат се във вода до пълното им напояване преди използване.
- 5.7. **Решетка-статив** с гнезда за колбите (епруветките) за екстракция (точка 5.6).
- 5.8. **Промивно устройство**, подходящо за използване със смесени разтворители (точка 4.6), което не може да бъде направено от пластмасов материал.
- 5.9. **Съдове за събиране на мазнините** — например колби за кипене (плоскодънни) или ерленмайрови с вместимост 125—250 ml или метални блюда. Ако бъдат използвани, за предпочитане е металните блюда да бъдат от неръждаема стомана, плоскодънни, с наструйник/мундшук, с диаметър 80 до 100 mm и приблизителна височина 50 mm.
- 5.10. **Средства за улесняване на кипене**, които не съдържат мазнини, от непорьозен порцелан, например гранули от силиконов карбид или стъклени перли (незадължителни, в случай че се използват метални блюда).
- 5.11. **Мерителни цилиндри** с вместимост 5 и 25 ml.
- 5.12. **Градуирани (МОР) пипети** с вместимост 10 ml.
- 5.13. **Метални щипци**, подходящи за придържане на колби, Бехерови чаши и блюда.

6. ПРОЦЕДУРА

Забележка: Описание на алтернативната процедура, използваща апарат за екстракция, снабден със сифон или промивно устройство (виж забележка към точка 5.6), е дадено в допълнението към настоящото приложение.

6.1. Подготовка на пробата

Лабораторната проба се temperира в продължение на 15 min на 35—40 °C, при необходимост посредством водна баня (точка 5.5). Съдържанието ѝ се разбърква добре до получаването на хомогенна маса чрез неколккратно обръщане на съда, като се внимава да не образува пяна или да се отдели мазнината. Охлажда се бързо до температура от около 20 °C.

6.2. Тест-порция

Пробата (точка 6.1) се разбърква чрез внимателно обръщане на съда три до четири пъти, след което в екстракционните колби (точка 5.6) бързо се претеглят пряко или диференцирано с точност до 1 mg 10 до 11 g от съдържанието на пробата.

В долната част на колбата за екстракция се пренася възможно най-голяма част от тест-порцията.

6.3. Празна проба

Паралелно с определяне съдържанието на мазнината в пробата се прави празна проба, като се използва същата процедура и същите реактиви, но тест-порцията се заменя с 10—11 ml вода.

Допустимото отклонение на обявената маса на съда за събиране на мазнината, коригирана с промяната в масата на контролния съд, не може да надвишава 2,5 mg.

6.4. Подготовка на съда за събиране на мазнината

Съдът (точка 5.9) се поставя в сушилни (точка 5.4) за 1 час. Прибавят се средства (точка 5.10), които улесняват равномерното кипене по време на последващото изпаряване на разтворителя. Съдът се охлажда (защитен от прах, но не в ексикатор) до температурата на тегловната стая (за стъклените съдове — най-малко 1 час; за металните блюда — най-малко 30 min.), след което, за да се избегнат температурните разлики, с помощта на щипци се поставя на везната и се претегля с точност до 0,1 mg.

6.5. Определяне

6.5.1. Прибавя се 2 ml амонячен разтвор (точка 4.1) или еквивалентен обем от амонячен разтвор с по-голяма концентрация и се смесва добре с тест-порцията в долната част на колбата. Определянето се извършва веднага след приключване на смесването.

6.5.2. Прибавя се 10 ml етанол (точка 4.2) и течностите се разбъркват внимателно и напълно, позволявайки съдържанието на колбата да протича между горната и долна тумбеста част на съда, като се внимава течността да не се опира о гърлото на колбата. По желание могат да се прибавят и две капки разтвор на Конго червено или крезолово червено (точка 4.3.).

6.5.3. Прибавя се 25 ml диетилов етер (точка 4.4). Колбата се затваря с напоена с вода коркова запушалка или друга намокрена с вода запушалка (точка 5.6), след което в продължение на 1 min се разклаща енергично, но не прекомерно, за да не се образуват устойчиви емулсии, като съдът се държи в хоризонтално положение, а долната му част сочи нагоре. Течността се разклаща периодично, за да може да се стече от горната в долната част. При необходимост колбата се охлажда на течаша вода. Запушалката, коркова или друга, се отстранява внимателно и едновременно с гърлото на съда се промива с малка част от смесения разтворител (точка 4.6) с помощта на промивното устройство (точка 5.8), така че разтворителят да се стече обратно в колбата.

