

31992D0608

31.12.1992

JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE

L 407/29

DECIZIA CONSILIULUI
din 14 noiembrie 1992
privind stabilirea anumitor metode de analiză și testare a laptelui tratat termic destinat consumului uman direct

(92/608/CEE)

CONSILIUL COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva 85/397/CEE a Consiliului din 5 august 1985 privind problemele de sănătate publică și animală în cadrul comerțului intracomunitar cu lapte tratat termic ⁽¹⁾, în special articolul 11 alineatul (6),

având în vedere propunerea Comisiei,

întrucât, potrivit articolului 11 alineatul (6) din Directiva 85/397/CEE, Consiliul stabilește în detaliu modalitățile de efectuare a inspecției prevăzute la alineatul (2) al respectivului articol; întrucât această inspecție, care trebuie să fie efectuată de către exploatații, sub supravegherea și răspunderea serviciului oficial, precum și sub controlul periodic al acestuia, are scopul de a asigura respectarea dispozițiilor Directivei 85/397/CEE, în special a celor prevăzute la articolul 3 litera A punctul 3;

întrucât stabilirea modalităților de control cuprinde stabilirea metodelor necesare pentru punerea lor în aplicare;

întrucât, în cazul laptelui tratat termic, destinat consumului uman direct, se impune stabilirea metodelor care să permită determinarea substanței uscate, a conținutului de substanțe grase, a conținutului de substanțe uscate degresate, a conținutului în azot total, a conținutului de proteine și a masei volumice;

întrucât, din considerente tehnice, într-o primă fază se impune stabilirea unor metode de referință în materie de analiză și testare, vizând asigurarea respectării normelor prevăzute de articolul 3 litera A punctul 3 din Directiva 85/397/CEE; întrucât se impune în special continuarea examinării condițiilor de utilizare a metodelor de rutină, de analiză și de testare; întrucât, în așteptarea rezultatului acestei examinări, autorităților competente le revine îndatorirea de a veghea la utilizarea metodelor de rutină corespunzătoare scopului de a respecta normele menționate anterior;

întrucât determinarea metodelor menționate anterior cuprinde în special determinarea procedeelelor de analiză și stabilirea criteriilor de fidelitate, în scopul asigurării unei interpretări uniforme a rezultatelor,

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

Articolul 1

Metodele de analiză și de testare a laptelui tratat termic destinat consumului uman direct sunt următoarele:

- determinarea substanței uscate;
- determinarea conținutului de substanțe grase;
- determinarea conținutului de substanțe uscate degresate;
- determinarea conținutului în azot total;
- determinarea conținutului de proteine;
- determinarea masei volumice.

⁽¹⁾ JO 226, 24.8.1985, p. 13, astfel cum a fost modificată ultima dată prin Directiva 89/662/CEE (JO L 395, 30.12.1989, p. 13).

Articolul 2

Punerea în aplicare a metodelor de referință de analiză și testare, stabilirea criteriilor de fidelitate, precum și colectarea eşantioanelor trebuie să fie efectuate în conformitate cu regulile stabilite în anexa I.

Articolul 3

Metodele menționate la articolul 1 sunt descrise în anexa II.

Articolul 4

Prezenta decizie se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 14 noiembrie 1992.

Pentru Consiliu

Președintele

J. GUMMER

ANEXA I

- I. **DISPOZIȚII GENERALE**
1. **INTRODUCERE**

Dispozițiile generale se referă la reactivi, la material, la exprimarea rezultatelor, la criteriile de fidelitate, precum și la raportul analizei. Autoritățile competente ale statelor membre și laboratoarele însărcinate cu eșantionarea și efectuarea analizelor asupra laptelui trebuie să respecte aceste dispoziții.
2. **REACTIVI**
- 2.1. **Apa**
- 2.1.1. Dacă nu există alte indicații, apa folosită pentru operațiunile de dizolvare, diluare sau clătire trebuie să fie în mod obligatoriu apă distilată, apă deionizată sau apă mineralizată de puritate cel puțin echivalentă.
- 2.1.2. Prin „soluție” sau „diluare” (fără alte precizări) se înțelege „soluție în apă” sau „diluare cu apă”.
- 2.2. **Produse chimice**

Dacă nu există alte indicații, toate produsele chimice utilizate trebuie să fie de o calitate analitică recunoscută.
3. **MATERIALE**
- 3.1. **Lista materialelor**

Lista materialelor menționate la diferitele metode de referință are în vedere doar obiectele cu uz specific și care prezintă caracteristici particulare.
- 3.2. **Balanța analitică**

Prin „balanță analitică” se înțelege o balanță care poate cântări cu o precizie de 0,1 mg.
4. **EXPRIMAREA REZULTATELOR**
- 4.1. **Rezultatele**

Dacă nu există alte indicații, rezultatul care figurează în raportul analizei (punctul 6) trebuie să fie media aritmetică a două teste, respectând criteriul repetabilității (punctul 5.1.1) stabilit pentru metoda respectivă. În cazul în care criteriul repetabilității nu este respectat, testul trebuie repetat; dacă acest lucru nu e posibil, rezultatul trebuie anulat.
- 4.2. **Calcularea procentajului**

Dacă nu există alte indicații, rezultatul se calculează în procente de masă a eșantionului.
5. **CRITERII DE FIDELITATE: REPETABILITATE ȘI REPRODUCTIBILITATE**
- 5.1. Criteriile de fidelitate care figurează la fiecare metodă sunt definite după cum urmează:
- 5.1.1. *Repetabilitatea (r)* reprezintă valoarea sub care se situează valoarea absolută a diferenței dintre două rezultate individuale obținute prin același procedeu, pe un produs identic, în aceleași condiții (același analist, aceeași aparatură, același laborator și interval de timp scurt).
- 5.1.2. *Reproductibilitatea (R)* este valoarea sub care se situează valoarea absolută a diferenței dintre două rezultate individuale obținute prin același procedeu, pe un produs identic, în condiții diferite (analiști diferiți, aparaturi diferite, laboratoare diferite și/sau intervale de timp diferite).
- 5.1.3. Dacă nu există alte indicații privind oricare dintre metodele aplicate, valorile repetabilității și reproductibilității sunt exprimate la un nivel de probabilitate de 95 %, conform normei ISO 5725: ediția a doua, 1986.
- 5.1.4. Testele inelare și studiile necesare trebuie planificate și realizate conform orientărilor internaționale.
6. **RAPORTUL ANALIZEI**

Raportul analizei trebuie să precizeze procedeu utilizat și rezultatele obținute. În plus, el trebuie să menționeze toate detaliile de operare care nu sunt specificate în metoda de analiză, toate detaliile facultative, precum și toate circumstanțele care ar fi putut influența rezultatele. Raportul analizei trebuie să conțină toate informațiile care să permită identificarea completă a eșantionului.

II. EȘANTIONAREA LAPTELUI TRATAT TERMIC

1. OBIECT ȘI DOMENIU DE APLICARE

Prezentul capitol descrie metoda de referință aplicabilă la colectarea, transportul și conservarea eșantioanelor de lapte tratat termic.

2. CONSIDERAȚII DE ORDIN GENERAL

Eșantionarea laptelui tratat termic (păstrat în cisterne) trebuie să fie efectuată de către o persoană autorizată, care a beneficiat de o formație adecvată înainte de a proceda la colectarea probelor.

În cazurile în care consideră că este necesar, autoritățile competente sau laboratorul care efectuează analizele instruesc personalul care urmează să efectueze eșantionarea asupra tehnicilor eșantionării, astfel încât eșantionul colectat să fie într-adevăr reprezentativ și conform cu întregul lot.

În cazurile în care consideră că este necesar, autoritățile competente sau laboratorul care efectuează analizele instruesc personalul însărcinat cu eșantionarea în ceea ce privește etichetarea eșantioanelor, astfel încât identificarea eșantionului să fie incontestabilă.

