

31992D0608

31.12.1992

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 407/29

ROZHODNUTIE RADY

zo 14. novembra 1992,

stanovujúce metódy analýzy a skúšok tepelne ošetrovaného mlieka určeného na priamu ľudskú spotrebu

(92/608/EHS)

RADA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 85/397/ES z 5. augusta 1985 o zdravotných a veterinárnych problémoch ovplyvňujúcich obchod s tepelne ošetrovaným mliekom vnútri spoločenstva ⁽¹⁾, najmä na jej článok 11 ods. 6,

so zreteľom na návrh Komisie,

keďže podľa článku 11 ods. 6 smernice 85/397/EHS má Rada ustanoviť podrobné opatrenia na výkon kontrol ustanovených v článku 11 ods. 2; keďže účelom týchto kontrol, ktoré vykonávajú prevádzkárne pod dohľadom a zodpovednosťou úradného orgánu a s pravidelnými kontrolami zo strany tohto úradného orgánu, je zabezpečiť súlad s požiadavkami smernice 85/397/EHS, a najmä požiadaviek, ktoré sú ustanovené v jej článku 3 (A) ods. 3;

keďže súčasťou ustanovenia postupov kontrol je určenie metód, ktoré sa majú používať pri realizácii týchto kontrol;

keďže sa musia predpísať metódy stanovenia celkového obsahu sušiny, obsahu tuku, obsahu beztukovej sušiny, celkového obsahu dusíka, obsahu bielkovín a hustoty tepelne ošetrovaného mlieka určeného na priamu ľudskú spotrebu;

keďže z technických dôvodov je počiatočnou požiadavkou ustanoviť referenčné metódy analýzy a skúšok, ktorými sa má zabezpečiť plnenie noriem predpísaných v článku 3 (A) ods. 3 smernice 85/397/EHS; keďže je obzvlášť dôležité vypracovať štúdiu podmienok, v ktorých sa používajú rutinné metódy analýzy a skúšok; keďže dovedy, kým nebude známy výsledok tejto štúdie, je povinnosťou príslušných orgánov dohliadať na to, aby sa používali vhodné rutinné metódy s cieľom zabezpečiť plnenie uvedených noriem;

keďže súčasťou určenia vyššie uvedených metód je najmä určenie analytických postupov a stanovenie kritérií spoľahlivosti, čím sa zabezpečí jednotný výklad výsledkov,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

Článok 1

Metódy analýzy a skúšok tepelne ošetrovaného mlieka:

- stanovenie celkového obsahu sušiny,
- stanovenie obsahu tuku,
- stanovenie celkového obsahu beztukovej sušiny,
- stanovenie celkového obsahu dusíka,
- stanovenie obsahu bielkovín,
- stanovenie mernej hmotnosti.

(¹) Ú. v. ES L 226, 24.8.1985, s. 13, naposledy zmenené a doplnené smernicou 89/662/EHS (Ú. v. ES L 395, 30.12.1989, s. 13).

Článok 2

Implementácia referenčných metód analýzy a skúšok, stanovenie kritérií spoľahlivosti a zber vzoriek sa musia vykonávať podľa pravidiel ustanovených v prílohe I.

Článok 3

Metódy uvedené v článku 1 sú ustanovené v prílohe II.

Článok 4

Toto rozhodnutie je adresované členským štátom.

V Bruseli 14. novembra 1992

Za Radu
predseda
J. GUMMER

PRÍLOHA I

I. VŠEOBECNÉ USTANOVENIA

1. ÚVOD

Sú opísané všeobecné ustanovenia týkajúce sa činidiel, vybavenia, vyjadrenia výsledkov, presnosti a správ o skúške. Príslušné orgány členských štátov a oprávnené laboratória zodpovedné za odber vzoriek a skúšky mlieka musia tieto ustanovenia rešpektovať.

2. ČINIDLÁ

2.1. Voda

2.1.1. Vždy, keď sa uvádza voda na účely vytvárania roztokov, zriedovania alebo oplachovania, používa sa destilovaná voda, deionizovaná voda alebo demineralizovaná voda s aspoň rovnocennou čistotou, pokiaľ nie je stanovené inak.

2.1.2. Vždy, keď sa uvádza „roztok“ alebo „zriedenie“ bez ďalších údajov, rozumie sa „vodný roztok“ alebo „zriedenie vodou“.

2.2. Chemikálie

Všetky chemikálie majú uznanú analytickú kvalitu, pokiaľ nie je stanovené inak.

3. VYBAVENIE

3.1. Zoznam vybavenia

Zoznam vybavenia uvádzaný pri rôznych referenčných metódach obsahuje len tie položky, ktoré majú špeciálne použitie a položky podľa konkrétnej špecifikácie.

3.2. Analytické váhy

„Analytické váhy“ sú váhy schopné merať hmotnosť s presnosťou na 0,1 mg.

4. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

4.1. Výsledky

Pokiaľ nie je stanovené inak, výsledky uvádzané v správe o skúške (6) sú stredné aritmetické hodnoty získané z dvoch skúšok, ktoré spĺňajú kritérium opakovateľnosti (5.1.1.) stanovené pre danú metódu. Ak kritérium opakovateľnosti nie je splnené, skúška sa musí podľa možnosti zopakovať alebo výsledok sa musí vyhlásiť za neplatný.

4.2. Výpočet percentuálnych hodnôt

Okrem prípadov, keď je stanovené inak, je výsledok vypočítaný v percentách hmotnosti vzorky.

5. KRITÉRIÁ PRESNOSTI: OPAKOVATELNOSŤ A REPRODUKOVATELNOSŤ

5.1. Kritériá presnosti uvádzané v každej metóde sú definované takto:

5.1.1. *Opakovateľnosť* (r) je hodnota, pod ktorou sa nachádza absolútny rozdiel medzi výsledkami dvoch jednotlivých skúšok, získanými tým istým postupom na vhodnom skúšobnom materiáli, v rovnakých podmienkach (ten istý operátor, tie isté prístroje, to isté laboratórium a krátky časový interval).

5.1.2. *Reprodukovateľnosť* (R) je hodnota, pod ktorou sa nachádza absolútny rozdiel medzi výsledkami dvoch jednotlivých skúšok získanými tým istým postupom na vhodnom skúšobnom materiáli, v rôznych podmienkach (rôzni operátori, rôzne prístroje, rôzne laboratória a/alebo rôzne časy).

5.1.3. Pokiaľ nie je stanovené inak, pre každú jednotlivú metódu predstavujú hodnoty kritérií opakovateľnosti a reprodukovateľnosti každého postupu intervaly spoľahlivosti 95 % podľa definície v ISO 5725: 2. vydanie, 1986.

5.1.4. Potrebné porovnávacie skúšky a štúdie by sa mali plánovať a vykonávať v súlade medzinárodnými smernicami.

6. SPRÁVA O SKÚŠKE

V správe o skúške sa uvádza použitá metóda analýzy, ako aj získané výsledky. Správa okrem toho obsahuje všetky podrobnosti použitého postupu, ktoré nie sú stanovené v metóde analýzy, alebo ktoré sú nepovinné, ako aj všetky ostatné okolnosti, ktoré mohli ovplyvniť získané výsledky. V správe o skúške sa uvádzajú všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

II. ODBER VZORIEK Z TEPELNE OŠETRENÉHO MLIEKA

1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI

Tento postup stanovuje referenčnú metódu odberu, prepravy a skladovania vzoriek tepelne ošetreného mlieka.

2. VŠEOBECNE

Odber vzoriek z tepelne ošetreného mlieka v cisternách atď., vykonáva skúsený operátor, ktorý predtým, než začal odberať vzorky mlieka, absolvoval vhodný výcvik.

Ak to príslušné orgány alebo skúšobné laboratórium uznajú za vhodné, vykonajú inštrukcií pracovníkov odberu vzoriek o technikách odberu vzoriek, aby zabezpečili, že vzorka bude reprezentatívna pre celú dávku a v súlade s ňou.

Ak to príslušné orgány alebo skúšobné laboratórium uznajú za vhodné, vykonajú inštrukcií pracovníkov odberu vzoriek o označovaní vzoriek, aby zabezpečili jednoznačnú identitu vzoriek.

