

31979L1067

24.12.1979

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 327/29

PRVÁ SMERNICA KOMISIE

z 13. novembra 1979

stanovujúca metódy rozborov spoločenstva na testovanie určitého čiastočne alebo celkom dehydrovaného konzervovaného mlieka na ľudskú spotrebu

(79/1067/EHS)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 76/118/EHS z 18. decembra 1975 o aproximácii právnych predpisov členských štátov týkajúcich sa určitého čiastočne alebo celkom dehydrovaného konzervovaného mlieka určeného na ľudskú spotrebu⁽¹⁾, a najmä na jej článok 11,

keďže podľa článku 11 smernice 76/118/EHS sa požaduje, aby sa zloženie určitého čiastočne alebo celkom dehydrovaného konzervovaného mlieka overovalo metódami rozborov spoločenstva;

keďže je žiaduce prispôbiť úvodnú sériu metód s prihliadnutím na ukončené príslušné výskumy;

keďže opatrenia ustanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potraviny,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty podniknú všetky opatrenia potrebné na to, aby sa zabezpečilo, že analýzy potrebné na overovanie kritérií uvedených v prílohe I sa vykonávajú v súlade s metódami opísanými v prílohe II.

Článok 2

Ak sú vymedzené alternatívne metódy na jednotnú chemickú skúšku, môže sa vzorka analyzovať hociktorou metódou. Správa o vykonaní testu uvedená v prílohe II musí uviesť tú metódu, ktorá sa použila.

Článok 3

Členské štáty prijímajú zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia potrebné na splnenie tejto smernice v rámci 18 mesiacov od jej vyhlásenia. Bezodkladne o tom upovedomia Komisiu.

Článok 4

Táto smernica je určená členským štátom.

V Bruseli 13. novembra 1979

Za Komisiu

Étienne DAVIGNON

člen Komisie

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 24, 30.1.1976, s. 49.

PRÍLOHA I

ROZSAH PRVEJ SMERNICE SPOLOČENSTVA O METÓDACH ROZBOROV NA URČITÉ ČIASTOČNE ALEBO CELKOM DEHYDROVANÉ KONZERVOVANÉ MLIEKO**I. Všeobecné ustanovenia****II. Stanovenie sušiny:**

- v nesladenom kondenzovanom vysokotučnom mlieku (použitím metódy 1, príloha II),
- v nesladenom kondenzovanom mlieku (použitím metódy 1, príloha II),
- v nesladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku (použitím metódy 1, príloha II),
- v nesladenom kondenzovanom odstredenom mlieku (použitím metódy 1, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom mlieku (použitím metódy 1, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku (použitím metódy 1, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom odstredenom mlieku (použitím metódy 1, príloha II).

III. Stanovenie vlhkosti:

- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 2, príloha II),
- v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 2, príloha II),
- v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 2, príloha II),
- v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 2, príloha II).

IV. Stanovenie tuku:

- v nesladenom kondenzovanom vysokotučnom mlieku (použitím metódy 3, príloha II),
- v nesladenom kondenzovanom mlieku (použitím metódy 3, príloha II),
- v nesladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku (použitím metódy 3, príloha II),
- v nesladenom kondenzovanom odstredenom mlieku (použitím metódy 3, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom mlieku (použitím metódy 3, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku (použitím metódy 3, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom odstredenom mlieku (použitím metódy 3, príloha II),
- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 4, príloha II),
- v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 4, príloha II),
- v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 4, príloha II),
- v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 4, príloha II).

V. Stanovenie sacharózy:

- v sladenom kondenzovanom mlieku (použitím metódy 5, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku (použitím metódy 5, príloha II),
- v sladenom kondenzovanom odstredenom mlieku (použitím metódy 5, príloha II),

VI. Stanovenie kyseliny mliečnej a mliečnanov

- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 6, príloha II),
- v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 6, príloha II),
- v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 6, príloha II),
- v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 6, príloha II).

VII. Stanovenie aktivity fosfatázy:

- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 7 alebo 8, príloha II),
- v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku (použitím metódy 7 alebo 8, príloha II),
- v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 7 alebo 8, príloha II),
- v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku (použitím metódy 7 alebo 8, príloha II).