3. ECHIPAMENTUL DESTINAT EȘANTIONĂRII

3.1. Generalități

Echipamentul necesar eșantionării nu numai că trebuie să fie fabricat din oțel inoxidabil sau din orice alt material adecvat de rezistență corespunzătoare, ci, prin construcție, trebuie să corespundă utilizării specifice căreia îi este destinat (omogenizare, eșantionare etc.). Plonjoarele și agitatoarele destinate omogenizării lichidelor în recipiente trebuie să aibă o suprafață suficientă pentru a permite o omogenizare adecvată a produsului, fără însă a duce la apariția gustului de ranced. Fiecare polonic trebuie să fie prevăzut cu un mâner solid, destul de lung pentru a se putea colecta probe de la orice adâncime a recipientului. Capacitatea polonicului trebuie să fie de cel puțin 50 ml.

Recipientele pentru eșantioane și capacele trebuie să fie din sticlă, metal sau material plastic adecvat.

Materialele utilizate la fabricarea echipamentului care va fi folosit pentru eșantionare (recipientele și capacele lor) nu trebuie să producă nici o modificare a eșantionului, care ar putea influența rezultatul analizei. Echipamentul, precum și recipientele destinate păstrării eșantioanelor trebuie să aibă o suprafață curată, uscată, netedă și fără fisuri, iar colțurile trebuie să fie rotunjite.

4. PROCEDEUL DE EȘANTIONARE

4.1. Generalități

Oricare ar fi natura analizei de efectuat, înainte de recoltare, laptele trebuie omogenizat în mod corespunzător, manual sau cu un mijloc mecanic.

Eșantionul este recoltat imediat după omogenizare când laptele este încă în mișcare.

Volumul eșantionului trebuie să corespundă necesităților analizei. Capacitatea recipientelor utilizate trebuie să fie aleasă astfel încât recipientele să fie aproape umplute de eșantion, permițând totuși o omogenizare adecvată înainte de efectuarea analizei, dar evitând în același timp smântânirea în timpul transportului.

4.2. Eșantionare manuală

4.2.1. Eșantionarea unui lot divizat

În cazul în care cantitatea de lapte din care trebuie recoltat eșantionul este repartizată în mai multe recipiente, se recoltează o cantitate reprezentativă din fiecare recipient și se notează cantitatea de lapte căreia îi corespunde eșantionul recoltat. În afara cazului în care fiecare eșantion trebuie supus unei analize separate, se omogenizează părți din aceste cantități reprezentative, proporțional cu cantitatea din recipientul din care a fost recoltat fiecare eșantion. După omogenizare se prelevează una (sau mai multe) probe din aceste cantități proporționale.

4.2.2. Recoltare din recipiente mari – cuve de stocare, autocisterne și vagoane-cisternă

4.2.2.1. Se omogenizează laptele printr-un procedeu adecvat, înainte de recoltarea eșantioanelor.

Pentru omogenizarea conținutului recipientelor mari – cuve de stocare, autocisterne și vagoane-cisternă, se recomandă agitarea mecanică (punctul 4.2.2.2).

Durata omogenizării depinde de lungimea intervalului de timp în care laptele a rămas nemișcat. Trebuie demonstrat faptul că procedeul de omogenizare folosit în fiecare caz particular este adecvat tipului de analiză preconizată; eficacitatea omogenizării influențează în mod considerabil similitudinea rezultatelor analizelor efectuate asupra unor eșantioane recoltate fie din părți diferite ale lotului, fie la gura de evacuare a cuvei, la intervale de timp regulate, în timpul golirii acesteia. Procedeul de omogenizare a laptelui (crud sau integral) a fost eficient dacă diferența dintre conținutul de substanțe grase a două probe, prelevate în condițiile descrise anterior, este sub 0,1 %.

Într-un recipient mare, prevăzut cu o gură de evacuare pe partea inferioară, poate să se adune, în momentul evacuării, o cantitate mică de lapte nereprezentativă pentru ansamblu, chiar și după omogenizare. Din această cauză, este de preferat colectarea eșantioanelor printr-o gură de acces. Dacă recoltarea se face printr-o gură de evacuare, trebuie lăsată să se scurgă o cantitate de lapte suficientă pentru a asigura caracterul reprezentativ al eșantionului.

4.2.2.2. Omogenizarea conținutului recipientelor mari sau al cuvelor de stocare, al autocisternelor sau al vagoanelor-cisternă se poate efectua în felul următor:

- cu ajutorul unui agitator mecanic amplasat în rezervor și acționat de un motor electric;
- cu ajutorul unei elice sau al unui agitator acționat de un motor electric și amplasat în gura de acces, agitatorul fiind suspendat în lapte;
- în cazul autocisternelor și al vagoanelor-cisternă, prin reciclarea laptelui în tubul flexibil de transfer legat de pompă și introdus în gura de acces;
- cu ajutorul aerului comprimat filtrat și curat. Se vor utiliza o presiune și un volum minim de aer, pentru a evita apariția gustului de ranced al laptelui.

4.3. **Eșantionarea laptelui tratat termic destinat consumului uman direct și ambalat pentru vânzarea cu amănuntul**

În ceea ce privește laptele tratat termic destinat consumului uman direct și ambalat pentru vânzarea în detaliu, eșantioanele trebuie neapărat să provină din recipiente intacte și nedeschise. Dacă este posibil, eșantioanele sunt recoltate direct de la mașina de ambalare sau în camera frigorifică a unității de tratare, cât se poate de repede după tratare (în cazul laptelui pasteurizat, în aceeași zi).

Numărul de eșantioane prelevate din fiecare tip de lapte tratat termic (pasteurizat, prelucrat „la temperaturi ultraînalte”, sterilizat) trebuie să corespundă numărului de analize care urmează a fi efectuate și conform indicațiilor date de laboratorul însărcinat cu efectuarea analizei sau de o altă autoritate competentă.

5. IDENTIFICAREA EȘANTIONULUI

Eșantionul trebuie să primească un cod de identificare care să permită identificarea sa rapidă, potrivit indicațiilor date de laboratorul care efectuează analiza sau de o altă autoritate competentă.

6. TRATAREA, TRANSPORTUL ȘI STOCAREA EȘANTIOANELOR

În acord cu autoritatea națională competentă, laboratoarele care efectuează analizele elaborează instrucțiunile privind durata și condițiile de tratare (chimică sau termică), transport și stocare, care trebuie respectate de la recoltarea eșantioanelor și până la analizarea lor, în funcție de tipul de lapte și de procedul de analiză.

Instrucțiunile vor stipula următoarele:

- în timpul transportului și stocării se iau măsuri de precauție pentru protejarea eșantionului de orice miros indezirabil și de lumina directă a soarelui. Dacă recipientul utilizat pentru păstrarea eșantionului este transparent, el este păstrat la adăpost de lumină.

ANEXA II

I. DETERMINAREA SUBSTANȚEI USCATE

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Capitolul de față descrie metoda de referință pentru determinarea conținutului de substanță uscată din lapte.

2. DEFINIȚIE

„Substanța uscată” reprezintă masa exprimată în procente de masă, care rămâne după uscarea completă descrisă în cele ce urmează.

3. PRINCIPIU

Evaporarea apei din probă într-o etuvă, la o temperatură de 102 ± 2 °C.

4. APARATURĂ ȘI STICLĂRIE DE LABORATOR

Material obișnuit de laborator, în special:

4.1. **Balanță analitică**4.2. **Exsicator**, dotat cu un deshidratant eficient (de exemplu gel de silice uscat recent, cu indicator higrometric).4.3. **Etuvă** ventilată, reglabilă prin termostat pentru a opera în întreg spațiul de lucru la 102 ± 2 °C.4.4. **Capsule cu fund plat** având o înălțime cuprinsă între 20 și 25 mm, cu diametru între 50 și 75 mm, fabricate din material adecvat, dotate cu capace potrivite și ușor de desfăcut.4.5. **Baie de apă clocotită**4.6. **Omogenizator**

5. PREGĂTIREA EȘANTIONULUI PENTRU TEST

Se aduce eșantionul de lapte la o temperatură între 20–25 °C. Se omogenizează cu grijă, pentru a se obține o repartizare omogenă a substanțelor grase în interiorul eșantionului. A nu se agita prea puternic, pentru a se evita formarea unei spume sau smântânirea. Dacă stratul de smântână se îndepărtează greu, se aduce treptat laptele la temperaturi între 35–40 °C, amestecând cu grijă, pentru a încorpora smântâna care s-a lipit de perețele recipientului. După aceasta, se răcește rapid eșantionul la 20–25 °C.