6.5.4. Прибавя се 25 ml петролев етер (точка 4.5). Колбата се затваря с повторно намокрената коркова или друга запушалка (намокрянето се извършва чрез потапяне във вода) и се разклаща внимателно в продължение на 30 sec, както е описано в точка 6.5.3.

6.5.5. Затворената колба се центрофугира в продължение на 1 до 5 min при скорост на въртене 500—600 обор./min⁻¹ (точка 5.2). В отсъствието на центрофуга (виж забележка към точка 5.2) колбата се оставя в покой на решетката-статив (точка 5.7) за не по-малко от 30 min до избистрянето и пълното отделяне на супернатанта от водния слой. При необходимост съдът се охлажда на течаша вода.

6.5.6. Корковата или друга запушалка се отстранява внимателно и едновременно с вътрешната част на гърлото на колбата се промиват с малко от смесения разтворител (точка 4.6) така че течността да се стече обратно в съда.

Ако граничещата между двата пласта повърхност е под долната част на гърлото на колбата, по стената на съда се долива внимателно вода, за да се повдигне нивото на повърхността и така да се улесни декантирането на разтворителя.

6.5.7. В подготвената тънкостенна колба, предназначена за събиране на мазнината (точка 6.4), внимателно се прехвърля възможно най-голямо количество от супернатанта чрез декантиране, като колбата за екстракция се придържа в долната ѝ част и се избягва декантирането на каквато и да било част от водния слой. В колбата има поставени средства за улесняване на кипенето (точка 5.10), които не са задължителни, ако съдът е метално блюдо.

6.5.8. Външната част на гърлото на екстракционната колба се промива с малко смесен разтворител (точка 4.6), като течността се събира в колбата за събиране на мазнината и се внимава смесеният разтворител да не се разлее по външността на колбата за екстракция.

По желание, разтворителят или част от него се дестилира или изпарява от съда, както е описано в точка 6.5.12.

- 6.5.9. Към съдържанието на колбата за екстракция се прибавя 5 ml етанол (точка 4.2), с който се промива вътрешната част от гърлото на съда. Течността се разбърква по описания в точка 6.5.2 начин.
- 6.5.10. Извършва се повторна екстракция, като се повтарят операциите на точки 6.5.3 до 6.5.8 включително, но се използват само 15 ml диетилов етер (точка 4.4) и 15 ml петролев етер (точка 4.5). Диетиловият етер се използва за промиване вътрешната част от гърлото на екстракционната колба. При необходимост нивото на граничната между двата пласта повърхност може да се повдигне до средата на съда и така да се улесни окончателното декантиране на разтворителя във възможно най-голямо количество.
- 6.5.11. Извършва се трета екстракция, като отново се повтарят операциите на точки 6.5.3 до 6.5.8 включително, но се използват само 15 ml диетилов етер (точка 4.4) и 15 ml петролев етер (точка 4.5). Диетиловият етер се използва за промиване вътрешната част от гърлото на екстракционната колба. При необходимост нивото на граничната между двата пласта повърхност може да се повдигне до средата на съда, за да се улесни окончателното декантиране на разтворителя във възможно най-голямо количество.
- За обезмасленото мляко третата екстракция може да не се провежда.
- 6.5.12. Възможно най-голямо количество от разтворителите (включително и етанолът) се отстранява от колбата чрез дестилация, а в случай че се използва Бехерова чаша или блюдо — чрез изпаряване (точка 5.3), като преди началото на дестилацията вътрешната част от гърлото на колбата се промива с малко смесен разтворител (точка 4.6).
- 6.5.13. Колбата за събиране на мазнината (поставена на едната си страна за отвеждане парите на разтворителя) се поставя в сушилни (точка 5.4) за 1 час, след което се изважда, охлажда (защитена от прах, но не в ексикатор) до температурата на тегловната стая (за стъклени съдове — най-малко 1 h, а за металните блюда — не по-малко от 30 min) и претегля с точност до 0,1 mg.
- Непосредствено преди претеглянето съдът не се подсушава с кърпа. Той се поставя на везната с помощта на щипци, като се избягват най-вече температурните разлики.
- 6.5.14. Операциите от точка 6.5.13 се повтарят докато масата на колбата за събиране на мазнината намалее с 0,5 mg или по-малко, или се увеличи между две последователни измервания. Отчита се минималната маса като маса на съда за събиране на мазнината и маса на екстрахирания материал.
- 6.5.15. Към колбата за събиране на мазнината се прибавя 25 ml петролев етер, за да се установи дали екстрахираният материал е напълно разтворим. Затопля се умерено и разтворителят се разклаща чрез завъртане на колбата до пълното разтваряне на цялото количество мазнина.
- Когато екстрахираният материал е напълно разтворим в петролев етер, количеството мазнина се определя като разликата между крайната маса на колбата с екстрахираното вещество (точка 6.5.14) и първоначалната ѝ маса (точка 6.4.).
- 6.5.16. Когато екстрахираният материал не е напълно разтворим в петролев етер и при възникнали съмнения, мазнината се екстрахира напълно от колбата чрез неколккратно промиване с топъл петролев етер.
- Неразтворимият материал се оставя да се утаи. Петролевият етер се декантира внимателно, без да се премахва каквато и да било част от неразтворимия материал. Операцията се извършва трикратно, като петролевият етер се използва за промиване на вътрешната част от гърлото на съда.
- Накрая външната страна на гърлото на колбата се промива със смесения разтворител, като се внимава той да не се разлее по външността на съда. Съдът се нагрява в сушилни за 1 час, за да се отстранят парите на петролевия етер, след което се охлажда и претегля съгласно точки 6.5.13 и 6.5.14.
- Количеството на мазнината се определя като разлика между претегленото количество по точка 6.5.14. и последното претегляне.

7. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7.1. Изчисление и формули

Масленото съдържание се изчислява като процент от масата по следната формула:

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

където

F = + масленото съдържание;

m_0 = масата на тест-порцията (точка 6.2) в грамове;

m_1 = масата в грамове на колбата, съдържаща мазнината, и претегления съгласно точка 6.5.14 екстрахиран материал;

m_2 = масата в грамове на подготвената колба за събиране на мазнината или в случай на неразтворим материал—масата на колбата, съдържаща мазнините и претегления по точка 6.5.16 неразтворим утаечен материал;

m_3 = масата в грамове на колбата за събиране на мазнина, използвана в празната проба (точка 6.3) и претегления по точка 6.5.14 екстрахираните вещества;

m_4 = масата в грамове на подготвената колба за събиране на мазнините (точка 6.4), използвана в празната проба (точка 6.3), или в случай на неразтворим материал — масата на колбата за събиране на мазнините и претегления по точка 6.5.16 неразтворим утаечен материал.

Резултатът се отчита с точност до 0,01 %.

7.2. Точност на измерването**7.2.1. Повторяемост (r):**

- за пълномасленото и частично обезмасленото мляко: 0,02 g мазнина на 100 g продукт;
- за обезмасленото мляко: 0,01 g мазнина на 100 g продукт.

7.2.2. Възпроизводителност (R):

- за пълномасленото мляко: 0,04 g мазнина на 100 g продукт;
- за частично обезмасленото мляко: 0,03 g мазнини на 100 g продукт;
- за обезмасленото мляко: 0,025 g мазнини на 100 g продукт.

III. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУХИЯ БЕЗМАСЛЕН ОСТАТЪК**1. ПРЕДМЕТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ**

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне на съдържанието на сухия безмаслен остатък в топлинно обработеното мляко.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИЗЧИСЛЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Сухият безмаслен остатък се определя като процент от масата.

Сухият безмаслен остатък се получава, като:

от общото сухо вещество (виж раздел I) се извади масленото съдържание (виж раздел II).

IV. ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА АЗОТ**1. ПРЕДМЕТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ**

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне съдържанието на азот в суровото, пълномасленото, частично обезмасленото и обезмасленото мляко.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Общо съдържание на азот в млякото: съдържанието на азот, изразено в процент от масата, получено по метода на Келдал.

3. ПРИНЦИП

Определено количество от пробата се обработва (изгаря) с концентрирана сярна киселина в присъствието на катализатор — калиев и меден (II) сулфат, при което азотът на органичните съставки се превръща в амониев сулфат. Амоният се освобождава чрез прибавяне на разтвор на натриева основа, дестилира се, абсорбира се в разтвор на борна киселина и се титрува с разтвор на киселина.

4. РЕАКТИВИ**4.1. Калиев сулфат (K_2SO_4).****4.2. Разтвор на меден сулфат.** Разтваря се 5,0 g меден сулфат ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и се разрежда с вода до 100 ml в мерителна колба при температура 20 °C.**4.3. Сярна киселина** с концентрация не по-малко от 98,0 % (m/m) H_2SO_4 .**4.4. Разтвор на натриева основа,** 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (20 °C).

Забележка: Допуска се използването на натриева основа и с по-малка концентрация. Например 40 % (m/m) 572 g/l, 20 °C; или 30 % (m/m) 399 g/l, 20 °C.