3. ZARIADENIA NA ODBER VZORIEK

3.1. Všeobecne

Zariadenia na odber vzoriek sú vyrobené z nerezovej ocele alebo iného vhodného materiálu s primeranou pevnosťou a konštrukciou vhodnou na určený účel (miešanie, odber vzoriek atď.). Piesty a miešače na miešanie kvapalín v nádobách majú dostatočne veľkú plochu na to, aby zabezpečili primerané premiešanie výrobku, ale bez toho, aby spôsobili vznik zatuchnutej chuti. Naberačky musia mať pevnú rukoväť a dostatočnú dĺžku, ktorá umožňuje získať vzorku z akejkoľvek hĺbky nádoby. Objem naberačky nesmie byť menší než 50 ml.

Nádoby na vzorky a ich uzávery by mali byť zo skla, vhodných kovov alebo plastických hmôt.

Materiály, z ktorých sú skonštruované zariadenia na odber vzoriek (vrátane nádob a ich uzáverov), nesmú spôsobiť žiadnu zmenu, ktorá by mohla ovplyvniť výsledky skúšok. Všetky povrchy zariadení na odber vzoriek a nádob na vzorky sú čisté a suché, hladké a bez prasklín a rohy sú zaoblené.

4. TECHNIKA ODBERU VZORIEK

4.1. Všeobecne

Bez ohľadu na skúšky, ktoré sa majú vykonať, mlieko sa pred odberom vzoriek dôkladne zamieša buď manuálne alebo mechanickými prostriedkami.

Vzorka sa odoberie okamžite po zamiešaní pokiaľ je mlieko ešte zčerené.

Objem vzorky je primeraný požiadavkám skúšky. Použité nádoby na vzorky majú taký objem, aby sa vzorkou takmer celkom naplnili, čím sa umožní riadne premiešanie ich obsahu pred začiatkom skúšky, ale zabráni sa múteniu v priebehu prepravy.

4.2. Manuálny odber vzoriek

4.2.1. Odber vzorky z rozdeleného množstva

Ak sa množstvo mlieka, z ktorého sa má odobrať vzorka, nachádza vo viac než jednej nádobe, odoberte reprezentatívnu vzorku z každej nádoby a zaznamenajte si množstvo mlieka, ku ktorému každá vzorka patrí. Pokiaľ sa vzorky z každej nádoby nemajú skúšať jednotlivo, zmiešajte časti týchto reprezentatívnych množstiev s objemami, ktoré sú úmerné množstvu v tej nádobe, z ktorej bola každá vzorka odobratá. Po zmiešaní odoberte vzorku (vzorky) z týchto spojených úmerných množstiev.

4.2.2. Odber vzoriek z veľkých nádob – Skladovacie nádrže, železničné a automobilové cisterny

4.2.2.1. Pred odberom vzorky mlieko vhodným postupom premiešajte.

Na premiešanie obsahu veľkých nádob alebo skladovacích nádrží, železničných alebo automobilových cisterien sa odporúča použiť mechanické miešanie (4.2.2.2.).

Rozsah miešania je úmerný dobe, po ktorú bolo mlieko v pokoji. Musí sa preukázať, že účinnosť použitého postupu miešania je za akýchkoľvek konkrétnych okolností primeraná účelom plánovanej analýzy; kritérium účinnosti miešania významne ovplyvňuje podobnosť medzi analytickými výsledkami získanými zo vzoriek odobratých buď z rôznych častí zásielok alebo z výstupu z nádrže v príslušných časových intervaloch v priebehu vypúšťania. Postup miešania mlieka (neošetreného mlieka alebo plnotučného mlieka) sa považuje za účinný, ak je rozdiel obsahu tuku v dvoch vzorkách odobratých v týchto podmienkach menší než 0,1 %.

Vo veľkej nádobe so spodným výpustným otvorom sa môže v mieste vypúšťania nachádzať malé množstvo mlieka, ktoré dokonca ani po premiešaní nie je reprezentatívne pre celý obsah. Z tohto dôvodu by sa mali vzorky prednostne odberať cez kontrolný otvor. Ak sa vzorky odoberajú z výpustného otvoru, má sa nechať odtiecť dostatočné množstvo mlieka, aby sa zabezpečila reprezentatívnosť vzoriek pre celok.

- 4.2.2.2. Obsah veľkých nádob alebo skladovacích nádrží, železničných alebo automobilových cisterien je možné miešať:
- mechanickým miešačom zabudovaným do nádrží a poháňaným elektromotorom,
 - vrtulou alebo miešačom poháňaným elektromotorom a umiestneným na kontrolnom otvore, pričom miešač je zavesený v mlieku,
 - v prípade železničných alebo automobilových cisterien recirkuláciou mlieka cez prepravnú hadicu pripojenú k vypúšťacím čerpadlám cisterien a vloženú cez kontrolný otvor,
 - čistým filtrovaným stlačeným vzduchom. Aby sa v tomto prípade zabránilo vzniku zatuchnutej chuti, mal by sa použiť minimálny tlak a objem vzduchu.

4.3. **Odber vzoriek z tepelne ošetrovaného mlieka určeného na priamu spotrebu v maloobchodných obaloch**

Vzorkami tepelne ošetrovaného mlieka určeného na priamu spotrebu v maloobchodných obaloch sú celé hermetické balenia. Ak je to možné, vzorky sa musia odobrať z baliaceho stroja alebo z chladnej miestnosti v ošetrovacej prevádzke čo najskôr po spracovaní (v prípade pasterizovaného mlieka v ten istý deň, v ktorom bolo spracované).

Odoberajú sa vzorky každého druhu tepelne ošetrovaného mlieka (pasteurizované, ultra vysoko ohriate a sterilizované) v počtoch zodpovedajúcich skúškam, ktoré budú vykonané a v súlade s pokynmi vydanými skúšobným laboratóriom alebo príslušným orgánom.

5. **IDENTIFIKÁCIA VZORKY**

Vzorka sa označí identifikačným kódom na základe pokynov vydaných skúšobným laboratóriom alebo príslušným orgánom tak, aby sa dala ľahko identifikovať.

6. **KONZERVÁCIA, PREPRAVA A SKLADOVANIE VZORIEK**

Podľa druhu mlieka a použitého postupu analýzy vypracuje skúšobné laboratórium v súlade s príslušným vnútroštátnym orgánom pokyny týkajúce sa podmienok konzervácie (chemická, tepelná), prepravy, skladovania a času medzi odberom vzorky a analýzou mlieka.

V pokynoch sú zahrnuté tieto body:

- V priebehu prepravy a skladovania sa musia prijať také bezpečnostné opatrenia, aby sa zabránilo styku s kontaminujúcimi zápachmi a styku s priamym slnečným svetlom. Ak je použitá nádoba na vzorky priehľadná, musí sa skladovať na tmavom mieste.

PRÍLOHA II

I. STANOVENIE CELKOVÉHO OBSAHU SUŠINY

1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI

Tento postup určuje referenčnú metódu stanovenia celkového obsahu sušiny v mlieku.

2. DEFINÍCIA

Celkový obsah sušiny: Hmota, ktorá zostane po skončení stanoveného postupu sušenia, vyjadrená vo forme percent hmotnosti.

3. PRINCÍP

Odparenie vody zo skúšobného množstva pri teplote 102 ± 2 °C v sušiackej peci.

4. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A LABORATÓRNE SKLO

Obvyklé laboratórne vybavenie, a najmä:

4.1. Analytické váhy

4.2. Exikátor vybavený účinným desikátorom (napríklad čerstvo vysušený silikagel s indikátorom obsahu vody).

4.3. Sušiacia pec, ventilovaná, termostaticky regulovaná na teplotu 102 ± 2 °C v celom jej pracovnom priestore.

4.4. Nádoby s plochým dnom s výškou 20 až 25 cm, priemerom 50 až 75 mm a z vhodného materiálu vybavené dobre tesniacimi, ľahko odnímateľnými vekami.

4.5. Kúpeľ s vriacou vodou

4.6. Homogenizátor

5. PRÍPRAVA SKÚŠOBNEJ VZORKY

Ohrejte vzorku mlieka na teplotu 20 až 25 °C. Dôkladne zamiešajte, aby ste zabezpečili homogénne rozloženie tuku v celej vzorke. Dajte pozor, aby ste nemiešali tak prudko, že by ste spôsobili spenenie mlieka a mútenie tuku. Ak zistíte, že je ťažké rozptýliť vrstvu smotany, vzorku pomaly ohrejte na teplotu od 25 do 40 °C a opatrným miešaním vmiešajte všetku smotanu priliehajúcu k nádobe do mlieka. Vzorku rýchlo ochladte na teplotu 20 až 25 °C.