Se poate folosi eventual un omogenizator pentru a dispersa mai ușor substanțele grase din lapte.

Rezultatele sunt incorecte dacă eșantionul conține substanțe grase lichide vizibile sau dacă apar particule albe, neregulate, care se lipesc de pereții recipientului.

6. MODUL DE OPERARE

6.1. **Pregătirea capsulei**

Se încălzește capsula (punctul 4.4), cu capacul alături, în etuvă (punctul 4.3), menținută la 102 ± 2 °C timp de cel puțin 30 de minute. Se așează capacul pe capsulă și se plasează imediat în exsicator (punctul 4.2). Se lasă să se răcească la temperatura ambiantă (cel puțin 30 de minute) și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg.

6.2. **Prelevarea probei**

În capsula pregătită (punctul 6.1) se cântăresc rapid, cu o precizie de 0,1 mg, 3–5 mg din eșantion pentru testare (punctul 5).

6.3. **Determinarea substanței uscate**

6.3.1. Se usucă în prealabil capsula prin plasarea ei pe baie de apă; se menține în fierbere timp de 30 de minute (punctul 4.5).

- 6.3.2. Se plasează capsula cu capacul alături în etuvă (punctul 4.3), menținută la 102 ± 2 °C timp de două ore. Se pune capacul pe capsulă și se scoate din etuvă.
- 6.3.3. Se lasă să se răcească în excicator (punctul 4.2) la temperatura ambiantă (cel puțin 30 de minute) și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg.
- 6.3.4. Se plasează din nou capsula, cu capacul alături, în etuvă, timp de o oră. Se așează capacul pe capsulă și se scoate din etuvă. Se lasă să se răcească timp de aproximativ 30 de minute în excicator și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg.
- 6.3.5. Se repetă operațiunile descrise la punctul 6.3.4 până când diferența de masă dintre cele două cântăriri succesive nu depășește 0,5 mg. Se notează masa cea mai mică.

7. EXPRIMAREA REZULTATELOR

7.1. Calcul și formulă

Se calculează substanța uscată în procente de masă după formula:

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

unde:

W_T = substanța uscată din 100 g (în g)

m_0 = masa în grame a capsulei și a capacului (punctul 6.1)

m_1 = masa în grame a capsulei, a capacului și a probei (punctul 6.2)

m_2 = masa în grame a capsulei, a capacului și a probei uscate (punctul 6.3.5).

Se rotunjește valoarea obținută la 0,01 % (procente de masă).

7.2. Fidelitate

7.2.1. *Repetabilitate (r)*: 0,10 g de substanță uscată la 100 g de produs.

7.2.2. *Reproductibilitate (R)*: 0,20 g de substanță uscată la 100 g de produs.

II. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE SUBSTANȚE GRASE

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Capitolul de față descrie metoda de referință pentru determinarea conținutului de substanțe grase din laptele integral, parțial degresat și degresat.

2. DEFINIȚIE

„Conținutul de substanțe grase al laptelui” reprezintă toate substanțele determinate prin procedeul descris în continuare. Este exprimat în procente de masă.

3. PRINCIPIU

Extragerea unei soluții amoniaco-etanolice dintr-o probă, cu ajutorul oxidului dietilic și al eterului de petrol, eliminarea solvenților prin distilare sau evaporare, apoi determinarea masei substanțelor extrase solubile în eter de petrol (metodă cunoscută în general sub numele de Roese-Gottlieb).

4. REACTIVI

Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică recunoscută și nu trebuie să lase reziduuri semnificative la proba martor.

Pentru a verifica calitatea reactivilor, se face determinarea descrisă la punctul 6.3. Pentru cântărire se folosesc un balon, un pahar de laborator sau o capsulă metalică goală (punctul 5.8), pregătite ca tara după indicațiile de la punctul 6.4 (pentru a se putea corecta influența modificărilor condițiilor atmosferice asupra rezultatului cântăririi). Dacă reziduul global, corectat în funcție de modificările survenite în masa tarei, este mai mare de 2,5 mg, se determină reziduul solvenților, evaporându-se 100 ml de oxid dietilic (punctul 4.4) și respectiv 100 ml de eter de petrol (punctul 4.5). Se utilizează și o tara pentru cântărire. Dacă reziduul este mai mare de 2,5 mg, se curăță solventul prin distilare sau se înlocuiește.

4.1. **Hidroxidul de amoniu** reprezintă o soluție de aproximativ 25 % (m/m) NH_3 . Poate fi folosită și o soluție de hidroxid de amoniu mai concentrată (punctele 6.5.1 și A.1.5.1.)

- 4.2. **Etanol**, cel puțin 94 % (v/v). Se poate folosi etanol denaturat prin metanol, dacă există certitudinea că acest lucru nu modifică cu nimic rezultatele determinării.
- 4.3. **Roșu de Congo sau roșu de crezol**
Se dizolvă 1 g de roșu de Congo sau roșu de crezol în apă și se diluează la 100 ml.
Notă: Folosirea acestei soluții, care permite o mai bună observare a suprafeței de contact dintre solvent și stratul apos, este facultativă (punctul 6.5.2). Se pot folosi și alte soluții apoase de coloranți, dacă ele nu modifică rezultatele determinării.
- 4.4. **Oxidul dietilic** lipsit de peroxizi, cu conținut de antioxidanți mai mic de 2 mg/kg și conform cerințelor pentru proba martor (punctul 6.3).
- 4.5. **Eter de petrol** cu un punct de fierbere între 30–60 °C.
- 4.6. **Amestec de solvenți** preparat cu puțin timp înainte de utilizare, prin amestecarea unor volume egale de oxid dietilic (punctul 4.4) și de eter de petrol (punctul 4.5).
5. **APARATURĂ ȘI STICLĂRIE DE LABORATOR**
Avertisment: Având în vedere că în procesul determinării substanțelor se folosesc solvenți volatili inflamabili, aparatura electrică folosită trebuie să fie conformă legislației cu privire la utilizarea acestui tip de solvenți.
Material obișnuit, în special:
- 5.1. **Balanță analitică**
- 5.2. **Centrifugă** în care baloanele sau tuburile de extracție (punctul 5.6) pot fi supuse unei viteze de rotație de 500–600 rot/min⁻¹, astfel încât să se producă un câmp gravitațional de 80–90 g la extremitățile exterioare ale baloanelor sau tuburilor.
Notă: Folosirea centrifugii este facultativă (punctul 6.5.5).
- 5.3. **Aparate de distilare sau de evaporare** care să permită distilarea solvenților și a etanolului din baloane sau evaporarea lor din paharele de laborator sau din capsule (punctul 6.5.12 și punctul 6.5.15), la o temperatură care să nu depășească 100 °C.
- 5.4. **Etuvă** cu sistem de încălzire electric, dotată cu găuri de ventilație deschise complet, reglabile la o temperatură de 102 ± 2 °C în spațiul de lucru. Etuva trebuie să fie dotată cu un termometru adecvat.
- 5.5. **Baie de apă** reglabilă la o temperatură cuprinsă între 35–40 °C.
- 5.6. *Baloane de extracție a substanțelor grase de tip Molonnier*
Notă: Se pot folosi și tuburi de extracție a substanțelor grase dotate cu un sifon sau un dispozitiv de spălare; modul lor de operare, diferit în acest caz, este descris în apendice.
Baloanele (sau tuburile) trebuie să fie prevăzute cu dopuri din sticlă mată, din plută de calitate superioară sau dintr-un alt material care nu va fi alterat de reacții utilizate. Dopurile din plută trebuie să fie spălate cu oxid dietilic (punctul 4.4), ținute în apă la o temperatură de 60 °C sau mai mult, timp de cel puțin 15 minute și răcite apoi în apă, astfel încât, în momentul folosirii lor, să fie îmbibate cu apă.
- 5.7. **Stativ** pentru fixarea baloanelor (sau a tuburilor) de extracție a substanțelor grase (punctul 5.6).
- 5.8. **Flacon de spălare** adecvat amestecului de solvenți (punctul 4.6). A nu se utiliza flacoane de spălat din plastic.
- 5.9. **Recipiente pentru recuperarea substanțelor grase**, de exemplu baloane pentru fierbere (baloane cu fund plat) sau baloane Erlenmeyer cu o capacitate între 125–250 ml sau capsule metalice. Dacă se folosesc capsule metalice, ele trebuie, de preferință, să fie fabricate din oțel inoxidabil, să aibă fund plat, un cioc, diametrul între 80–100 mm și înălțimea de aproximativ 50 mm.
- 5.10. **Regulatori de fierbere**, lipsiți de substanțe grase, din porțelan neporos, carbură de siliciu sau bile de sticlă (uz facultativ în cazul capsulelor metalice).
- 5.11. **Cilindri gradați** cu o capacitate de 5 și de 25 ml.
- 5.12. **Pipete gradate** cu o capacitate de 10 ml.
- 5.13. **Clește metalic** pentru manipularea baloanelor, paharelor de laborator și a capsulelor.