PRÍLOHA II

METÓDY ROZBOROV TÝKAJÚCE SA ZLOŽENIA URČITÝCH ČIASTOČNE ALEBO CELKOM DEHYDROVANÝCH MLIEČNYCH VÝROBKOV URČENÝCH NA ĽUDSKÚ SPOTREBU

VŠEOBECNÉ USTANOVENIA

1. PRÍPRAVA VZORKY NA CHEMICKÝ ROZBOR

1.1. **Nesladené kondenzované vysokotučné mlieko****Nesladené kondenzované mlieko****Nesladené kondenzované čiastočne odstredené mlieko****Nesladené kondenzované odstredené mlieko**

Uzatvorenú nádobu zatrepťte a obráťte. Nádobu otvorte a mlieko pomaly vylejte do druhej nádoby, ktorá sa dá hermeticky uzatvoriť, pri miešaní opakujte preliatie. Zabezpečte, aby všetky zvyšky tuku a mlieka, ktoré zostali na stenách a na dne kanvice, sa pomiešali so vzorkou. Uzavrite nádobu. Ak obsah nie je homogénny, tak nádobu zohrejte vo vodnom kúpeli pri 40 °C. Silne zatrepťte každých 15 minút. Po dvoch hodinách vyberte nádobu z vodného kúpeľa a nechajte ju vychladnúť na izbovú teplotu. Odstráňte poklop a obsah nádoby dôkladne premiešajte lyžicou alebo špachtľou (ak sa tuk oddelil, tak sa vzorka nemá testovať). Skladujte na chladnom mieste.

1.2. **Sladené kondenzované mlieko****Sladené kondenzované čiastočne odstredené mlieko****Sladené kondenzované odstredené mlieko**

Kany: Uzatvorenú kanvu zohrejte vo vodnom kúpeli pri 30 °C – 40 °C počas asi 30 minút. Kanvu otvorte a obsah dôkladne premiešajte špachtľou alebo lyžicou, a to pohybmi smerom hore, dolu a krúživými pohybmi, aby sa získala dôkladná zmes horných aj spodných vrstiev s celým obsahom. Zabezpečte, aby sa zvyšky mlieka, ktoré zostali na stenách a na dne kanvice, zamiešali so vzorkou. Pokiaľ je to možné, vlejte obsah do druhej nádoby, ktorá je zabezpečená vzduchotesným uzáverom. Nádobu uzatvorte a skladujte na chladnom mieste.

Tuby: Odrežte dno a obsah vylejte do nádoby opatrenej vzduchotesným viečkom. Potom rozrežte tubu po dĺžke. Vyškrabte všetok materiál z vnútornej strany stien a dôkladne ho premiešajte so zvyšným obsahom. Nádobu skladujte na chladnom mieste.

1.3. **Sušené vysokotučné mlieko alebo vysokotučné práškové mlieko****Sušené plnotučné mlieko alebo plnotučné práškové mlieko****Sušené čiastočne odstredené mlieko alebo čiastočne odstredené práškové mlieko****Sušené odstredené mlieko alebo odstredené práškové mlieko**

Práškové mlieko presypte do čistej suchej nádoby (so vzduchotesným viečkom) s kapacitou dvojnásobku objemu prášku. Nádobu ihneď uzatvorte a práškové mlieko dôkladne premiešajte opakovaným trepaním a obracанím nádoby. Počas prípravy vzorky treba, pokiaľ možno, zabrániť, aby práškové mlieko nebolo vystavené voľnému ovzdušiu, aby sa, pokiaľ možno, minimalizovala absorpcia vlhkosti.

2. REAGENTY

2.1. **Voda**

2.1.1. Vždy pri zmienke o vode na rozpúšťanie, rozriedenie alebo umývanie použije sa destilovaná voda alebo odmineralizovaná voda aspoň ekvivalentnej čistoty.

2.1.2. Vždy pri zmienke o „rozpúšťaní“, „roztoku“ alebo „riedení“ bez ďalšieho označenia sa myslí „rozpúšťanie vo vode“, „roztok vo vode“ a „zriedenie vo vode“.

2.2. **Chemikálie**

Všetky použité chemikálie musia mať uznanú kvalitu analytického činidla, pokiaľ nie sú inak bližšie špecifikované.