Podľa potreby môžete na rozptýlenie tuku použiť homogenizátor.

Ak vzorka obsahuje oddelený kvapalný tuk alebo viditeľné oddelené biele častice nepravidelného tvaru priliehajúce k stenám nádoby, nie je možné očakávať presné výsledky.

6. POSTUP

6.1. Príprava nádoby

Najmenej 30 minút ohrievajte nádobu (4.4.) s vekom položeným vedľa nej v peci (4.3.) regulovanej na teplotu 102 ± 2 °C. Položte veko na nádobu a ihneď ju preneste do exikátora (4.2.), nechajte ju vychladnúť na izbovú teplotu (t. j. ochladzujte ju najmenej 30 minút) a odvážte ju s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg.

6.2. Skúšobné množstvo

Ihneď navážte 3 až 5 g pripravenej skúšobnej vzorky (5.) s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg do pripravenej nádoby (6.1.).

6.3. Stanovenie obsahu

6.3.1. Nádobu vopred vysušujte 30 minút ohrievaním v kúpeli s vriacou vodou (4.5.).

- 6.3.2. Ohrievajte nádobu s vekom položeným vedľa nej v peci (4.3.) regulovanej na teplotu 102 ± 2 °C po dobu 2 hodín. Položte veko na nádobu a vyberte ju z pece.
- 6.3.3. Nechajte ju vychladnúť v exikátore (4.2.) na izbovú teplotu (t. j. najmenej 30 minút) a odvážte ju s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg.
- 6.3.4. Nádobu znovu ohrievajte s vekom položeným vedľa nej v peci po dobu jednej hodiny. Položte veko na nádobu a vyberte ju z pece. Nechajte ju ochladnúť približne po dobu 30 minút v exikátore a odvážte ju s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg.
- 6.3.5. Opakujte operácie opísané v bode 6.3.4 dovtedy, kým rozdiel hmotností zistených pri dvoch po sebe idúcich váženíach neklesne pod 0,5 mg. Zaznamenajte najnižšiu hmotnosť.

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

7.1. Výpočet a vzorec

Vypočítajte celkový obsah sušiny v percentách hmotnosti zo vzorca:

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

kde

W_T = celkový obsah sušiny v g na 100 g,

m_0 = hmotnosť nádoby a veka (pozri 6.1.), v gramoch,

m_1 = hmotnosť nádoby, veka a skúšobného množstva (pozri 6.2.), v gramoch,

m_2 = hmotnosť nádoby, veka a vysušeného skúšobného množstva (pozri 6.3.5.), v gramoch.

Zaokrúhlite získanú hodnotu na najbližšiu 0,01 % (percenta hmotnosti).

7.2. Presnosť

7.2.1. *Opakovateľnosť* (r): 0,10 g celkového obsahu sušiny na 100 g výrobku.

7.2.2. *Reprodukovateľnosť* (R): 0,20 g celkového obsahu sušiny na 100 g výrobku.

II. STANOVENIE OBSAHU TUKU

1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI

Tento postup určuje referenčnú metódu stanovenia obsahu tuku v surovom mlieku a v plnotučnom mlieku, v čiastočne odtučnenom mlieku a v odtučnenom mlieku.

2. DEFINÍCIA

Obsahu tuku v mlieku: všetok materiál, ktorého obsah je stanovený určenou metódou. Vyjadruje sa v percentách hmotnosti.

3. PRINCÍP

Amoniakovo etanolový roztok skúšobného množstva sa extrahuje dietyléterom a petroléterom, rozpúšťadlá sa odstraňujú destiláciou alebo odparením a stanoví sa hmotnosť extrahovanej hmoty rozpustnej v petrolétere. (Tento postup je bežne známy ako Röseho-Gottliebova metóda).

4. ČINIDLÁ

Všetky činidlá majú uznanú analytickú kvalitu a po použití v slepej skúške nezanechávajú žiadne vyhodnotiteľné rezíduum.

Vyskúšajte kvalitu činidiel a vykonajte postup stanovenia určený v bode 6.3. Ako tarovaciu nádobu pri vážení použite prázdnu banku, kadičku alebo kovovú nádobu (5.8.) pripravenú postupom opísaným v bode 6.4. (umožní to urobiť korekciu výsledku váženia vzhľadom na účinky vyvolané zmenami atmosférických podmienok). Ak je hmotnosť rezídua korigovaná na zdanlivú zmenu tara hmotnosti vyššia než 2,5 mg, stanovte samostatne hmotnosť rezídua alebo rozpúšťadiel odparením 100 ml dietyléteru (4.4.), resp. 100 ml petroléteru (4.5.). Aj pri vážení použite tarovaciu nádobu. Ak je hmotnosť rezídua vyššia než 2,5 mg, očistite rozpúšťadlo destiláciou, alebo ho nahraďte.

- 4.1. **Roztok amoniaku** obsahujúci približne 25 % (m/m) NH_3 . Je možné použiť aj roztok amoniaku s vyššou koncentráciou (pozri 6.5.1. a A.1.5.1.).

- 4.2. **Etanol**, najmenej 94 % (v/v). Je možné použiť etanol denaturovaný metanolom za predpokladu, že je isté, že to neovplyvní výsledky stanovenia obsahu.

4.3. **Roztok kongo červenej alebo krezolovej červenej**

Rozpustite 1 g kongo červenej alebo krezolovej červenej vo vode a roztok zriedte doliatím do 100 ml.

Poznámka: Použitie tohto roztoku, ktorý umožňuje jasnejšie rozoznať rozhranie medzi rozpúšťadlom a vodnými vrstvami, je nepovinné (pozri 6.5.2.). Ostatné farebné vodné roztoky sa môžu použiť za predpokladu, že neovplyvnia výsledok stanovenia obsahu.

- 4.4. **Dietyléter**, bez peroxidov, neobsahujúci viac než 2 mg/kg antioxidantov a spĺňajúci požiadavky slepej skúšky (6.3.).

- 4.5. **Petroléter** s ľubovoľným rozsahom teplôt varu od 30 do 60 °C.

- 4.6. **Zmiešané rozpúšťadlo** pripravené krátko pred použitím zmiešaním rovnakých objemov dietyléru (4.4.) a petroléru (4.5.).

5. **PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A LABORATÓRNE SKLO**

Výstraha: Keďže v priebehu postupu stanovenia sa používajú prchavé horľavé rozpúšťadlá, každý použitý elektrický prístroj musí spĺňať požiadavky legislatívnych predpisov týkajúce sa používania týchto rozpúšťadiel.

Obvyklé laboratórne vybavenie a najmä:

5.1. **Analytické váhy**

- 5.2. **Odstredivka**, ktorá môže rotovať s bankami alebo skúmavkami (5.6.) na extrakciu tuku s rotačnou frekvenciou 500 až 600 otáčok za minútu, čím sa pri vonkajšom konci baniek alebo skúmaviek vytvorí gravitačné pole 80 až 90 g.

Poznámka: Použitie odstredivky je nepovinné (6.5.5).

- 5.3. **Destilačný alebo odparovací prístroj**, ktorý umožňuje destilovať rozpúšťadlá a etanol z baniek alebo odparovať ich z kadičiek a nádob (pozri body 6.5.12. a 6.5.15.) pri teplote neprevyšujúcej 100 °C.

- 5.4. **Pec**, elektricky ohrievaná, s plne otvoreným ventilačným otvorom (otvormi), ktorú je možné regulovať na teplotu 102 ± 2 °C v celom jej pracovnom priestore. Pec je vybavená vhodným teplomerom.

- 5.5. **Vodný kúpeľ**, ktorý je možné udržiavať na teplote 35 až 40 °C.

5.6. **Extrakčné banky na tuk Mojonnierovho typu.**

Poznámka: Tiež je možné použiť skúmavky na extrakciu tuku s vložkou s kvapalinovým uzáverom alebo s vložkou od premývacej fľaše, ale v tomto prípade je postup odlišný a je stanovený v dodatku.