6. MOD DE OPERARE

Notă: Celălalt mod de operare, cu ajutorul tuburilor de extracție a substanțelor grase dotate cu un sifon sau cu un dispozitiv de spălare (vezi nota de la punctul 5.6), este descris în apendice.

6.1. Prepararea eșantionului pentru test

Se aduce eșantionul destinat testului la o temperatură între aproximativ 35 și 40 °C, timp de aproximativ 15 minute, utilizându-se, dacă este necesar, baia de apă (punctul 5.5). Se omogenizează îndeajuns, dar cu grijă eșantionul, întorcându-se recipientul de câteva ori, fără a se provoca însă formarea spumei sau a smântâni și se răcește rapid la aproximativ 20 °C.

6.2. Prelevarea probei

Se omogenizează eșantionul (punctul 6.1) întorcându-se cu grijă recipientul de trei sau patru ori și se cântăresc imediat, cu o precizie de 1 mg, 10–11 g din eșantion pentru test, în mod direct sau prin diferență, într-un balon de extracție (punctul 5.6).

Proba prelevată pentru efectuarea testului este plasată cât se poate de complet în bulbul inferior (strâmt) al balonului de extracție.

6.3. Proba martor

Se efectuează o probă martor în același timp cu testul de determinare, utilizându-se același mod de operare și aceiași reactivi, dar înlocuindu-se proba cu 10–11 ml de apă.

Modificarea masei recipientului de recuperare a substanțelor grase, corectată de modificarea masei recipientului de control, nu are voie să depășească 2,5 g.

6.4. Pregătirea recipientului pentru recuperarea substanțelor grase

Se usucă un recipient (punctul 5.9), în care s-au plasat câțiva regulatori de fierbere (punctul 5.10), pentru a permite o fierbere moderată în cursul eliberării ulterioare de solvenți în etuvă (punctul 5.4), timp de o oră. Se lasă să se răcească recipientul (nu într-un exicator, dar la adăpost de praf) la temperatura încăperii în care se efectuează cântărirea, (timp de cel puțin o oră în cazul recipientelor din sticlă și timp de cel puțin 30 de minute în cazul capsulelor metalice). Cu ajutorul cleștelui (în special pentru a evita diferențele de temperatură) se așează recipientul pe balanță și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg.

6.5. Determinarea

6.5.1. Se adaugă 2 ml de soluție de hidroxid de amoniu (punctul 4.1) sau un volum echivalent dintr-o soluție mai concentrată și se amestecă puternic cu proba aflată în bulbul îngust al balonului. După adăugarea hidroxidului de amoniu se face imediat determinarea.

6.5.2. Se adaugă 10 ml de etanol (punctul 4.2) și se amestecă cu grijă, dar îndeajuns, determinând conținutul balonului să curgă dintr-o extremitate a acestuia în cealaltă, evitându-se totodată apropierea lichidului de gâtul balonului. Se pot adăuga eventual două picături de roșu de Congo sau de roșu de crezol (punctul 4.3).

6.5.3. Se adaugă 25 de ml de oxid dietilic (punctul 4.4), se astupă balonul cu un dop de plută saturat cu apă sau cu un dop umezit cu apă (punctul 5.6), se agită balonul puternic, dar fără a exagera (pentru a evita formarea emulsiilor persistente) timp de un minut, în poziție orizontală, cu bulbul îngust în sus. Din când în când, se lasă lichidul să curgă din bulbul mare în cel îngust. Dacă este necesar, se răcește balonul cu apă curentă și apoi se îndepărtează cu grijă dopul de plută sau dispozitivul de închidere și se clătește, ca și gâtul balonului, cu o mică cantitate de amestec de solvenți (punctul 4.6), utilizându-se un flacon de spălare (punctul 5.8), astfel încât lichidele de clătire să curgă în balon.

6.5.4. Se adaugă 25 ml de eter de petrol (punctul 4.5), se astupă balonul cu dopul de plută reumezit (prin îmbibare în apă) sau cu un alt dispozitiv de închidere și se agită cu grijă, timp de 30 de secunde, după indicațiile de la punctul 6.5.3.

6.5.5. Balonul astupat se pune în centrifugă, timp de 1–5 minute, la o viteză de rotație de 500–600 rot/min⁻¹ (punctul 5.2). Dacă nu se folosește centrifuga (vezi nota de la punctul 5.2) se lasă să se odihnească pe stativ (punctul 5.7), timp de cel puțin 30 de minute, până ce stratul supernatant se limpezește și se separă vizibil de stratul apos. Dacă e nevoie, se poate răci balonul cu apă curentă.

6.5.6. Se îndepărtează cu grijă dopul de plută sau dispozitivul de închidere și se clătește, ca și interiorul gâtului balonului, cu o cantitate mică de amestec de solvenți (punctul 4.6), astfel încât lichidele de clătire să curgă în fiolă.

Dacă interfața se situează sub baza gâtului balonului, trebuie adusă la bază turnând apă, cu grijă, de-a lungul pereților balonului, astfel încât să se faciliteze decantarea solventului.

6.5.7. Ținând balonul de extracție de bulbul îngust, se decantează, cu foarte mare grijă, cât se poate de mult din stratul supernatant, în recipientul pregătit, destinat recuperării substanțelor grase (punctul 6.4), care conține câțiva regulatori de fierbere (punctul 5.10), în cazul baloanelor (facultativ în cazul capsulelor mecanice), evitându-se decantarea unei părți cât de mici a stratului apos.

6.5.8. Se clătește exteriorul gâtului balonului de extracție cu o cantitate mică de amestec de solvenți (punctul 4.6) și se colectează lichidele de clătire în recipientul destinat recuperării substanțelor grase, evitându-se prelingerea amestecului de solvenți în afara balonului de extracție.

Solventul poate fi eventual eliminat, total sau parțial, din recipient prin distilare sau evaporare, potrivit descrierii de la punctul 6.5.12.