3. VYBAVENIE
- 3.1. **Zoznam vybavenia**
Zoznam vybavenia obsahuje iba tie položky, ktoré majú špecifické použitie a položky so zvláštnou špecifikáciou.
- 3.2. **Analytická váha**
Analytická váha je taká váha, ktorou sa dá odvážiť aspoň 0,1 mg.
4. VYJADRENIE VÝSLEDKOV
- 4.1. **Výpočet percentuálneho podielu**
S výnimkou osobitnej špecifikácie sa výsledky vypočítajú ako percentuálny podiel hmotnosti vzorky, ako ju dostalo laboratórium.
- 4.2. **Počet dôležitých údajov**
Výsledok nemá obsahovať viac dôležitých údajov, ako to oprávňuje presnosť použitej analytickej metódy.
5. SPRÁVA O VYKONANÍ TESTU
Správa bude uvádzať použitú metódu rozboru, ako aj získané výsledky.
Okrem toho sa zmieni o všetkých podrobnostiach postupu, ktoré nie sú špecifikované v metóde rozboru alebo ktoré sú voliteľné, ako aj o všetkých okolnostiach, ktoré mohli mať vplyv na získané výsledky.

METÓDA 1: URČENIE OBSAHU SUŠINY

(sušiareň na 99 °C)

1. ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA
Táto metóda určuje obsah sušiny:
 - v nesladenom kondenzovanom vysokotučnom mlieku,
 - v nesladenom kondenzovanom mlieku,
 - v nesladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku,
 - v nesladenom kondenzovanom odstredenom mlieku,
 - v sladenom kondenzovanom mlieku,
 - v sladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku,
 - v sladenom kondenzovanom odstredenom mlieku.
2. DEFINÍCIA
Obsah sušiny v kondenzovanom mlieku: obsah sušiny, ako sa určil špecifikovanou metódou.
3. PRINCÍP
Dané množstvo vzorky sa zriedi vodou, zmieša s pieskom a vysuší pri teplote 99 °C ± 1 °C. Hmotnosť po vysušení je hmotnosť sušiny a vypočíta sa ako percentuálny podiel hmotnosti vzorky.
4. REAGENTY
Kremenný piesok alebo morský piesok upravený kyselinou chlorovodíkovou (veľkosť zrna: 0,18 až 0,5 mm, ktorý prejde cez 500-mikrónové sitko a zadrží sa 180-mikrónovým sitkom). Má vyhovovať nasledujúcej kontrolnej skúške:
Zohrievajte asi 25 g piesku počas dvoch hodín v sušiarňi (5.3), ako je opísané v bodoch 6.1. až 6.3. Pridajte 5 ml vody, znovu zohrievajte v sušiackej peci dve hodiny, nechajte vychladnúť a odvážite. Rozdiel tých dvoch hmotností nemá presahovať 0,5 mg.

V prípade potreby nechajte piesok zreagovať s roztokom kyseliny chlorovodíkovej počas troch dní za príležitostného premiešania. Premývajte vodou, pokiaľ reakcia kyseliny nezmizne alebo až pokiaľ voda z preplachovania nebude bez chloridu. Sušte pri 160 °C a zopakujte vyššie uvedenú skúšku.

5. ZARIADENIA

5.1. Analytická váha.

5.2. Kovové misky, najlepšie z niklu, hliníka alebo nehrdzavejúcej ocele. Misky musia mať viečka, ktoré dobre priliehajú, ale ktoré sa dajú ľahko otvoriť. Vhodné rozmery sú: priemer 60 až 80 mm a hĺbka 25 mm.

5.3. Atmosférická sušiareň, dobre vetraná, termostaticky riadená regulovaním teploty pri 99 °C ± 1 °C. Teplota v celej peci má byť rovnaká.

5.4. Exsikátor s obsahom čerstvo aktivovaného silikátového gélu s indikátorom obsahu vody alebo podobná sušička.

5.5. Sklené tyčinky, sploštené na jednom konci, také dlhé, aby vošli do kovovej misky (5.2).

5.6. Vodný kúpeľ varný.

6. POSTUP

6.1. Do misky (5.2) dajte asi 25 g piesku (4) a krátku sklenú tyčinku (5.5).

6.2. Bez prikrytia misky a obsahu v nej umiestnite misku, obsah a viečko do sušiarne (5.3) a zohrievajte počas dvoch hodín.

6.3. Prikryte viečkom a misku preneste do exsikátora (5.4). Nechajte vychladnúť na izbovú teplotu a presne odvážte s presnosťou 0,1 mg (M_0).

6.4. Presuňte piesok na jednu stranu misky. Do voľného priestoru dajte asi 1,5 g vzorky sladeného kondenzovaného mlieka a 3,0 g nesladeného kondenzovaného mlieka. Prikryte a presne odvážte s presnosťou 0,1 mg (M_1).