Banky (alebo skúmavky) sú vybavené zabrusenými sklenenými zátkami alebo korkovými zátkami dobrej kvality alebo inými zátkami, na ktoré nepôsobia použité rozpúšťadlá. Korkové zátky sa extrahujú dietyléterom (4.4.), najmenej 15 minút sa podržia vo vode s teplotou 60 °C alebo viac, a potom sa nechajú vychladnúť vo vode, takže pri použití sú nasýtené.

- 5.7. **Stojan** na držanie baniek (alebo skúmaviek) na extrakciu tuku (pozri 5.6.).

- 5.8. **Premývacia fľaša** vhodná na použitie so zmiešaným rozpúšťadlom (4.6.). Plastová premývacia fľaša sa nesmie používať.

- 5.9. **Zberné nádoby na tuk**, napríklad varné banky (s plochým dnom) alebo Erlenmayerove banky s objemom 125 až 250 ml alebo kovové nádoby. Ak sa používajú kovové nádoby, najlepšie je, ak sú vyrobené z nerezovej ocele, majú ploché dno, najvhodnejšie s výpusťou, priemer 80 až 100 mm a výšku približne 50 mm.

- 5.10. **Varné pomôcky**, bez tuku, z neporézneho porcelánu alebo karbidu kremíka alebo sklené guľôčky (v prípade kovových nádob sú nepovinné).

- 5.11. **Odmerné valce** s objemami 5 a 25 ml.

- 5.12. **Pipety**, ciachované, s objemom 10 ml.

- 5.13. **Kliešte**, vyrobené z kovu, vhodné na uchytenie baniek, kadičiek alebo nádob.

6. POSTUP

Poznámka: Alternatívny postup využívajúci skúmavky na extrakciu tuku s vložkou s kvapalinovým uzáverom alebo s vložkou od premývacej fľaše (pozri poznámka k bodu 5.6.) je opísaný v dodatku.

6.1. Príprava skúšobnej vzorky

Upravujte teplotu laboratórnej vzorky približne na 35 až 40 °C po dobu 15 minút, v prípade potreby pomocou vodného kúpeľa. Vzorku dôkladne ale jemne premiešajte opakovaným preklápaním nádoby so vzorkou, ale tak, aby ste nespôsobili spenenie alebo mútenie a rýchlo ju ochlaďte na približne 20 °C.

6.2. Skúšobné množstvo

Premiešajte skúšobnú vzorku (6.1.) tak, že nádobu jemne trikrát alebo štyrikrát preklopite a ihneď navážte 10 až 11 g skúšobnej vzorky s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg, priamo alebo rozdielom, do jednej z extrakčných baniek (5.6.).

Skúšobné množstvo musí čo najdokonalejšie stiecť do dolnej (malej) nádoby extrakčných baniek.

6.3. Slepá skúška

Súčasne so stanovením obsahu vykonávajte slepú skúšku tým istým postupom a s tými istými činidlami, ale skúšobné množstvo nahraďte 10 až 11 g vody.

Zmena zdanlivej hmotnosti zbernej nádoby na tuk korigovaná na zdanlivú zmenu hmotnosti kontrolnej nádoby by nemala byť väčšia než 2,5 mg.

6.4. Príprava zbernej nádoby na tuk

Vysušujte nádobu (5.9.) spolu s niekoľkými varnými pomôckami (5.10), ktorými podporíte mierny var v priebehu následného odstraňovania riedidla, v peci (5.4) po dobu jednej hodiny. Nechajte nádobu vychladnúť (nie v exikátore, ale chránenú pred prachom) na teplotu váhovej (v prípade sklenených nádob ich nechajte chladnúť najmenej jednu hodinu, v prípade kovových nádob najmenej 30 minút). Dajte pozor na to, aby teplota nekolísala, pomocou klieští položte nádobu na váhu a odvážte ju s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg.

6.5. Stanovenie obsahu

6.5.1. Pridajte 2 ml roztoku amoniaku (4.1.) alebo rovnocenný objem roztoku amoniaku s vyššou koncentráciou a dôkladne ho zmiešajte so skúšobným množstvom v malej nádobe banky. Po pridaní amoniaku bezodkladne vykonajte postup stanovenia obsahu.

6.5.2. Pridajte 10 ml etanolu (4.2.) a jemne ale dôkladne miešajte tak, že necháte, aby obsah banky prúdil vzad a vpred medzi dvomi nádobami; dajte pozor, aby sa kvapalina nedostala príliš blízko k hrdlu banky. V prípade potreby pridajte dve kvapky roztoku kongo červenej alebo krezolovej červenej (4.3.).

6.5.3. Pridajte 25 ml dietyléteru (4.4.), uzavrite banku korkovou zátkou nasýtenou vodou alebo inou zátkou navlhčenou vo vode (pozri 5.6.) a traste bankou silno, ale nie príliš silno (aby ste zabránili tvorbe stálych emulzií), jednu minútu, pričom banku držte vo vodorovnej polohe tak, aby malá nádoba smerovala nahor. Periodicky nechajte kvapalinu vo veľkej nádobe pretekať do malej nádoby. Podľa potreby ochlaďte banku tečúcou vodou, potom opatrne vyberte korkovú zátku alebo inú zátku a opláchnite ju a hrdlo banky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla (4.6.) pomocou premývacej fľaše (5.8.) tak, aby oplachová kvapalina stekala do banky.

6.5.4. Pridajte 25 ml petroléteru (4.5.), uzavrite banku znovu navlhčenou korkovou zátkou alebo inou zátkou (navlhčite ju znovu ponorením do vody) a 30 sekúnd jemne traste bankou tak, ako je opísané v bode 6.5.3.

6.5.5. Odstreďujte uzavretú banku v odstredivke jednu až päť minút pri rotačnej frekvencii 500 až 600 otáčok za minútu⁻¹ (5.2.). Ak odstredivku nemáte k dispozícii (pozri poznámku k bodu 5.2.), nechajte uzavretú banku najmenej 30 minút stáť v stojane (5.7.), kým nie je povrchová vrstva číra a jasne oddelená od vodnej vrstvy. Podľa potreby ochlaďte banku tečúcou vodou.

6.5.6. Opatrne vyberte korkovú zátku alebo inú zátku a opláchnite ju a vnútro hrdla banky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla (4.6.) tak, aby oplachová kvapalina stekala do banky.

Ak sa rozhranie nachádza pod dolným okrajom hrdla banky, zvýšte ho mierne nad túto úroveň jemným prilieváním vody po bočnej stene banky, ulahčíte tak zlievanie rozpúšťadla.

6.5.7. Držte extrakčnú banku za malú nádobu a opatrne zlejte čo najviac povrchovej vrstvy do pripravenej zbernej nádoby na tuk (6.4.), ktorá v prípade baniek obsahuje niekoľko varných pomôcok (5.10.) (v prípade kovových nádob sú varné pomôcky nepovinné), pritom dajte pozor, aby ste nezliali nič z vodnej vrstvy.

6.5.8. Opláchnite vonkajšiu stenu hrdla extrakčnej banky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla (4.6.), oplachovú kvapalinu zberajte do zbernej nádoby na tuk a dávajte pozor na to, aby sa zmiešané rozpúšťadlo neprelialo ponad vonkajšiu stenu extrakčnej banky.

V prípade potreby môžete rozpúšťadlo alebo jeho časť odstrániť z nádoby destiláciou alebo odparením tak, ako je opísané v bode 6.5.12.

6.5.9. K obsahu extrakčnej banky pridajte 5 ml etanolu (4.2.) tak, že etanolom opláchnete vnútornú stenu hrdla banky a obsah zmiešajte spôsobom opísaným v bode 6.5.2.

6.5.10. Opakovaním operácií opísaných v bodoch 6.5.3. až 6.5.8. vrátane, vykonajte druhú extrakciu, ale použite len 15 ml dietyléteru (4.4.) a 15 ml petroléteru (4.5.) a na opláchnutie vnútornej steny hrdla extrakčnej banky použite éter. V prípade potreby zvýšte rozhranie po stred hrdla banky, umožníte tým v závere čo najdokonalejšie zliať riedidlo.