- 6.5.9. Se adaugă 5 ml de etanol (punctul 4.2) la conținutul balonului de extracție, utilizându-se etanol pentru clătirea interiorului gâtului balonului, după care se amestecă după indicațiile de la punctul 6.5.2.
- 6.5.10. Se efectuează o a doua extracție reîncepându-se operațiunile descrise la punctul 6.5.3 și 6.5.8, dar utilizându-se doar 15 ml de oxid dietilic (punctul 4.4) și 15 ml de eter de petrol (punctul 4.5); se va utiliza oxidul dietilic pentru clătirea interiorului gâtului balonului de extracție. Dacă este necesar, se aduce interfața la mijlocul gâtului balonului, pentru a permite o decantare finală a solvenților cât se poate de completă.
- 6.5.11. Se efectuează o a treia extracție repetându-se din nou operațiunile descrise la punctul 6.5.3 și 6.5.8, dar utilizându-se doar 15 ml de oxid dietilic (punctul 4.4) și 15 ml de eter de petrol (punctul 4.5); se va utiliza oxidul dietilic pentru clătirea interiorului gâtului balonului de extracție. Dacă este necesar, se aduce interfața la mijlocul gâtului balonului de extracție, pentru a permite o decantare finală a solvenților cât se poate de completă.
- În cazul laptelui degresat se poate renunța la a treia extracție.
- 6.5.12. Se elimină solvenții (etanolul inclusiv) în mod cât se poate de complet, din balon prin distilare, prin evaporare din pahar sau din capsulă (punctul 5.3), clătindu-se gâtul balonului cu o cantitate mică de amestec de solvenți (punctul 4.6) înainte de începerea distilării.
- 6.5.13. Se încălzește recipientul destinat recuperării substanțelor grase (balonul se înclină, pentru a permite vaporilor de solvenți să iasă) timp de o oră în etuvă (punctul 5.4). Se scoate din etuvă recipientul destinat recuperării substanțelor grase, se lasă să se răcească (nu într-un exsicator, dar la adăpost de praf) la temperatura sălii în care se va efectua cântărirea (timp de o oră cel puțin în cazul recipientelor din sticlă, timp de cel puțin 30 de minute în cazul capsulelor metalice) și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg.
- A nu se șterge recipientul înainte de cântărire. Se amplasează recipientul pe balanță cu ajutorul cleștelui, pentru a evita în special variațiile de temperatură.
- 6.5.14. Se repetă operațiunile descrise la punctul 5.6.13, până când masa recipientului destinat recuperării substanțelor grase scade sau crește, cu 0,5 mg sau mai puțin, între două cântăriri succesive. Se notează masa minimă cântărită ca fiind masa recipientului destinat recuperării substanțelor grase și a substanței extrase.
- 6.5.15. Se adaugă 25 ml de eter de petrol în recipientul de extracție a substanțelor grase, pentru a se verifica dacă substanța extrasă este complet solubilă sau nu. Se încălzește cu grijă și se agită solventul cu o mișcare circulară până la dizolvarea tuturor substanțelor grase.
- Dacă substanțele extrase sunt complet solubile în eterul de petrol, masa substanțelor solubile va fi diferența dintre masa finală a balonului cu substanțele extrase (punctul 6.5.14) și masa sa inițială (punctul 6.4).
- 6.5.16. Dacă substanța extrasă nu este complet solubilă în eterul de petrol sau în caz de dubiu, se extrag în întregime substanțele grase din recipient prin spălări repetate cu eter de petrol încălzit.
- Se lasă să se depună substanțele insolubile și se decantează cu grijă eterul de petrol, fără însă a îndepărta substanțele insolubile. Se repetă această operațiune de trei ori, utilizându-se eterul de petrol pentru clătirea interiorului gâtului recipientului.
- În sfârșit, se clătește exteriorul vârfului recipientului cu amestecul de solvenți, în așa fel încât solventul să nu se prelingă la exteriorul recipientului. Se elimină vaporii eterului de petrol încălzindu-se recipientul timp de o oră în etuvă, se lasă să se răcească și se cântărește după indicațiile de la punctele 6.5.13 și 6.5.14.
- Masa substanțelor grase este diferența dintre masa determinată la punctul 6.5.14 și această masă finală.

7. EXPRIMAREA REZULTATELOR

7.1. Calcul și formulă

Se calculează conținutul de substanțe grase, exprimat în procente de masă, după formula următoare:

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

unde:

F = conținutul de substanțe grase

m_0 = masa în grame a probei (punctul 6.2)

m_1 = masa în grame a recipientului destinat recuperării substanțelor grase și a substanței extrase, determinată la punctul 6.5.14

m_2 = masa în grame a recipientului pregătit pentru recuperarea substanțelor grase sau, în cazul substanțelor nedizolvate, a recipientului destinat recuperării substanțelor grase și a reziduului insolubil, determinat la punctul 6.5.16

m_3 = masa în grame a recipientului pentru recuperarea substanțelor grase utilizat la proba martor (punctul 6.3) și a substanței extrase, determinate la punctul 6.5.14

m_4 = masa în grame a recipientului pentru recuperarea substanțelor grase (punctul 6.4) utilizat la proba martor (punctul 6.3) sau, în cazul substanțelor nedizolvate, a recipientului pentru recuperarea substanțelor grase și a reziduului insolubil, determinată la punctul 6.5.16.

Se notează rezultatul cu o precizie de 0,01 %.

7.2. Fidelitate**7.2.1. Repetabilitate (*r*)**

- în cazul laptelui integral și parțial degresat: 0,02 g de substanțe grase la 100 g de produs;
- în cazul laptelui degresat: 0,01 g de substanțe grase la 100 g de produs.

7.2.2. Reproducibilitate (*R*)

- în cazul laptelui integral: 0,04 g de substanțe grase la 100 g de produs;
- în cazul laptelui parțial degresat: 0,03 g de substanțe grase la 100 g de produs;
- în cazul laptelui degresat: 0,025 g de substanțe grase la 100 g de produs.

III. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE SUBSTANȚE USCATE DEGRESATE**1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE**

În prezentul capitol se descrie metoda de referință pentru determinarea conținutului de substanțe uscate degresate al laptelui tratat termic.

2. DEFINIȚIE ȘI CALCUL

Conținutul total de substanțe uscate degresate se exprimă în procente de masă.

El reprezintă diferența dintre conținutul total de substanțe uscate (capitolul I) și conținutul de substanțe grase (capitolul II).

IV. DETERMINAREA CONȚINUTULUI ÎN AZOT TOTAL AL LAPTELUI**1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE**

Capitolul de față descrie metoda de referință pentru determinarea conținutului în azot total al laptelui integral, parțial degresat și degresat.

2. DEFINIȚIE

Prin conținut în azot total al laptelui se înțelege conținutul de azot exprimat în procente de masă, obținut prin metoda Kjeldahl.

3. PRINCIPIU

O cantitate cântărită de eșantion de lapte este mineralizată cu ajutorul acidului sulfuric concentrat și al sulfatului de potasiu, în prezența sulfatului de cupru (II), cu rol de catalizator, astfel încât azotul din compușii organici să fie convertit în sulfat de amoniac. Amoniacul eliberat prin adăugarea unei soluții de hidroxid de sodiu este distilat și recuperat într-o soluție de acid boric. Această soluție este apoi tratată cu o soluție acidă.

4. REACTIVI**4.1. Sulfat de potasiu (K_2SO_4)****4.2. Soluție de sulfat de cupru.** Se dizolvă 5,0 g de sulfat de cupru (II) pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) în apă și se completează la 100 ml (la 20 °C) într-un balon gradat.**4.3. Acid sulfuric,** cu cel puțin 98,0 % (m/m) H_2SO_4 .**4.4. Soluție de hidroxid de sodiu,** 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (la 20 °C).

Notă: Se poate utiliza și soluție de hidroxid de sodiu mai puțin concentrată, de exemplu 40 % (m/m) 572 g/l, 20 °C sau 30 % (m/m) 399 g/l, 20 °C.

4.5. Soluție de acid boric. Se dizolvă 40 g de acid boric (H_3BO_3) într-un litru de apă caldă, se lasă să se răcească și se păstrează într-o sticlă borosilică.**4.6. Indicator.** Se dizolvă 0,01 g de roșu de metil, 0,02 g de albastru de bromtimol și 0,06 g verde de bromocrezol în 100 ml de alcool etilic. Se păstrează soluția într-o sticlă brună astupată, într-un loc răcoros și întunecat.**4.7. Soluție volumetrică acidă normalizată**

C ($\frac{1}{2}H_2SO_4$) sau c (HCL) = 0,05 mol/l titrat cu o precizie de 0,0001 mol/l.