6.5. Odokryte, pridajte 5 ml vody a pomocou sklenej tyčinky miešajte tekutiny a potom piesok a tekutinovú zložku. Tyčinku nechajte v zmesi.

6.6. Misku dajte do vodného kúpeľa (5.6), až kým sa neodparí voda; toto zvyčajne trvá 20 minút. Z času na čas zmes premiešajte tyčinkou, aby sa hmota dobre prevzdušnila, tak aby po vysušení nevytvárala koláč. Tyčinku vložte do misky.

6.7. Misku a viečko vložte do sušiarne na jeden a pol hodiny.

6.8. Preložte viečko, preneste misku do exsikátora (5.4). Nechajte vychladnúť na izbovú teplotu a presne odvážte s presnosťou 0,1 mg.

6.9. Preložte misku s viečkom do sušiarne, odokryte misku a zohrievajte aj s viečkom počas ďalšej hodiny.

6.10. Postup 6.8 opakujte.

6.11. Opísané postupy 6.9 a 6.10 opakujte až dovtedy, kým rozdiel v hmotnosti dvoch za sebou idúcich vážení nebude menší než 0,5 mg alebo až kým sa hmotnosť nezvýši. Ak sa zvýši hmotnosť, tak použite najnižšiu hmotnosť získanú pri vypočítaní (7.1). Posledný záznam váhy nech je M_2 g.

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

7.1. Spôsob výpočtu

Obsah sušiny vypočítaný ako percentuálny podiel hmotnosti vzorky je daný:

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

kde:

M_0 = hmotnosť misky, viečka a piesku (g) po vykonaní postupu 6.3;

M_1 = hmotnosť misky, viečka, piesku a vzorky (g) po vykonaní postupu 6.4;

M_2 = hmotnosť misky, viečka, piesku a vysušenej vzorky (g) po vykonaní postupu 6.11.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 0,2 g sušiny na 100 g výrobku.

8. VÝPOČET CELKOVEJ SUŠINY MLIEKA A BEZTUKOVEJ MLIEČNEJ SUŠINY

8.1. Obsah celkovej sušiny mlieka sladeného kondenzovaného mlieka je daný:

celkovou sušinou (získanou metódou 1, príloha II) – sacharózou (získanou metódou 5, príloha II).

8.2. Obsah mliečnej beztukovej sušiny nesladeného kondenzovaného mlieka je daný:

celkovou sušinou (získanou metódou 1, príloha II) – obsahom sacharózy (získaný metódou 5, príloha II) a obsahom tuku (získaný metódou 3, príloha II).

8.3. Obsah mliečnej beztukovej sušiny nesladeného kondenzovaného mlieka je daný:

celkovou sušinou (získanou metódou 1, príloha II) – obsahom tuku (získaný metódou 3, príloha II).

METÓDA 2: URČENIE VHLKOSTI

(sušiareň na 102 °C)

1. ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA

Touto metódou sa určuje strata hmotnosti pri sušení:

- sušeného vysokotučného mlieka alebo vysokotučného práškoveho mlieka,
- sušeného plnotučného mlieka alebo plnotučného práškoveho mlieka,
- sušeného čiastočne odstredeného mlieka alebo čiastočne odstredeného práškoveho mlieka,
- sušeného odstredeného mlieka alebo odstredeného práškoveho mlieka.

2. DEFINÍCIA

Obsah vlhkosti: strata hmotnosti pri sušení zistená podľa bližšie určenej metódy.

3. PRINCÍP

Zvyšková hmotnosť skúšanej dávky sa určí po vysušení pri atmosférickom tlaku v sušiarňi pri 102 °C ± 1 °C do konštantnej hmotnosti. Strata hmotnosti sa vypočíta ako percentuálny podiel hmotnosti vzorky.

4. ZARIADENIE
- 4.1. Analytická váha.
- 4.2. Misky, najlepšie z niklu, hliníka, nehrdzavejúcej ocele alebo skla. Misky musia mať viečka, ktoré dobre priliehajú, ale ktoré sa dajú ľahko otvoriť. Vhodné rozmery sú: priemer 60 až 80 mm a hĺbka 25 mm.
- 4.3. Atmosférická sušiareň, dobre vetraná, termostaticky riadená regulovaním teploty (pri $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Teplota v celej sušiarňi má byť rovnaká.
- 4.4. Exsikátor s obsahom čerstvo aktivovaného silikátového gélu s indikátorom obsahu vody alebo podobným desikantom.