6.5.11. Ďalším opakovaním operácií opísaných v bodoch 6.5.3. až 6.5.8. vrátane, vykonajte tretiu extrakciu, ale použite len 15 ml dietyléteru (4.4.) a 15 ml petroléteru (4.5.); na opláchnutie vnútornej steny hrdla extrakčnej banky použite éter. V prípade potreby zvýšte rozhranie po stred hrdla banky, umožníte tým v závere čo najdokonalejšie zliať riedidlo.

V prípade odtučneného mlieka je možné tretiu extrakciu vynechať.

6.5.12. Čo najdokonalejšie odstráňte rozpúšťadlá (vrátane etanolu) z banky destiláciou alebo z kadičky alebo nádoby odparením (5.3.), pričom pred začiatkom destilácie opláchnite hrdlo banky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla (4.6.).

6.5.13. Ohrievajte zbernú nádobu na tuk (pričom banka je položená na boku, čím sa umožní únik pár rozpúšťadla) v peci jednu hodinu. Vyberte zbernú nádobu na tuk z pece, nechajte ju vychladnúť (nie v exikátore, ale chránenú pred prachom) na teplotu váhovne (v prípade sklenených nádob ich nechajte chladnúť najmenej jednu hodinu, v prípade kovových nádob najmenej 30 minút) a odvážte ju s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg.

Nádobu bezprostredne pred vážením neutierajte. Pomocou klieští položte nádobu na váhu, a najmä dajte pozor na to, aby teplota nekolísala.

6.5.14. Opakujte operácie opísané v bode 6.5.13. dovtedy, kým hmotnosť zbernej nádoby na tuk pri dvoch po sebe idúcich váženíach neklesne alebo nevzrastie o 0,5 mg alebo o menej. Zaznamenajte minimálnu nameranú hmotnosť ako hmotnosť zbernej nádoby na tuk a extrahovanej hmoty.

6.5.15. Pridajte do zbernej nádoby na tuk 25 ml petroléteru, aby ste overili, či je extrahovaná hmota úplne rozpustná alebo nie. Mierne ohrievajte a miešajte rozpúšťadlo dovtedy, kým sa tuk nerozpustí.

Ak je extrahovaná hmota úplne rozpustná v petroléteri, za hmotnosť tuku považujte rozdiel medzi konečnou hmotnosťou nádoby obsahujúcej extrahovanú hmotu (6.5.14.) a jej počiatočnou hmotnosťou (6.4.).

6.5.16. Ak extrahovaná hmota nie je úplne rozpustná v petroléteri, alebo v prípade pochybností, úplne vyextrahujte tuk z nádoby opakovaným omývaním petroléterom.

Nechajte usadiť všetky stopy nerozpustného materiálu a opatrne zlejte petroléter tak, aby ste neodliali žiadny nerozpustný materiál. Zopakujte tieto operácie trikrát alebo viackrát, pritom oplachujte vnútornú stenu hrdla nádoby petroléterom.

Nakoniec, opláchnite vonkajšiu stenu hornej časti nádoby zmiešaným rozpúšťadlom tak, aby rozpúšťadlo nepretieklo ponad vonkajšiu stenu nádoby. Odstráňte pary petroléteru z nádoby ohrievaním nádoby v peci po dobu jednej hodiny, nechajte ju vychladnúť a odvážte ju postupom opísaným v bodoch 6.5.13. a 6.5.14.

Za hmotnosť tuku považujte rozdiel medzi hmotnosťou stanovenou v bode 6.5.14. a touto konečnou hodnotou hmotnosti.

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

7.1. Výpočet a vzorec

Vypočítajte obsah tuku v percentách hmotnosti zo vzorca:

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

kde

F = obsah tuku,

m_0 = hmotnosť skúšobného množstva (6.2.), v gramoch,

m_1 = hmotnosť zbernej nádoby na tuk a extrahovanej hmoty stanovená v bode 6.5.14, v gramoch,

m_2 = hmotnosť pripravenej zbernej nádoby na tuk alebo, v prípade nerozpusteného materiálu, hmotnosť zbernej nádoby na tuk a nerozpustného rezídua stanovená v bode 6.5.16, v gramoch,

m_3 = hmotnosť zbernej nádoby na tuk použitej pri slepej skúške (6.3.) a všetkej extrahovanej hmoty stanovenej v bode 6.5.14., v gramoch,

m_4 = hmotnosť pripravenej zbernej nádoby na tuk (pozri 6.4.) použitej pri slepej skúške (6.3.) alebo, v prípade nerozpusteného materiálu, hmotnosť zbernej nádoby na tuk a nerozpustného rezídua stanovená v bode 6.5.16., v gramoch.

Zaznamenajte výsledok s presnosťou na najbližšiu 0,01 %.

7.2. Presnosť**7.2.1. Opakovateľnosť (r):**

- v prípade plnotučného mlieka a čiastočne odtučneného mlieka: 0,02 g tuku na 100 g výrobku,
- v prípade odtučneného mlieka: 0,01 g tuku na 100 g výrobku.

7.2.2. Reprodukovateľnosť (R):

- v prípade plnotučného mlieka: 0,04 g tuku na 100 g výrobku,
- v prípade čiastočne odtučneného mlieka: 0,03 g tuku na 100 g výrobku,
- v prípade odtučneného mlieka: 0,025 g tuku na 100 g výrobku.

III. STANOVENIE CELKOVÉHO OBSAHU BEZTUKOVEJ SUŠINY**1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI**

Tento postup určuje referenčnú metódu stanovenia celkového obsahu beztukovej sušiny v tepelne ošetrovanom mlieku.

2. DEFINÍCIA A VÝPOČET

Celkový obsah beztukovej sušiny musí byť vyjadrený v percentách hmotnosti.

Obsah beztukovej sušiny je:

Celkový obsah beztukovej sušiny (pozri časť I) mínus obsah tuku (pozri časť II).

IV. STANOVENIE CELKOVÉHO OBSAHU DUSÍKA**1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI**

Tento postup určuje referenčnú metódu stanovenia celkového obsahu dusíka v surovom mlieku a v plnotučnom mlieku, v čiastočne odtučnenom mlieku a v odtučnenom mlieku.

2. DEFINÍCIA

Celkový obsah dusíka v mlieku: obsah dusíka vyjadrený v percentách hmotnosti stanovený špecifikovanou Kjeldahlovou metódou.

3. PRINCÍP

Odvážené množstvo vzorky mlieka sa natrávi koncentrovanou kyselinou sírovou a síranom draselným a síranom meďnatým ako katalyzátorom, čím sa obsah dusíka v organických zlúčeninách prevedie na obsah síranu amónneho. Amoniak sa uvoľní pridaním roztoku hydroxidu sodného, potom sa destiluje a absorbuje v roztoku kyseliny bóritej. Tá sa titruje kyslým roztokom.

4. ČINIDLÁ**4.1. Síran draselný (K_2SO_4).****4.2. Roztok síranu meďnatého.** Rozpustíte 5,0 g pentahydrátu síranu meďnatého ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) vo vode a zriedíte roztok do 100 ml (pri 20 °C) v odmernej banke.**4.3. Kyselina sírová,** najmenej 98 % (m/m) H_2SO_4 .**4.4. Roztok hydroxidu sodného,** 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (pri 20 °C).

Poznámka: Je možné použiť roztok hydroxidu sodného s nižšou koncentráciou, napríklad: 40 % (m/m) 572 g/l, pri 20 °C; alebo 30 % (m/m) 399 g/l, pri 20 °C.

4.5. Roztok kyseliny bóritej. Rozpustíte 40 g kyseliny bóritej (H_3BO_3) v jednom litri horúcej vody, nechajte vychladnúť a odložte do fľaše z borokremičitého skla.**4.6. Indikačný roztok.** Rozpustíte 0,01 g metylovej červenej, 0,02 g bromotymolovej modrej a 0,06 bromokrezolovej zelenej v 100 ml etanolu. Roztok skladujte v uzavretej fľaši z hnedého skla na chladnom a tmavom mieste.**4.7. Odmerný roztok**

c ($\frac{1}{2} H_2SO_4$) alebo c (HCl) = 0,1 mol/l normalizovaný na najbližšiu 0,0001 mol/l.