4.5. Разтвор на борна киселина. Приготвя се, като 40 g киселина (H_3BO_3) се разтвори в един литър гореща вода, охлажда се и се съхранява в шише от боросиликатно стъкло.**4.6. Индикаторен разтвор.** 0,01 g метилрот, 0,02 g бромотимол блау и 0,06 g бромокрезол грюн се разтварят с 100 ml етанол. Съхранява се в кафяво шише на хладно и тъмно място.**4.7. Волуметричен разтвор**

Концентрация ($1/2 H_2SO_4$) или (HCl) = 0,1 mol/l, стандартизирана с точност до 0,0001 mol/l.

- 4.8. **Свободна от азот захароза.**
- 4.9. **Амониева сол**, чиста, под формата на амониев оксалат $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, H_2O или амониев сулфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 4.10. **Триптофан** ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), **фенацетин** ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{CH}_2\text{CONH}_2$) или **лизин моно- или дихидрохлорид** ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ или $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$).
- Забележка: Реактивите по точки 4.9. и 4.10 трябва да бъдат с по-висока аналитична чистота. При наличност да се използва сертифициран разтвор на амониева сол (точка 4.9).
5. **АПАРАТУРА И ЛАБОРАТОРНА СЪГЛАДИЯ**
- Стандартно лабораторно оборудване и по-специално:
- 5.1. **Колби Kjeldahl** с вместимост 500 ml.
- 5.2. **Средства, улесняващи кипенето** — например стъклени перли с диаметър приблизително 5 mm, гранули — Hengar, пемза.
- 5.3. **Бюрета или автоматична пипета** с деление 1,0 ml.
- 5.4. **Градуирани мерителни цилиндри** от стъкло с вместимост 50, 100 и 250 ml.
- 5.5. **Дигестационен (изгарящ) апарат**, поставен в наклонено положение при ъгъл приблизително от 45 °C, с електрически нагреватели или газови горелки, които не нагреват колбите над нивото на съдържанието в тях, със система за отвеждане на дима.
- 5.6. **Дестилационен апарат** от боросиликатно стъкло, снабден с келдалова колба (точка 5.1), съдържаща предпазна глава, свързана с действащ хладник с права тръбичка и отвор в долния му край. Свързващите тръбички и крановете трябва да бъдат добре пасващи и за предпочитане от неопренов каучук.
- 5.7. **Пипета или автоматична пипета** с деление 0,10 ml.
- 5.8. **Конусни колби** с вместимост 500 ml, градуирани на 200 ml.
- 5.9. **Бюрета** с вместимост 50 ml, градуирана на 0,1 ml, и максимална грешка 0,05 ml.
- 5.10. **Увеличително стъкло** за отчитане на бюретата (точка 5.9).
- 5.11. **pH-метър.**
- 5.12. **Автоматична бюрета.**
6. **ПРОЦЕДУРА**
- 6.1. В келдалова колба (точка 5.1) се поставят средства за улесняване на кипенето (точка 5.2) (например три стъклени перли), 15 g калиев сулфат (точка 4.1), 1,0 ml разтвор на меден сулфат (точка 4.2), около 5 g от пробата (прететлена с точност до 0,001 g) и 25 ml сярна киселина (точка 4.3). Останалият по гърлото на колбата разтвор на меден сулфат, калиев сулфат или млякото се промиват с киселината, след което съдържанието се разбърква внимателно.
- Забележка: Тъй като по време на кипене органиката поема сярна киселина, вместо 25 ml за изгаряне се използва 30 ml H_2SO_4 (точка 4.3), ако млякото е с маслено съдържание, по-високо от 5,0 % (m/m). Тази операция се повтаря и с празната проба.
- 6.2. Всяка келдалова колба се нагрева върху апарата за изгаряне (точка 5.5.) в началото на умерена температура, така че черната пяна да не излезе от съда. След приключване на първоначалното пенене се образува изобилна бяла пара. Течността се оставя да кипи буйно (киселинните пари се кондензират по средата на дължината на гърлото на колбата) докато частиците изгорят напълно и съдържанието придобие бистър, бледозеленикав цвят, след което кипенето продължава на умерена температура за поне още 1,5 часа. Под внимание трябва да се вземат следните изисквания:
- времето за избистряне на съдържанието не може да бъде повече от 1 час, а общото време за изгаряне — не по-малко от 2,5 часа. Ако избистрянето отнеме повече от час, общото време за изгаряне съответно се увеличава.
 - Прибавеният калиев сулфат улеснява изгарянето, тъй като увеличава температурата на кипене на сместа. Ако в края на изгарянето остатъчният обем H_2SO_4 е по-малък от 15 ml, в хода на процеса е възможна известна загуба на азот вследствие на прекомерно нагреване. При нагреване с газ колбата се поставя върху изолационна мрежа с подходящ кръгъл отвор с диаметър, позволяващ свободният пламък да докосва само онази част от колбата, която се намира под повърхността на течното съдържание (точка 5.5).