5. POSTUP

- 5.1. Odokryte miskú (4.2) a položte ju spolu s viečkom do sušiarne (4.3) a zohrievajte počas jednej hodiny.
- 5.2. Misku prikryte viečkom a zakrytú dajte do exsikátora (4.4). Nechajte ju ochladiť na izbovú teplotu a presne odvážte s presnosťou na 0,1 mg (M_0).
- 5.3. Do misky dajte približne 2 g vzorky sušeného mlieka, prikryte miskú viečkom a prikrytú čo najrýchlejšie presne odvážte s presnosťou na 0,1 mg (M_1).
- 5.4. Odokryte miskú a spolu s viečkom ju vložte do sušiarne na dve hodiny.
- 5.5. Prikryte viečkom, prikrytú miskú preložte do exsikátora, nechajte ju vychladnúť na izbovú teplotu a čo najskôr presne odvážte s presnosťou na 0,1 mg.
- 5.6. Misku odokryte a zohrievajte ju spolu s viečkom jednu hodinu v sušiarňi.
- 5.7. Postup 5.5 zopakujte.
- 5.8. Postupy 5.6 a 5.5 opakujte až dovtedy, kým zníženie hmotnosti dvoch za sebou idúcich vážení nebude menšie než 0,5 mg alebo až kým sa hmotnosť nezvýši. Ak sa zvýši hmotnosť, tak použite najnižšiu získanú hmotnosť pri výpočte (6.1). Posledný záznam váhy nech je M_2 g.

6. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

6.1. Spôsob výpočtu

Vypočítajte stratu hmotnosti pri sušení vzorky, vyjadrenú ako percentuálny podiel hmotnosti podľa vzorca:

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

kde:

M_0 = hmotnosť misky a viečka (g) po vykonaní postupu 5.2;

M_1 = hmotnosť misky, viečka a vzorky (g) po vykonaní postupu 5.3;

M_2 = hmotnosť misky, viečka a konečnej vzorky (g) po vykonaní postupu 5.5.

6.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch skúšok uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 0,1 g vlhkosti na 100 g výrobku.

METÓDA 3: URČENIE OBSAHU TUKU V KONDENZOVANOM MLIEKU (METÓDA RÖSE-GOTTLIEB)**1. ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA**

Táto metóda určuje obsah tuku:

- v nesladenom kondenzovanom vysokotučnom mlieku,
- v nesladenom kondenzovanom mlieku,
- v nesladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku,
- v nesladenom kondenzovanom odstredenom mlieku,
- v sladenom kondenzovanom mlieku,
- v sladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku,
- v sladenom kondenzovanom odstredenom mlieku.

2. DEFINÍCIA

Obsah tuku v kondenzovanom mlieku: obsah tuku zistený podľa bližšie určenej metódy.

3. PRINCÍP

Obsah tuku sa určuje extrakciou tuku z amoniakálneho alkoholového roztoku vzorky dietyléterom a petroléterom po odparení rozpúšťadiel a vážením zvyškov a výpočtom percenta hmotnosti vzorky podľa princípu Röse-Gottlieb.

4. REAGENTY

Všetky reagenty musia vyhovovať požiadavkám bližšie určeným v predbežnej skúške (6.1). V prípade potreby môžu byť reagenty redistilované v prítomnosti asi 1 g maslového tuku na 100 ml rozpúšťadla.

- 4.1. Roztok amoniaku, približne 25 % (m/m) NH_3 (hustota pri 20 °C približne 0,91 g/ml) alebo silnejší roztok známej koncentrácie.
- 4.2. Etanol 96 ± 2 % (v/v) alebo ak nie je dostupný, etanol denaturovaný metanolom, etyl metylketónom alebo petroléterom.
- 4.3. Dietyléter bez peroxidu.

Poznámka 1:

Na skúšku peroxidov pridajte asi 10 ml éteru v malej skúmavke so sklenou zabrúsenou zátkou, ktorá sa predtým opláchlá éterom, 1 ml čerstvo pripraveného roztoku 10 % jodidu draselného. Zatrepte a nechajte stáť jednu minútu. V žiadnej vrstve nemá byť vidieť žltú farbu.