- 4.8. **Zaharoză fără compuși de azot**
- 4.9. **Sare de amoniu** în stare pură, cum ar fi amoniul $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, H_2O sau sulfatul de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 4.10. **Triptofan** ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), fenacetină ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{CH}_2\text{CONH}_2$) sau mono- sau diclorhidrat de lizină ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ respectiv $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$).

Notă: Gradul de puritate al reactivilor menționați la punctele 4.9 și 4.10 ar trebui să fie superior „calității analitice”. Pentru punctul 4.9 trebuie să se utilizeze, în măsura posibilităților, o soluție de săruri de amoniu atestate.

5. APARATURĂ ȘI STICLĂRIE DE LABORATOR

Material obișnuit, în special:

- 5.1. **Baloane Kjeldahl** cu o capacitate de 500 ml.
- 5.2. **Regulatori de fierbere**, de exemplu bile de sticlă cu diametru de aproximativ 5 mm, granule Hengar și piatră ponce.
- 5.3. **Biurete sau pipete automate** cu dozaj de 1,0 ml.
- 5.4. **Cilindri gradați de sticlă**, cu o capacitate de 50, 100 și 250 ml.
- 5.5. **Aparat de digestie** (punctul 5.1) în poziție înclinată (la aproximativ 45°), dotat cu un dispozitiv de încălzire electrică sau cu un bec de gaz reglabile, astfel încât conținutul balonului să nu urce deasupra treimii gâtului, și cu un dispozitiv de extragere a gazelor arse.
- 5.6. **Aparat de distilare** din sticlă borosilicată, la care poate fi racordat un balon Kjeldahl (punctul 5.1), și care este compus dintr-un dispozitiv eficient pentru evacuarea lichidului obținut din prima distilare, legat de un refrigerat eficient cu tub interior drept și cu un tub de evacuare racordat în partea sa inferioară; tuburile de legătură și dopul(urile) trebuie să fie etanșe și de preferință fabricate din neopren.
- 5.7. **Pipetă sau pipetă automată** cu dozaj de 0,10 ml.
- 5.8. **Baloane conice** cu o capacitate de 500 ml, gradate la 200 ml.
- 5.9. **Biuretă** cu capacitate de 50 ml, gradată la intervale de 0,1 ml, cu o eroare maximală de $\pm 0,05$ ml.
- 5.10. **Lupă** pentru citiri exacte ale biuretei (punctul 5.9).
- 5.11. **pH-metru**
- 5.12. **Biuretă automată**

6. MOD DE OPERARE

- 6.1. Se introduc în mod succesiv în balonul Kjeldahl (punctul 5.1) regulatorii de fierbere (punctul 5.2) (de exemplu trei bile de sticlă), 15 g de sulfat de potasiu (punctul 4.1), 1,0 ml de soluție de sulfat de cupru (punctul 4.2), aproximativ 5 g de lapte (cântărit cu o precizie de 0,001 g) și 25 ml de acid sulfuric (punctul 4.3). Se utilizează acid pentru a clăti reziduurile soluției de sulfat de cupru, de sulfat de potasiu sau ale laptelui, care rămân pe gâtul balonului, după care se amestecă conținutul balonului.

Notă: Dat fiind faptul că substanțele organice absorb acid sulfuric în timpul fierberii, este preferabil să se folosească, pentru digestie, 30 și nu 25 ml de H_2SO_4 (punctul 4.3) dacă laptele conține mai mult de 5,0 % (m/m) substanțe grase. Acest lucru este valabil și pentru proba martor.

- 6.2. Se încălzește fiecare balon Kjeldahl pe aparatul de mineralizare (punctul 5.5), mai întâi la foc mic, astfel încât întreaga spumă neagră să rămână în balon. Dacă spuma inițială dispăre pentru a ceda locul unor gaze arse albe abundente, amestecul se aduce la fierbere intensivă (vapori acizilor se vor condensa la jumătatea drumului în gâtul balonului), până ce dispar în întregime particulele negre, iar conținutul balonului devine limpede, de culoare albastră-verzuie pală. Se continuă fierberea mai moderat timp de cel puțin o oră și jumătate. Atenție la indicațiile următoare:

(a) perioada de limpezire nu trebuie să depășească o oră, iar durata totală a mineralizării nu trebuie să fie mai mică de două ore și jumătate. Dacă este necesar mai mult de o oră pentru obținerea clătirii, timpul de mineralizare trebuie mărit în consecință;

(b) sulfatul de potasiu favorizează mineralizarea, fiindcă ridică temperatura de fierbere. Dacă volumul rezidual de H_2SO_4 la sfârșitul timpului de mineralizare este mai mic de 15 ml, există posibilitatea să fi survenit o pierdere de azot din cauza încălzirii exagerate. În cazul încălzirii cu gaz, se utilizează o placă dintr-un material izolat, prevăzută cu o deschidere circulară și cu un diametru astfel dimensionat încât flacăra directă să poată atinge doar partea balonului care se află sub suprafața lichidului din balon (punctul 5.5);

- (c) dacă în gâtul balonului intră particule negre și nu sunt spălate toate spre interiorul balonului cu acidul care se scurge, în timpul fazei inițiale de fierbere intensivă (scurgerea poate fi ajutată prin întoarcerea balonului), se lasă balonul să se răcească îndeajuns și se spală particulele cu o cantitate minimă de apă. După aceasta se continuă mineralizarea după procedeul descris mai sus.

- 6.3. Dacă baloanele Kjeldahl s-au răcit, se adaugă 300 ml de apă (vezi nota) în fiecare recipient, astfel încât să se spele toate particulele care aderă la gâtul balonului. Se amestecă cu grijă conținutul balonului, până la dizolvarea cristalelor care s-au separat. Se adaugă câțiva regulatori de fierbere (punctul 5.2) pentru a se obține o fierbere omogenă. După aceasta se adaugă în fiecare balon 70 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 4.4) (vezi nota) ținându-se balonul în poziție înclinată, astfel încât soluția de hidroxid de sodiu să formeze stratul inferior în balon. Se toarnă cu grijă, ca să nu se prelingă soluția în afară.

Notă: Volumul combinat de apă și de soluție de hidroxid de sodiu trebuie să fie de 370 ml, pentru a putea colecta aproximativ 150 ml de distilat înainte ca bulele de fierbere să apară la suprafața balonului (punctul 6.4). Dacă se adaugă o cantitate de soluție de hidroxid de sodiu mai mare, cu o concentrație mai mică de 47 % (m/m), volumul de apă adăugat trebuie să fie redus în mod proporțional. Astfel, dacă se adaugă 85 ml de soluție de 40 % (m/m) sau 125 ml de soluție cu o concentrație de 30 % (m/m), volumul de apă adăugat trebuie să fie de 282, respectiv de 245 ml.

- 6.4. Se racordează imediat fiecare balon Kjeldahl la un aparat de distilare (punctul 5.6), asigurându-se că extremitatea tubului refrigeratorului se scufundă în 50 ml de soluție de acid boric (punctul 4.5) și 0,20 ml (5–6 picături) de indicator (punctul 4.6) conținute în balonul conic. Se agită fiecare balon Kjeldahl pentru a amesteca bine conținutul și se aduce la fierbere, mai întâi la foc mic, pentru evitarea formării excesive de spumă. După ce s-au obținut între 100 și 125 ml de distilat, se coboară fiecare balon Erlenmeyer până ce extremitatea tubului refrigeratorului se găsește cu aproximativ 40 mm deasupra gradației de 200 ml. Se continuă fiecare distilare până ce apar bule de fierbere la suprafața balonului, după care se oprește brusc încălzirea. Se deconectează fiecare balon Kjeldahl și se clătește extremitatea fiecărui tub de evacuare al refrigeratorului cu puțină apă, colectându-se apa după clătire într-un balon Erlenmeyer. Atenție la indicațiile următoare:

- (a) viteza de distilare trebuie să permită recoltarea a aproximativ 150 ml de distilat înaintea apariției bulelor de fierbere, corespunzând unui volum total de aproximativ 200 ml în balonul Erlenmeyer;
- (b) eficacitatea fiecărui refrigerator trebuie să permită menținerea temperaturii lichidelor din fiecare balon sub 25 °C în cursul distilării.