- в) Ако по гърлото на колбата се отложат неизгорели черни частици, които киселинният кондензат не е могъл изцяло да промие обратно по време на първоначалното буйно кипене (за улеснение това може да стане чрез завъртане на колбата), съдът се охлажда до необходимата температура и се промива с минимално количество вода. Изгарянето продължава по гореописания начин.

- 6.3. След охлаждане във всяка от колбите Kjeldahl се прибавя по 300 ml вода (виж забележката), с която внимателно се промива гърлото на съдовете. Съдържанието се разбърква добре до пълното разтваряне на образувалите се кристали. Поставят се помощни средства (точка 5.2) за постигане на равномерно кипене, след което във всяка колба се прибавя 70 ml разтвор на натриева основа (виж забележка към точка 4.4), като внимателно се прелива по наклоненото гърло на съда, за да образува дънен слой. Горният край на отвора на съда не бива да се мокри в разтвора на основата.

Забележка: За получаването приблизително на 150 ml дестилат преди фазата на неравномерно кипене (бълбукане) (точка 6.4) е необходимо общото количество на сместа от вода и разтвор на натриева основа да се равнява на 370 ml. Следователно, ако се използва по-голям равностоеен обем на разтвор на натриева основа с по-малка от 47 % (m/m) концентрация, количеството вода трябва да бъде съответно намалено. Така например, ако се прибави 85 ml разтвор на натриева основа с концентрация 40 % (m/m) или 125 ml от субстанцията с концентрация 30 % (m/m), количеството прибавена вода трябва да се равнява съответно на 285 ml или 245 ml.

- 6.4. Всяка келдалова колба се включва бързо в дестилационен апарат (точка 5.6). Поставя се приемник (точка 5.8) с 50 ml разтвор на борна киселина (точка 4.5) и 0,20 ml (5—6 капки) индикатор така че краят на отвора на хладника да бъде потопен в разтвора. Всяка колба се разклаща, за да може съдържанието ѝ да се разбърква добре и достигне точката на кипене - първоначално на умерена температура, за да се избегне образуването на прекомерна пяна. Когато се събере 100—125 ml дестилат, всяка от конусните колби-приемници се накланя докато краят на отвора на хладника се установи приблизително на 40 mm над обемната марка от 200 ml. Дестилацията на всяка колба продължава до началото на неравномерното кипене (бълбукане), след което нагряването веднага се преустановява. Колбите Kjeldahl се изключват от апарата, краят на отвора на хладника се промива с вода, като течността се оставя да изтече в приемника. Под внимание трябва да бъдат взети следните изисквания:

- а) дестилационният процес трябва да се провежда по начин, при който събраният дестилат при началото на неравномерното кипене (бълбукане) е около 150 ml, а обемът на течността в приемниците е приблизително равен на 200 ml.
- б) всеки хладник трябва да има такъв коефициент на полезно действие, при който температурата на течността в приемниците да не надвишава 25 °C по време на дестилацията.

- 6.5. Всеки дестилат се титрува със стандартен волуметричен разтвор (точка 4.7) докато рН достигне $4,6 \pm 0,1$, като за целта се използва рН-метър и по желание автоматична бюрета. С помощта на индикатор може да се провери дали титруването протича правилно. Деленията на бюретата се отчитат с точност до 0.01 ml, като за целта се използва увеличително стъкло (точка 5.10) и се следи за грешки на паралакса.

Титруването може да се проведе и само с индикатор, като в този случай дестилатът се титрува докато придобие същия цвят като този на прясно приготвен разтвор от 150 ml вода, 50 ml борна киселина и 0,20 ml индикатор в приемника (точка 5.8).

- 6.6. Прави се празна проба съгласно изисквания на точки 6.1—6.5 включително, като вместо мляко се поставя 5 ml дестилирана вода и около 0,1 g захароза (точка 4.8).

Забележка: Титруването на празния дестилат се извършва с много малко количество на стандартния волуметричен разтвор (точка 4.7).

- 6.7. Точността на определянето се проверява периодично чрез два опита за възстановяване, като се прилага процедурата, предвидена в точки 6.1—6.5 включително.