- 4.8. **Bezdušikátá sacharóza.**
- 4.9. **Amónna soľ**, čistá, ako napríklad oxalát amónny $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, H_2O alebo síran amónny $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 4.10. **Tryptofan** ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), **fenacetín** ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{CH}_2\text{CONH}_2$) alebo lyzín monohydrochlorid alebo lyzín dihydrochlorid ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ alebo $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2 \text{HCl}$).

Poznámka: Čistota činidiel v bodoch 4.9 a 4.10. by mala mať vyššiu kvalitu než je „analytická trieda čistoty“. Mal by sa používať certifikovaný roztok amónnej soli (4.9.), ak je k dispozícii.

5. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A LABORATÓRNE SKLO

Obvyklé laboratórne vybavenie a najmä:

- 5.1. **Kjeldahlove banky** s objemom 500 ml.
- 5.2. **Vhodné varné pomôcky**, napríklad sklené guľôčky s priemerom približne 5 mm, Hengarove granule, pemza.
- 5.3. **Byreta alebo automatická pipeta**, ktorou sa dá preniesť 1,0 ml.
- 5.4. **Ciachované odmerné valce**, sklené, s objemami 50, 100 a 250 ml.
- 5.5. **Prístroj na trávenie** v naklonenej polohe (približne 45°) s elektrickými ohrievačmi alebo plynovými horákmi, ktoré neohrievajú banky nad hladinou ich obsahu, so systémom odsávania výparov.
- 5.6. **Destilačný prístroj**, vyrobený z bórokremičitého skla, ku ktorému je možné pripojiť Kjeldahlovu banku (5.1.), pozostávajúci z účinnej rozstrekovacej hlavy pripojenej k účinnému kondenzátoru s rovnou vnútornou trúbkou a výstupnou trúbkou, ktorá je pripojená k jeho dolnému koncu; spojovacie trúbky a zátky (zátky) tesne priliehajú a najvhodnejšie je, ak sú vyrobené z neoprénovej gumeny.
- 5.7. **Pipeta alebo automatická pipeta**, ktorou sa dá preniesť 0,10 ml.
- 5.8. **Erlenmayerove banky**, s objemom 500 ml, ciachované na hodnotu 200 ml.
- 5.9. **Byreta** s objemom 50 ml, ciachovaná po 0,1 ml, maximálna chyba $\pm 0,05$ ml.
- 5.10. **Zväčšovacie sklo**, na odčítanie údajov z byrety (5.9.).
- 5.11. **pH meter**.
- 5.12. **Automatická byreta**.

6. POSTUP

- 6.1. Vložte do Kjeldahlovej banky (5.1.) varnú pomôcku (5.2.) (napr. tri sklené guľôčky), 15 g síranu draselného (4.1.), 1,0 ml roztoku sírnu meďnatého (4.2.), približne 5 g vzorky mlieka (odváženej s presnosťou na najbližšiu 0,001 g) a 25 ml kyseliny sírovej (4.3.). Kyselinou zmyte z hrdla banky všetok roztok síranu meďnatého, síranu draselného alebo mlieko a jemne miešajte obsah banky.

Poznámka: Pretože organická látka v priebehu varu spotrebovávajú kyselinu sírovú, použite na trávenie 30 ml H_2SO_4 namiesto 25 ml, ak mlieko obsahuje viac než 5,0 % (m/m) tuku. Mali by ste to urobiť aj počas slepej skúšky.

- 6.2. Ohrievajte každú Kjeldahlovu banku v prístroji na trávenie (5.5) veľmi mierne, spočiatku tak, aby všetka čierna pena zostala vnútri banky. Keď počiatočné spenenie zmizne a objavia sa výdatné biele výpary, varte intenzívne (výpary kyseliny budú kondenzovať do polovice výšky hrdla banky) dovtedy, kým nezostanú žiadne čierne častice a kým produkt natrávenia nenadobudne číru bledú modro-zelenú farbu. Potom varte mierne najmenej 1,5 hodiny. Zapamätajte si tieto požiadavky:

- a) Doba, za ktorú sa natrávenina stane čírou, by nemala byť dlhšia než jedna hodina a celková doba natravovania nesmie byť kratšia než 2,5 hodiny. Ak je na dosiahnutie čírosti potrebný dlhší čas než jedna hodina, celková doba trávenia sa primerane predlži.
- b) Pridaný síran draselný podporuje natravovanie, pretože zvyšuje teplotu varu zmesi. Ak je zvyškový objem H_2SO_4 na konci doby natravovania menší než približne 15 ml, je možné, že prišlo k strate dusíka v dôsledku nadmerného ohriatia. Ak ohrievate plynom, ohrievajte banku na platni z tepelnoizolačného materiálu s kruhovým otvorom s takým priemerom, aby sa voľný plameň dotýkal iba tej časti banky, ktorá sa nachádza pod povrchom kvapalného obsahu (5.5.).

- c) Ak sa čierne častice dostanú do hrdla banky a nezmyjú sa do banky kyselinou, ktorá cirkuluje v priebehu počiatočných fáz doby intenzívneho varu (je možné uľahčiť to otáčaním banky), nechajte banku dostatočne vychladnúť a opatrne ju omyte minimálnym množstvom vody. Potom pokračujte v trávení vyššie opísaným spôsobom.
- 6.3. Keď sú Kjeldahlove banky chladné, pridajte do každej 300 ml vody (pozri poznámka) tak, aby ste opatrne omyli hrdlo banky a dôkladne premiešajte obsah, čím zabezpečíte rozpustenie kryštálov, ktoré sa oddelili. Pridajte niektorú varnú pomôcku (5.2.), ktorou zabezpečíte rovnomerný var. Potom pridajte do každej banky 70 ml roztoku hydroxidu sodného (4.4.) (pozri poznámka) jemným nalievaním roztoku dolu nakloneným hrdlom banky tak, aby sa v banke vytvorila spodná vrstva; nezamotejte hornú časť hrdla roztokom hydroxidu sodného.
- Poznámka: Je nevyhnutné, aby bol celkový objem vody a hydroxidu sodného 370 ml, aby bolo možné tesne predtým, než príde k nepravidelnému varu („búrlivý var“) (6.4.), nazhromaždiť približne 150 ml destilátu. Takže, ak sa pridá väčší ekvivalentný objem roztoku hydroxidu sodného, ktorého koncentrácia je nižšia než 47 % (m/m), objem pridanej vody sa primerane zmenší. Napríklad, ak sa má pridať 85 ml 40 % (m/m) alebo 125 ml 30 % (m/m) roztoku hydroxidu sodného, objem pridanej vody je 285 ml, resp. 245 ml.*
- 6.4. Ihneď pripojte každú Kjeldahlovu banku k destilačnému prístroju (5.6.). Zabezpečte, aby bol hrot výstupnej trubky z kondenzátora ponorený do 50 ml roztoku kyseliny bóritej (4.5.) spolu s 0,20 ml (5 – 6 kvapiek) indikačného roztoku (4.6.), ktorý je celý obsiahnutý v Erlenmayerovej banke (5.8.). Rýchlym krúžením dôkladne zamiešate obsah každej Kjeldahlovej banky a priveďte ich do varu, ale spočiatku mierneho, aby ste zabránili nadmernému speneniu. Po zachytení 100 až 125 ml destilátu spúšťajte každú Erlenmayerovu banku nadol, kým sa hrot výstupnej trubky z kondenzátora nenachádza približne 40 mm nad značkou 200 ml. Pokračujte v každej destilácii, kým sa nezačne nepravidelný var („búrlivý var“) a potom ihneď prestaňte ohrievať. Odpojte každú Kjeldahlovu banku a opláchnite hrot každej výstupnej trubky z kondenzátora malým množstvom vody, pričom oplachovú vodu zachytávajúte do Erlenmayerovej banky. Zapamätajte si tieto požiadavky:
- a) Rýchlosť destilácie je taká, aby v čase, keď sa začne nepravidelný var („búrlivý var“), bolo nazhromaždených približne 150 ml destilátu, objem obsahu každej Erlenmayerovej banky potom bude približne 200 ml.
- b) Každý kondenzátor by mal mať takú účinnosť, aby teplota obsahu každej Erlenmayerovej banky v priebehu destilácie neprekročila 25 °C.
- 6.5. Titrujte každý destilát štandardným odmerným roztokom (4.7.) dovtedy, kým pH nedosiahne hodnotu $4,6 \pm 0,1$, použite pH meter a podľa potreby automatickú byrety. Pridanie indikačného roztoku pomáha kontrolovať, či titrácia prebieha správne. Odčítajte každú hodnotu z byrety s presnosťou na najbližšiu 0,01 ml pomocou zväčšovacieho skla (5.10.), vyhnite sa tým chybe paralaxy.
- Titráciu možno vykonávať len s indikačným roztokom. Titrujte dovtedy, kým farba destilátu nezodpovedá farbe roztoku obsiahnutého v Erlenmayerovej banke pripraveného pred krátkym časom zo 150 ml vody, do ktorej bolo pridaných 50 ml roztoku kyseliny bóritej a 0,20 ml indikačného roztoku (5.8.).
- 6.6. Vykonajte slepú skúšku postupom podľa bodov 6.1. až 6.5. vrátane s tým, že pri tomto postupe namiesto vzorky mlieka použijete 5 ml destilovanej vody spolu s približne 0,1 g sacharózy (4.8.).
- Poznámka: Titrácia destilátu zo slepej skúšky si bude vyžadovať len veľmi malý objem štandardného odmerného roztoku (4.7.).*
- 6.7. Pravidelne kontrolujte presnosť postupu pomocou dvoch skúšok výťažnosti postupom podľa bodov 6.1. až 6.5. vrátane.
- 6.7.1. Pomocou skúšobného množstva pripraveného z 0,15 g oxalátu amónneho alebo síranu amónneho (4.9.) odváženého s presnosťou na najbližšiu 0,001 g spolu s 0,1 g sacharózy (4.8.) skontrolujte, či v dôsledku nadmerného tepla alebo mechanických únikov v priebehu destilácie nedochádza k strate dusíka.
- Percento výťažnosti dusíka musí byť medzi 99,0 a 100,0 %.
- Nižšie alebo vyššie výsledky budú naznačovať chyby v postupe a/alebo nepresnú koncentráciu štandardného roztoku (4.7.).
- 6.7.2. Pomocou skúšobného množstva pripraveného z 0,20 g čistého tryptofanu, 0,35 g fenacetínu alebo 0,20 g lyzín hydrochloridu (4.10.) skontrolujte, či je postup trávenia dostatočný na to, aby sa ním uvoľnil všetok bielkovinový dusík. Všetky operácie váženia by sa mali vykonávať s presnosťou na najbližšiu 0,001 g. Malo by sa získať najmenej 98 – 99 % dusíka.

7. BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

Pri práci s koncentrovanou kyselinou sírovou a hydroxidom sodným a pri manipuláciách s Kjeldahlovými bankami majte vždy oblečený laboratórny plášť, nasadené bezpečnostné okuliare a kyseline odolné rukavice.

V priebehu destilácie nikdy nenechajte Kjeldahlove banky bez dozoru. Kvôli možnému nebezpečeniu okamžite skončíte s destiláciou, ak obsah banky „búri“ príliš intenzívne. Ak príde k strate napájania trvajúcej viac než dve až tri minúty, spustíte zbernú banku nadol natolko, aby sa destilačný hrot dostal von z kvapaliny.

8. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

8.1. Výpočet a vzorec:

Vypočítajte obsah dusíka (W_N) vyjadrený v gramoch dusíka na 100 g výrobku zo vzorca:

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

kde:

W_N = obsah dusíka.

V = objem štandardného odmerného roztoku kyseliny v mililitroch použitý v priebehu operácie stanovenia.

V_o = objem štandardného odmerného roztoku kyseliny v mililitroch použitý v priebehu slepej skúšky.

c = koncentrácia štandardného odmerného roztoku kyseliny (4.7.) vyjadrená v moloch na liter.

m = hmotnosť skúšobného množstva v gramoch.

Zaokrúhlite výsledok na najbližšiu 0,001 g na 100 g.

8.2. Presnosť

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

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

9. UPRAVENÉ POSTUPY

9.1. Namiesto prístroja na natravovanie a Kjeldahlových baniek opísaných v 5.5 a 5.1 použite blokový prístroj na natravovanie vybavený valcovými bankami. V tomto prípade musí byť kvôli zisteniu možných problémov každá škvŕna skontrolovaná jednotlivo (6.7.).

9.2. Použitie parnej destilácie namiesto priameho ohrevu baniek (6.4.). Ak prístroj neumožňuje použiť destilovanú vodu, mali by ste dať pozor na to, aby voda neobsahovala kyslé alebo alkalické prchavé látky.

9.3. Namiesto 5 g (6.1.) je možné použiť skúšobné množstvo 1 g mlieka (semi-makro Kjeldahlova metóda) za predpokladu, že:

— množstvá činidiel použitých na mineralizáciu (6.1.): H_2SO_4 , $CuSO_4$, 5 H_2O , K_2SO_4 , sa zmenšia v rovnakom pomere (1/5).

— celková doba trávenia (6.2.) sa skráti na 75 minút.

— množstvo roztoku hydroxidu sodného (6.3.) sa zmenší v rovnakom pomere (1/5).

— musí sa použiť štandardný roztok kyseliny (4.7.) s nižšou koncentráciou (0,02 až 0,03 mol/l).

Poznámka: Využitie jednej alebo viacerých z týchto voliteľných možností je prijateľné, len ak sú hodnoty opakovateľnosti (8.2.1.) a výsledky dvoch skúšok presnosti (6.7.) v súlade s požiadavkami stanovenými v tejto metóde.

V. STANOVENIE OBSAHU BIELKOVÍN

1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI

Tento postup určuje referenčnú metódu stanovenia obsahu bielkovín v tepelne ošetrovanom mlieku (článok 3 bod A ods. 3 smernice 85/397/EHS).

2. DEFINÍCIA

Obsah bielkovín: Hodnota získaná vynásobením celkového obsahu dusíka vyjadreného v percentách hmotnosti a stanoveného v súlade s metódou opísanou v oddieli IV bod 3 vhodným koeficientom.

3. VÝPOČET

Obsah bielkovín v mlieku v percentách hmotnosti = 6,38 x celkový obsah dusíka v mlieku v %.

VI. STANOVENIE MERNEJ HMOTNOSTI**1. ROZSAH A OBLASŤ PÔSOBNOSTI**

Tento postup určuje referenčnú metódu stanovenia mernej hmotnosti surového mlieka a plnotučného mlieka, čiastočne odtučneného mlieka a odtučneného mlieka pri teplote 20 °C.

2. DEFINÍCIA

Merná hmotnosť mlieka je pomer hmotnosti určitého objemu mlieka pri teplote 20 °C k hmotnosti rovnakého objemu vody pri teplote 20 °C.

3. PRINCÍP

Merná hmotnosť pri teplote 20 °C sa stanovuje hustomerom.

4. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A LABORATÓRNE SKLO

Obvyklé laboratórne vybavenie a najmä:

4.1. Hustomer

Hydrostatický hustomer je prístroj pozostávajúci zo skleného plaváka, ktorý je na dolnom konci široký a ťažký. K hornému koncu plaváka je súsovo s plavákom pripojená sklená tyčka valcového tvaru, pričom horný a dolný koniec tyčky je uzavretý.

Sklený plavák obsahuje záťaž (olovo, ortuť atď.), ktorej účelom je meniť hmotnosť hustomera. Na tyčke je vyznačená stupnica ciachovaná od 1,025 do 1,035 g/ml.

Hustomer by sa mal kontrolovať pyknometrickou metódou pomocou pyknometra s objemom približne 100 ml vybaveného presným teplomerom.

4.2. Valce (sklené alebo z nerezovej ocele).

Mali by mať minimálne rozmery:

— vnútorný priemer približne 35 mm

— vnútorná výška približne 225 mm.

4.3. Vodný kúpeľ regulovaný na teplotu $20 \pm 0,1$ °C.**4.4. Vodný kúpeľ** regulovaný na teplotu 40 ± 2 °C.**4.5. Teplomer** ciachovaný po 0,5 °C.**5. POSTUP**

5.1. Premiešajte vzorku preklápaním nádoby, aby sa tuk rozptýlil a vložte ju do vodného kúpeľa (4.4.). Nechajte vzorku ohriať na teplotu 40 °C a udržiavajte túto teplotu päť minút. Dôkladne premiešajte opatrným preklápaním nádoby a zabezpečte homogénne rozloženie tuku. Ochlaďte v druhom vodnom kúpeli (4.3.) na 20 °C.