- 6.5. Se titrează fiecare distilat cu o soluție volumetrică (punctul 4.7) până la valoarea pH $4,6 \pm 0,1$ utilizându-se un pH-metru și o biuretă automată. Adăugarea unui indicator permite verificarea corectitudinii procesului de titrare. Se notează valoarea indicată de fiecare biuretă cu o precizie de 0,01 ml, utilizându-se o lupă (punctul 5.10) pentru a evita erorile de paralaxă.

Titrarea se poate face folosindu-se doar indicatorul. Se titrează până în momentul în care distilatul capătă culoarea unei soluții preparate recent din 150 ml de apă, la care se adaugă 50 ml de soluție de acid boric și 0,20 ml de indicator dintr-un balon Erlenmeyer (punctul 5.8).

- 6.6. Se face o probă martor conform indicațiilor de la punctele 6.1 la 6.5 inclusiv, utilizându-se 5 ml de apă distilată cu aproximativ 0,1 g de zaharoză (punctul 4.8) în locul eșantionului de lapte.

Notă: Pentru titrarea distilatului martor este nevoie doar de o cantitate foarte mică de soluție volumetrică acidă normalizată (punctul 4.7).

- 6.7. Se verifică periodic fidelitatea rezultatelor prin efectuarea a două teste de recuperare, urmându-se indicațiile de la punctul 6.1 la 6.5.

- 6.7.1. Trebuie avut grijă ca în cursul distilării să nu aibă loc pierderi de azot, ca urmare a căldurii excesive sau a unor scurgeri mecanice; pentru aceasta se utilizează o probă compusă din 0,15 g de oxalat de amoniu sau sulfat de amoniu (punctul 4.9), cântărit cu o precizie de 0,001 g, și din 0,1 g de zaharoză (punctul 4.8).

Procentajul de azot recuperat trebuie să se situeze între 99–100 %.

Rezultatele inferioare sau superioare acestui interval sunt dovada unei erori de procedură și/sau a unei erori de concentrație a soluției normalizate (punctul 4.7).

- 6.7.2. Se verifică dacă procedura de mineralizare poate elibera întreaga cantitate de azot proteic, utilizându-se o probă compusă din 0,20 g de triptofan pur, 0,35 g de fenacetină sau 0,20 g de clorhidrat de lizină (punctul 4.10). Toți compușii trebuie să fie cântăriți cu o precizie de 0,001 g. Procentajul de recuperare al azotului trebuie să fie de cel puțin 98–99 %.

7. MĂSURI DE SECURITATE

În timpul manipulării acidului sulfuric concentrat, a hidroxidului de sodiu concentrat și a baloanelor Kjeldahl, trebuie să se poarte întotdeauna un șorț de laborator, ochelari de protecție și mănuși rezistente la acizi.

În cursul distilării, baloanele Kjeldahl sunt supravegheate în permanență. Pentru a se evita riscurile, se va opri imediat distilarea dacă conținutul balonului începe să fiarbă foarte violent. În caz de pană la sistemul de încălzire al aparatului de distilare timp de mai mult de două, trei minute, se coboară balonul colector, astfel încât extremitatea refrigeratorului să iasă din lichid.

8. PRIMĂRII REZULTATELOR

8.1. Calcul și formulă

Se calculează conținutul de azot, în grame de azot la 100 g de produs, cu ajutorul formulei:

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

unde:

N = conținutul de azot

V = volumul în ml al soluției volumetriche acide normalizate folosite la dozaj

V₀ = volumul în ml al soluției volumetriche acide normalizate folosite la proba martor

c = concentrația în mol/l a soluției volumetriche acide normalizate (punctul 4.7)

m = masa în grame a probei.

Se rotunjește rezultatul cu 0,001 g pentru 100 g.

8.2. Fidelitate

8.2.1. Repetabilitate (r): 0,007 g la 100 g

8.2.2. Reproducibilitate (R): 0,015 g la 100 g

9. MOD DE OPERARE MODIFICAT

9.1. Utilizarea unui cuptor de calcinare în locul sistemului de mineralizare cu baloane Kjeldahl (punctele 5.5 și 5.1). În acest caz, pentru a evita eventualele pane, se verifică separat fiecare punct (punctul 6.7).

9.2. În locul încălzirii directe (punctul 6.4), se va folosi un sistem de distilare prin antrenarea vaporilor. Dacă aparatura nu permite folosirea apei distilate, apa folosită nu trebuie să conțină substanțe volatile acide sau alcaline.

9.3. Se poate folosi o probă de 1 g de lapte (semi-macro Kjeldahl) în loc de 5 g (punctul 6.1), cu condiția ca:

- cantitățile de reactivi folosiți pentru mineralizare (punctul 6.1): H₂SO₄, CuSO₄, 5 H₂O, 5 K₂SO₄ să fie reduse în mod proporțional (cu o cincime),
- durata totală a mineralizării (punctul 6.2) să fie redusă la 75 de minute;
- cantitatea de hidroxid de sodiu (punctul 6.3) să fie redusă în mod proporțional (cu o cincime);
- să se utilizeze o soluție acidă normalizată (punctul 4.7) de o concentrație mai mică (0,02–0,03 mol/l).

Notă: Utilizarea uneia sau altele dintre aceste opțiuni este acceptabilă doar cu condiția ca repetabilitatea (punctul 8.2.1) și rezultatele celor două teste de control al preciziei (punctul 6.7) să corespundă valorilor fixate de normă.

V. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE SUBSTANȚE PROTEICE

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Capitolul de față descrie metoda de referință pentru determinarea conținutului de proteine al laptelui tratat termic (articolul 3 litera A punctul 3) din Directiva 85/397/CEE).

2. DEFINIȚIE

Conținutul total de proteine al laptelui: valoarea obținută prin înmulțirea cu un factor corespunzător (punctul 3) a conținutului total de azot, exprimat în procente de masă, determinat prin metoda descrisă la capitolul IV (punctul 3).

3. CALCUL

Conținutul total de substanțe proteice al laptelui = 6,38 x conținutul total în azot al laptelui în procente.

VI. DETERMINAREA MASEI VOLUMICE**1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE**

Prezentul capitol descrie metoda de referință pentru determinarea masei volumice a laptelui crud, a laptelui integral, a laptelui parțial degresat și a laptelui degresat, la 20 °C.

2. DEFINIȚIE

Masa volumică a laptelui este masa unui anumit volum de lapte, la 20 °C, raportată la acest volum.

3. PRINCIPIU

Masa volumică la 20 °C este determinată prin areometrie.

4. APARATURĂ ȘI STICLĂRIE DE LABORATOR

Material obișnuit de laborator și, în special:

4.1. Areometru

Areometrul de masă volumică este un instrument compus dintr-un flotor de sticlă, lat și lestat la extremitatea sa inferioară, și dintr-o tijă cilindrică de sticlă, sudată în partea superioară a flotorului și coaxială cu acesta, extremitatea superioară a tijei fiind închisă.

Flotorul de sticlă conține lestul (plumb, mercur etc.) pentru ajustarea masei areometrului. Tija include o scală gradată de la 1,025 la 1,035 g/ml.

Areometrul trebuie verificat prin metoda picnometrică; se folosește un picnometru cu o capacitate de aproximativ 100 ml, dotat cu un termometru de mare precizie.

4.2. Eprubete cilindrice (din sticlă sau oțel inoxidabil)

cu următoarele dimensiuni minimale:

- diametrul interior al cilindrilor: aproximativ 35 mm;
- înălțimea interioară a cilindrilor: aproximativ 225 mm.

4.3. Baie de apă reglată la $20 \pm 0,1$ °C.**4.4. Baie de apă** reglată la 40 ± 2 °C.**4.5. Termometru gradat** la intervale de cel puțin 0,5 °C.**5. MOD DE OPERARE**

5.1. Se omogenizează eșantionul întorcându-se recipientul, pentru a dispersa substanțele grase. Se introduce eșantionul în baia de apă (punctul 4.4) și se ține până când atinge 40 °C, apoi încă 5 minute la aceeași temperatură. Se amestecă bine, prin întoarceri succesive, pentru a se obține o distribuție omogenă a substanțelor grase. Se răcește la 20 °C în a doua baie de apă (punctul 4.3).