- 6.7.1. По време на дестилацията се следи за загуба на азот вследствие прекомерно нагряване или механично изтичане, като за целта се използва тест-порция от 0,15 g амониев оксалат или сулфат (точка 4.9), претеглен с точност до 0,001 g, и 0,1 g захароза (точка 4.8).

Процентът на възстановения азот трябва да бъде между 99,0 и 100,0 %.

По-високите или по-ниските резултати са показателни за неправилно проведена методика и/или неточна концентрация на стандартния разтвор (точка 4.7).

- 6.7.2. Прави се проверка дали изгарянето е било достатъчно за освобождаване на целия протеинов азот, като за целта се използва тест-порция от 0,20 g чист триптофан, 0,35 g фенацетин или 0,20 g лизин-хидрохлорид (точка 4.10). Всички претегления се отчитат с точност до 0,001 g. Възстановеният азот трябва да бъде не по-малко от 98—99 %.

7. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Задължително е използването на лабораторна престилка, обезопасяващи очила и устойчиви на киселина ръкавици при работа с концентрирана сярна киселина, натриева основа и келдалови колби.

По време на дестилационния процес колбите Kjeldahl трябва да бъдат под непрекъснато наблюдение. За да се избегне потенциална опасност, дестилацията се прекратява незабавно щом съдържанието в съдовете „забълбука“ силно. При изключване на захранването за повече от две-три минути приемникът се сваля, за да може дестилационният накрайник да се извади от течността.

8. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

8.1. Изчисление и формули

Съдържанието на азот (W_N), изразено в грамове азот на 100 g продукт, се изчислява по формулата:

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

където:

N = съдържанието на азот;

V = обемът в милилитри на стандартния волуметричен разтвор киселина, използван при определянето;

V_0 = обемът в милилитри на стандартния волуметричен разтвор киселина, използван в празната проба;

c = концентрацията, изразена като молове на литър стандартен волуметричен разтвор киселина (точка 4.7);

m = масата в грамове на тест-порцията.

Полученият резултат се закръглява с точност до 0,001 g на 100 g.

8.2. Точност на определянето

8.2.1. *Повторяемост (r)*: 0,007 g в 100 g.

8.2.2. *Възпроизводителност (R)*: 0,015 g в 100 g.

9. РАЗНОВИДНОСТ НА ПРОЦЕДУРИТЕ

9.1. Вместо описаните в точки 5.5 и 5.1 апарат за изгаряне и келдалови колби се използва блоков апарат за изгаряне, снабден с цилиндрични колби. В този случай всяко гнездо се проверява поотделно с цел да се избегне възникването на потенциална опасност (точка 6.7).

9.2. Прякото нагряване на колбите (точка 6.4) се заменя с парна дестилация. Ако апаратът не позволява използването на дестилирана вода, водата в пробата се проверява за отсъствието на киселина или летливи алкали.

9.3. Вместо предвидените в точка 6.1, 5 g за тест-порцията може да се използва и 1 g мляко (полу-макро Kjeldahl), ако:

— количествата реактиви, използвани за минерализация (точка 6.1): H_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, K_2SO_4 бъдат намалени в същото съотношение (1/5);

— общото време за изгаряне (точка 6.2) се намали до 75 min;

— количеството разтвор на натриева основа (точка 6.3) се редуцира до същото съотношение (1/5);

— се използва стандартен разтвор на киселина (точка 4.7) с по-ниска концентрация (0,02 до 0,03 mol/l).

Забележка: Използването на една или повече от описаните разновидности на стандартната процедура е допустимо, само ако стойността на повторяемост (точка 8.2.1) и резултатите от две изследвания за точност на измерването (точка 6.7) съответстват на изискванията на настоящия метод.

V. ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ПРОТЕИНИ

1. ПРЕДМЕТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне съдържанието на протеини в топлинно обработеното мляко (член 3, параграф А, точка 3 от Директива 85/397/ЕИО).

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържание на протеини: стойността на общото азотно съдържание, изразено като проценти от масата, определено съгласно метода, предвиден в раздел IV (точка 3), умножена с подходящ фактор (3).

3. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Съдържанието на протеини в млякото, изразено като проценти от масата, е равно на 6,38, умножено с общото съдържание на азот в млякото в проценти.

VI. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПЛЪТНОСТТА**1. ПРЕДМЕТ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ**

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне плътността на суровото, пълномасленото, частично обезмасленото и обезмасленото мляко при температура 20 °C.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Плътността на млякото се определя като съотношение между масата на определен обем мляко при температура 20 °C и масата на същия обем вода при същата температура.