5.2. Vzorku opatrným preklápaním dôkladne premiešajte a pritom dajte pozor, aby do nej nevnikol vzduch. Vylejte mlieko do valca (4.2.), ktorý držte naklonený, čím sa vyhnete tvorbe peny alebo bublín. Použite dostatočné množstvo vzorky tak, aby ste zabezpečili, že po vložení hustomeru (4.1.) do valca trocha mlieka z valca vytečie. Opatrne zatlačte hustomer do mlieka, a keď dosiahne rovnovážnu polohu, nechajte ho voľne plávať. Postavte valec do zvislej polohy. Hustomer musí byť umiestnený v strede stĺpca kvapaliny a nemal by sa dotýkať stien valca.

5.3. Keď hustomer dosiahne rovnovážny stav, odčítajte hodnotu na stupnici na hornej časti menisku.

5.4. Ihneď po odčítaní hodnoty na hustomere vložte do vzorky teplomer (4.5.) a odčítajte teplotu s presnosťou na 0,5 °C. Teplota sa nesmie odlišovať od 20 °C o viac než ± 2 °C.

6. KOREKCIA NA TEPLOTU

6.1. Ak teplota vzorky mlieka počas merania jeho mernej hmotnosti nie je presne 20 °C, výsledok sa musí skorigovať pričítaním hodnoty 0,0002 k stanovenej mernej hmotnosti za každý stupeň Celzia nad hodnotou 20 °C alebo odčítaním hodnoty 0,0002 od stanovenej mernej hmotnosti za každý stupeň Celzia pod hodnotou 20 °C. Táto korekcia je platná len vtedy, ak sa teplota vzorky mlieka nelíši od 20 °C o viac než 5 °C.

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Metóda výpočtu a vzorec na výpočet mernej hmotnosti vzorky je vyjadrený v g/ml odtučeného mlieka pri teplote 20 °C; vzorec vyzerá takto:

$$\frac{1\,000 \times mv - MG \times mv}{1\,000 - \frac{MG \times mv}{0,92}} = \frac{0,92\, mv (1\,000 - MG)}{920 - MG \times mv}$$

kde

mv = merná hmotnosť vzorky odčítaná na hustomere (5.4.) v g/l

MG = obsah tuku vo vzorke v g/l

0,92 = hustota tuku.

8. PRESNOSŤ

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

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

Dodatok

(k prílohe II)

ALTERNATÍVNY POSTUP VYUŽÍVAJÚCI SKÚMAVKY NA EXTRACIU TUKU S VLOŽKOU S KVAPALINOVÝM UZÁVEROM ALEBO S VLOŽKOU OD PREMÝVACEJ FIAŠE**A.1. POSTUP****A.1.1. Príprava skúšobnej vzorky**

Pozri 6.1.

A.1.2. Skúšobné množstvo

Postupujte spôsobom opísaným v bode 6.2., ale použite skúmavky na extrakciu tuku (pozri 5.6.).

Skúšobné množstvo musí čo najdokonalejšie stiecť do spodnej časti extrakčnej skúmavky.

A.1.3. Slepá skúška

Pozri 6.3.

A.1.4. Príprava zbernej nádoby tuku

Pozri 6.4.

A.1.5. Stanovenie obsahu

A.1.5.1. Pridajte 2 ml roztoku amoniaku (4.1.) alebo rovnocenný objem roztoku amoniaku s vyššou koncentráciou a dôkladne ho zmiešajte s predbežne ošetrovaným skúšobným množstvom v spodnej časti skúmavky. Po pridaní amoniaku bezodkladne vykonajte postup stanovenia obsahu.

A.1.5.2. Pridajte 10 ml etanolu (4.2.) a jemne ale dôkladne ho zmiešajte so zmesou v spodnej časti skúmavky. V prípade potreby pridajte dve kvapky roztoku konžskej červenej alebo krezolovej červenej (4.3.).

A.1.5.3. Pridajte 25 ml dietyléru (4.4.), uzavrite skúmavku korkovou zátkou nasýtenou vodou alebo inou zátkou navlhčenou vo vode (pozri 5.6.) a traste skúmavkou silno, ale nie príliš silno (aby ste zabránili tvorbe stálych emulzií), jednu minútu, pričom skúmavku opakovane prekláľajte. Skúmavku podľa potreby ochlaďte tečúcou vodou, potom opatrne vyberte korkovú zátku alebo inú zátku a opláchnite ju a hrdlo skúmavky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla (4.6.) pomocou premývacej fľaše (5.8.) tak, aby oplachová kvapalina stekala do skúmavky.

A.1.5.4. Pridajte 25 ml petroléru (4.5.), uzavrite skúmavku znovu navlhčenou korkovou zátkou alebo inou zátkou (navlhčite ju znovu ponorením do vody) a 30 sekúnd jemne traste skúmavkou tak, ako je opísané v A.1.5.3.

A.1.5.5. Odstreďujte uzavretú skúmavku v odstredivke jednu až päť minút pri rotačnej frekvencii 500 až 600 otáčok za minútu (5.2.). Ak odstredivku nemáte k dispozícii (pozri poznámku k bodu 5.2.), nechajte uzavretú skúmavku najmenej 30 minút stáť v stojane (5.7.), kým povrchová vrstva nie je číra a jasne oddelená od vodnej vrstvy. Podľa potreby ochlaďte skúmavku tečúcou vodou.

A.1.5.6. Opatrne vyberte korkovú zátku alebo inú zátku a opláchnite ju a hrdlo skúmavky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla tak, aby oplachová kvapalina stekala do skúmavky.

A.1.5.7. Zasuňte do skúmavky vložku s kvapalinovým uzáverom alebo vložku od premývacej fľaše a zatlačajte dlhý vnútorný limbus vložky nadol dovtedy, kým sa vstup nenachádza približne 3 mm nad rozhraním medzi vrstvami. Vnútorný limbus vložky je rovnobežný s osou extrakčnej skúmavky.

Opatrne zlejte povrchovú vrstvu zo skúmavky do pripravenej zbernej nádoby na tuk (6.4.), ktorá v prípade baniek obsahuje niekoľko varných pomôcok (5.10.) (v prípade kovových nádob sú varné pomôcky nepovinné), pritom dajte pozor, aby ste nezliali nič z vodnej vrstvy. Opláchnite výstup z vložky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla a oplachovú kvapalinu zberajte do zbernej nádoby na tuk.

A.1.5.8. Uvoľnite vložku od hrdla skúmavky, vložku trochu nadvihnite a opláchnite spodnú časť jej dlhého vnútorného limbu malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla. Spustite vložku, znovu ju zasuňte a prelejte oplachovú kvapalinu do zbernej nádoby na tuk.

Opláchnite výstup z vložky malým množstvom zmiešaného rozpúšťadla a oplachovú kvapalinu zberajte do nádoby. V prípade potreby môžete rozpúšťadlo alebo jeho časť odstrániť z nádoby destiláciou alebo odparením tak, ako je opísané v bode 6.5.12.

- A.1.5.9. Opäť uvoľnite vložku od hrdla, trochu ju nadvihnite a pridajte k obsahu skúmavky 5 ml etanolu, pričom etanol využite na opláchnutie dlhého vnútorného limbu vložky a zamiešajte spôsobom opísaným v bode A.1.5.2.
- A.1.5.10. Opakovaním operácií opísaných v bodoch A.1.5.3. až A.1.5.8. vykonajte *druhá extrakciu*, ale použite len 15 ml dietyléteru (4.4.) a 15 ml petroléteru (4.5.). Na opláchnutie dlhého vnútorného limbu vložky počas vyberania vložky zo skúmavky po predchádzajúcej extrakcii použite éter.
- A.1.5.11. Ďalším opakovaním operácií opísaných v bodoch A.1.5.3. až A.1.5.8. vrátane vykonajte *tretiu extrakciu*, ale použite len 15 ml dietyléteru a 15 ml petroléteru a opláchnite dlhý vnútorný limbus vložky spôsobom opísaným v bode A 1.5.10.
- V prípade odtučneného mlieka je možné tretiu extrakciu vynechať.*
- A.1.5.12. Postupujte spôsobom opísaným v bodoch 6.5.12 až 6.5.16.
-