5.2. Se omogenizează bine eșantionul, prin întoarcerea recipientului, evitându-se însă încorporarea de aer. Se varsă laptele în eprubeta cilindrică (punctul 4.2), se menține în poziție înclinată pentru a se evita formarea spumei sau a bulelor. Se va utiliza o cantitate suficientă de lapte pentru a provoca debordarea lichidului în momentul introducerii areometrului (punctul 4.1) în eprubetă. Se scufundă cu grijă areometrul în lapte și se lasă să plutească liber, până ce își găsește punctul de echilibru. Se așează eprubeta în poziție verticală. Areometrul trebuie plasat în mijlocul coloanei de lichid și nu trebuie să atingă pereții eprubetei.

5.3. Dacă areometrul și-a atins punctul de echilibru, se citește gradația în partea superioară a meniscului.

5.4. Imediat după citirea areometrului, se introduce termometrul (punctul 4.5) în eșantion și se citește temperatura cu o precizie de 0,5 °C. Temperatura nu trebuie să se depărteze cu mai mult de ± 2 °C de 20 °C.

6. CORECȚIA TEMPERATURII

6.1. Dacă temperatura laptelui supus analizei nu este de exact 20 °C în momentul măsurării masei volumice, rezultatul trebuie corectat adunându-se la masa volumică citită 0,0002 pentru fiecare grad Celsius peste 20 °C sau scăzându-se 0,0002 pentru fiecare grad Celsius sub 20 °C. Această corecție este valabilă doar dacă temperatura eșantionului se depărtează cu maximum 5 °C de 20 °C.

7. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Calcularea masei volumice a eșantionului, exprimată în g/ml de lapte degresat la 20 °C, se face după formula următoare:

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

unde:

mv = masa volumică a eșantionului, obținută prin citirea areometrului (punctul 5.4) în g/l

MG = conținutul de substanțe grase al eșantionului (g/l)

0,92 = densitatea substanțelor grase

8. FIDELITATE

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

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

Apendice
(la anexa II)

UN ALT MOD DE OPERARE, CU TUBURI DE EXTRAȚIE A SUBSTANȚELOR GRASE DOTATE CU UN SIFON SAU CU UN DISPOZITIV DE SPĂLARE

- A.1. MOD DE OPERARE
- A.1.1. **Pregătirea eșantionului pentru test**
Vezi punctul 6.1.
- A.1.2. **Prelevarea probei**
Se procedează după indicațiile de la punctul 6.2, dar utilizându-se tuburi de extracție a substanțelor grase (punctul 5.6).
Proba trebuie transferată, pe cât posibil, în întregime, în fundul tubului de extracție.
- A.1.3. **Proba martor**
Vezi punctul 6.3.
- A.1.4. **Pregătirea recipientului destinat recuperării substanțelor grase**
Vezi punctul 6.4.
- A.1.5. **Determinarea**
- A.1.5.1. Se adaugă 2 ml de soluție de hidroxid de amoniu (punctul 4.1) sau un volum echivalent de soluție de hidroxid de amoniu mai concentrată și se amestecă bine cu proba pretrată în fundul tubului. După adăugarea hidroxidului de amoniu, determinarea se efectuează imediat.
- A.1.5.2. Se adaugă 10 ml de etanol (punctul 4.2) și se amestecă ușor, dar îndeajuns, în fundul tubului. Eventual se pot adăuga două picături de roșu de Congo sau de roșu de crezol (punctul 4.3).
- A.1.5.3. Se adaugă 25 de ml de oxid dietilic (punctul 4.4), se astupă tubul cu un dop din plută saturat cu apă sau cu un dop dintr-un alt material umezit cu apă (punctul 5.6) și se agită bine tubul, dar nu prea tare (pentru a evita formarea emulsiilor persistente), prin întoarcerea sa repetată, timp de un minut. Dacă este necesar, se răcește tubul sub apă curentă, se îndepărtează dopul de plută (sau alt material), după care se clătește, ca și gâtul tubului, cu o cantitate mică de amestec de solvenți (punctul 4.6), utilizându-se flaconul de spălare (punctul 5.8), astfel încât lichidele de clătire să curgă în tub.
- A.1.5.4. Se adaugă 25 ml de eter de petrol (punctul 4.5), se astupă tubul cu dopul din plută (sau alt material) reumezit (prin îmbibare în apă) și se agită cu grijă tubul, timp de 30 de secunde, după indicațiile de la punctul A.1.5.3.
- A.1.5.5. Se va centrifuga tubul închis timp de 1-5 minute cu o viteză de rotație de 500–600 rot/min⁻¹ (punctul 5.2). În lipsa unei centrifugi (vezi nota de la punctul 5.2), tubul astupat se lasă să se odihnească pe stativ, timp de cel puțin 30 de minute, până ce stratul supernatant se limpezește și se separă în mod vizibil de stratul apos. Dacă este necesar, tubul se răcește cu apă curentă.
- A.1.5.6. Se îndepărtează cu grijă dopul din plută (sau alt material) și se clătește, ca și gâtul tubului, cu o cantitate mică de amestec de solvenți, astfel încât lichidele de clătire să curgă în tub.
- A.1.5.7. Se introduce un sifon sau un dispozitiv de spălare în tub și se scufundă tubulura lungă în interior, până ce orificiul se află la aproximativ 3 mm deasupra suprafeței de contact dintre straturi. Tubulura din interior trebuie să fie paralelă cu axa tubului de extracție.

Se transvazează cu grijă stratul supernatant din tub în recipientul pregătit pentru recuperarea substanțelor grase (punctul 6.4), evitându-se transvazarea unei părți cât de mici a stratului apos; dacă recipientul e un balon, trebuie să conțină câțiva regulatori de fierbere (punctul 5.10) – facultativ în cazul capsulelor metalice. Se clătește orificiul cu o cantitate mică de amestec de solvenți, astfel încât lichidele de clătire să curgă în recipientul pentru recuperarea substanțelor grase.
- A.1.5.8. Se desface dispozitivul de la gâtul tubului, după care se ridică ușor și se clătește partea inferioară a tubulurii sale lungi din interior cu o cantitate mică de amestec de solvenți. Se coboară și se reintroduce dispozitivul, pentru transvazarea lichidelor de clătire în recipientul de recuperare a substanțelor grase.

Se clătește orificiul exterior al dispozitivului cu o cantitate mică de amestec de solvenți, după care se colectează lichidele de clătire în recipient. Eventual, solventul poate fi eliminat parțial sau total din recipient, prin distilare sau evaporare, după indicațiile de la punctul 6.5.12.

- A.1.5.9. Se desface din nou dispozitivul de la gâtul tubului, se ridică ușor dispozitivul și se adaugă 5 ml de etanol în tub; etanolul se folosește la clătirea tubului lungi din interior, după care se amestecă după indicațiile de la punctul A.1.5.2.
- A.1.5.10. Se face o a doua extracție, repetându-se operațiunile descrise la punctele A.1.5.3–A.1.5.8, dar utilizând doar 15 ml de oxid dietilic (punctul 4.4) și 15 ml de eter de petrol (punctul 4.5). Oxidul dietilic se va utiliza pentru clătirea tubului lungi din interior, după efectuarea primei extracții, în timpul retragerii dispozitivului din tub.
- A.1.5.11. Se face o a treia extracție repetându-se din nou operațiunile descrise la punctele A.1.5.3–A.1.5.8, utilizându-se 15 ml de oxid dietilic și 15 ml de eter de petrol și clătind tubulura lungă din interior a dispozitivului, după indicațiile de la punctul A.1.5.10.
- În cazul laptelui degresat, se poate renunța la a treia extracție.
- A.1.5.12. În continuare, se urmează indicațiile de la punctele 6.5.12–6.5.16.
-