3. ПРИНЦИП

Плътността при температура 20 °C се определя посредством аерометър (млекомер).

4. АПАРАТУРА И ЛАБОРАТОРНА СЪГЛАДИЯ

Стандартно лабораторно оборудване, и по-специално:

4.1. Аерометър

Аерометърът е гравиметричен инструмент, състоящ се от стъклен поплавок, който в долния си край е широк и тежък. В горния край на поплавка има коаксиално прикрепена цилиндрична стъклена пръчка. Горният край на пръчката е затворен.

Поплавъкът съдържа тежест от олово или живак за проверка масата на аерометъра. На пръчката има градуирана скала от 1,025 до 1,035 g/ml.

Аерометърът се проверява чрез пикнометричния метод, като за целта се използва пикнометър с вместимост от около 100 ml, към който има прикрепен термометър за прецизно измерване.

4.2. Цилиндри (стъклени или от неръждаема стомана)

Минимални размери на аерометъра:

- вътрешен диаметър около 35 mm;
- вътрешна височина приблизително 225 mm.

4.3. Водна баня с терморегулатор за поддържане на температура от $20 \pm 0,1$ °C.**4.4. Водна баня** с терморегулатор за поддържане на температура от 40 ± 2 °C.**4.5. Термометър** за прецизно отчитане, градуиран до 0,5 °C.**5. ПРОЦЕДУРА**

5.1. Преди да се постави във водната баня (точка 4.4) пробата се обръща, за да се диспергира мазнината в нея. Нагрива се до 40 °C постоянно в продължение на 5 min, след което се разбърква чрез внимателно обръщане на съда, за да се осигури хомогенното разпределение на мазнината. Охлажда се до 20 °C във втората водна баня (точка 4.3).

5.2. Пробата се разбърква добре чрез внимателно обръщане на съда, за да се избегне всмукването на въздух. Млякото се излива бавно по стените на цилиндър (точка 4.2), който се държи в наклонено положение, за да се избегне образуването на пяна или мехури. Използва се достатъчно количество проба, за да може част от млечното съдържание да прелее от цилиндъра при поставянето на аерометъра в него (точка 4.1). Аерометърът се поставя внимателно, като се оставя в свободно плаващо състояние до достигане на равновесна точка. Цилиндърът с млякото се изправя отвесно. Аерометърът се поставя по средата на течната колона, като не трябва да допира стените на цилиндъра.

5.3. След като аерометърът се успокои, се отчита делението по скалата при върха на мениска.

5.4. Веднага след отчитане стойностите на аерометъра в пробата се поставя термометър (точка 4.5) за отбелязване на температурата с точност до 0,5 °C. Температурните различия трябва да бъдат в интервала 2 °C — 20 °C.

6. КОРЕКЦИИ НА ТЕМПЕРАТУРАТА

6.1. Ако температурата на млякото е над или под 20 °C, за всеки температурен градус се прави корекция от 0,0002. Ако температурата е над 20 °C, корекцията се прибавя към първоначално отчетената плътност и обратно, при по-ниска от 20 °C температура, тя се изважда. Тази корекция е валидна, само ако температурата на пробата от млякото варира от установената температура на определяне на плътността от 20 °C с не повече от 5 °C.

7. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Плътността на пробата, изразена в g/ml обезмаслено мляко при температура 20 °C, се определя по формулата:

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

където:

mv = плътността на пробата, отчетена на аерометъра (точка 5.4) в g/l;

MG = масленото съдържание на пробата в g/l;

0,92 = плътността на мазнините.

8. ТОЧНОСТ НА ОПРЕДЕЛЯНЕТО

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

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

Допълнение

(към приложение II)

АЛТЕРНАТИВНА ПРОЦЕДУРА, ИЗПОЛЗВАЩА АПАРАТ ЗА ЕКСТРАКЦИЯ НА МАЗНИНИТЕ, СНАБДЕН СЪС СИФОН ИЛИ ПРОМИВНО УСТРОЙСТВО**A.1. ПРОЦЕДУРА****A.1.1. Подготовка на пробата**

Виж точка 6.1.

A.1.2. Тест-порция

Прилага се процедурата, определена в точка 6.2, но за целта се използва апарат, състоящ се от епруветки за екстракция на мазнините (точка 5.6).

На дъното на колбата за екстракция се прехвърля възможно най-голямо количество от тест-порцията.

A.1.3. Празна проба

Виж точка 6.3.

A.1.4. Подготовка на колбите за събиране на мазнините

Виж точка 6.4.

A.1.5. Определяне

A.1.5.1. Прибавя се 2 ml амонячен разтвор (точка 4.1) или еквивалентен обем на по-концентриран амонячен разтвор и се разбърква на дъното на епруветката със съдържанието на предварително обработената тест-порция. Определянето се извършва веднага след добавянето на амоняка.

A.1.5.2. Прибавя се 10 ml етанол (точка 4.2) и се разбърква добре на дъното на епруветката. По желание могат да се добавят и две капки разтвор на Конго червено или крезолово червено (точка 4.3).

A.1.5.3. Прибавя се 25 ml диетилов етер (точка 4.4). Епруветката се затваря с напоена с вода коркова запушалка или друга намокрена с вода запушалка (точка 5.6), след което в продължение на 1 min се разклаща енергично чрез периодично обръщане, но не прекомерно, за да не се образуват устойчиви емулсии. При необходимост епруветката се охлажда на течаща вода. Запушалката, коркова или друга, се отстранява внимателно и едновременно с гърлото на съда се промива с малка част от смесения разтворител (точка 4.6) с помощта на промивното устройство (точка 5.8), така че разтворителят да се стече обратно в епруветката.

A.1.5.4. Прибавя се 25 ml петролев етер (точка 4.5). Епруветката се затваря с повторно намокрена коркова или друга запушалка (намокрянето се извършва чрез потапяне на запушалката във вода) и се разклаща внимателно за 30 сек, както е описано в точка A.1.5.3.

A.1.5.5. Затворената епруветка се центрофутира в продължение на 1 до 5 min при скорост на въртене 500—600 оборота/min⁻¹ (точка 5.2). В отсъствието на центрофуга (виж забележката към точка 5.2) епруветката се оставя в покой на статива за екстракционни апарати (точка 5.7) за не по-малко от 30 min до избистрянето и пълното отделяне на супернатанта от водния слой. При необходимост епруветката се охлажда на течаща вода.

A.1.5.6. Запушалката, коркова или друга, се отстранява внимателно и едновременно с гърлото на епруветката се промива с няколко кубически сантиметра от смесения разтворител, при което течността трябва да се стече в апарата.

A.1.5.7. В епруветката се поставя сифонна тръбичка или промивно устройство, като дългият им вътрешен накрайник се натиска надолу докато входният всмукателен отвор застане на около 3 mm над граничната между двата слоя повърхност. Дългият вътрешен накрайник се поставя успоредно на оста на епруветката за екстракция.

Супернататният слой от епруветката се прехвърля внимателно в подготвената колба за събиране на мазнината (точка 6.4), в която са поставени средства за улесняване на кипенето (точка 5.10), които не са задължителни, ако се използват метални блюда, като се внимава да не се прехвърли каквато и да било част от водния слой. Изходният отвор на устройството се промива с няколко кубически сантиметра от смесения разтворител, като течността, с която е промит, се събира в същата колба.

A.1.5.8. Устройството се разхлабва при гърлото на епруветката чрез леко повдигане, а долната част на дългия му вътрешен накрайник се промива с няколко кубически сантиметра от смесения разтворител, след което то се сваля и отново се поставя, а течността от промивките се прехвърля в колбата за събиране на мазнината.

Изходният отвор на устройството се промива с няколко кубически сантиметра от смесения разтворител, като течността се събира в съда. По желание разтворителят или част от него може да се отстрани чрез дестилация или изпаряване, както е описано в точка 6.5.12.

- A.1.5.9. Устройството се охлажда повторно при гърлото на съда чрез леко повдигане и към съдържанието на епруветката се добавя 5 ml етанол, с който се промива дългия му вътрешен накрайник, след което течността се смесва, както е описано в точка A.1.5.2.
- A.1.5.10. Провежда се втора екстракция, като се повтарят операциите, описани в точка A.1.5.3 до точка A.1.5.8, като този път се използват 15 ml диетилов етер (точка 4.4) и 15 ml петролев етер (точка 4.5). С етера се промива дългият вътрешен накрайник на устройството по време на отстраняването му след първата екстракция.
- A.1.5.11. Извършва се *трета екстракция* чрез повтаряне на операциите, описани в точка A.1.5.3 до точка A.1.5.8, като се използват 15 ml диетилов етер и 15 ml петролев етер за промиване на дългия вътрешен накрайник на устройството, както е описано в точка A.1.5.10.

За обезмасленото мляко третата екстракция може да не се провежда.

- A.1.5.12. Прилагат се операциите, описани в точки 6.5.12 до 6.5.16.
-