Poznámka 2:

Dietyléter sa má uchovávať bez peroxidov pridaním vlhkej zinkovej fólie, ktorá bola úplne ponorená do zriedeného okysleného roztoku síranu meďnatého na 1 minútu a potom sa opláchlá vodou. Na 1 liter použite asi 8 000 mm² zinkovej fólie; narežte na pásy takej dĺžky, aby siahali aspoň do polovice nádoby.

- 4.4. Petroléter s varným pásmom medzi 30 °C a 60 °C.
 - 4.5. Zmiešaný roztok pripravený krátko pred použitím zmiešaním rovnakého objemu dietyléteru (4.3) a petroléteru (4.4) (v prípade, že je vyznačené použitie zmiešaného roztoku, môže sa nahradiť buď dietyléterom alebo samotným petroléterom).
- 5. ZARIADENIE**
- 5.1. Analytická váha.
 - 5.2. Vhodné extrakčné skúmavky alebo fľaštičky zabezpečené vhodnými sklenými zabrúsenými zátkami alebo inými uzávermi, ktoré neúčinkujú s použitými roztokmi.
 - 5.3. Fľaštičky s tenkými stenami a plochým dnom, s kapacitou 150 až 250 ml.

- 5.4. Atmosférická sušiareň, dobre vetraná a termostaticky riadená (nastavená na teplotu $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 5.5. Varné granule, bez tuku, neporézne, nedrobné pri použití, napr. sklené guľôčky alebo kúsky karbidu silikónu (použitie tohto materiálu je voliteľné; pozri bod 6.2.1).
- 5.6. Sifón na pripojenie extrakčných skúmaviek.
- 5.7. Centrifúga (voliteľné).

6. POSTUP

6.1. Predbežná skúška

Zároveň s určovaním obsahu tuku vo vzorke vykonajte aj predbežnú skúšku na 10 ml vody použitím toho istého druhu extrakčného zariadenia, rovnakých reagentov v tom istom množstve a toho istého postupu, ako je ďalej opísaný, okrem bodu 6.2.2. Ak predbežná skúška presahuje 0,5 mg, vtedy treba reagenty kontrolovať a znečistený reagent alebo reagenty treba vyčistiť alebo nahradiť.

6.2. Stanovenie

- 6.2.1. Sušte fľaštičku (5.3) (spolu s niekoľkými varnými granulami (5.5), ak je to potrebné, na podporu jemného varenia počas následného odstraňovania rozpúšťadiel) v sušiarňi (5.4) pol hodiny až jednu hodinu. Fľaštičku nechajte vychladnúť na teplotu váhovne a presne odvážite vychladnutú fľaštičku s presnosťou 0,1 mg.
- 6.2.2. Pripravenú vzorku premiešajte a ihneď navážte s presnosťou 1 mg, 2 až 2,5 g vzorky, ak ide o sladenú vzorku, alebo 4 až 5 g vzorky, ak ide o nesladenú vzorku, priamo v extrakčnom zariadení, alebo ak sú rozdielne, do extrakčného zariadenia (5.2). Pridajte maximálne 10,5 ml vody a jemne zatrepťte pri slabom nahrievaní ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$ až na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$), až kým výrobok úplne disperguje. Vzorka musí byť úplne dispergovaná, ináč sa stanovenie musí opakovať.
- 6.2.3. Pridajte 1,5 ml amoniaku (25 %) (4.1) alebo zodpovedajúci objem silnejšieho roztoku a dobre zamiešajte.
- 6.2.4. Pridajte 10 ml etanolu (4.2) a tekutiny jemne premiešajte v neuzatvorenom zariadení.
- 6.2.5. Pridajte 25 ml dietyléteru (4.3). Vychladte pod tečúcou vodou. Zariadenia uzatvorte a opakovane silne trepte a obracajte počas jednej minúty.
- 6.2.6. Opatrne odstráňte zátku a pridajte 25 ml petroléteru (4.4), použijúc prvých niekoľko mililitrov na opláchnutie zátky vnútra hrdla zariadenia, tak aby oplachujúce množstvo tieklo do zariadenia. Uzatvorte nasadením zátky a opakovane trepte a obracajte počas 30 sekúnd. Netrepte príliš silno, ak sa nemá použiť centrifúga v bode 6.2.7.
- 6.2.7. Zariadenie nech je v pokoji, kým horná vrstva tekutiny nebude jasná a zreteľne oddelená od dolnej vodnej vrstvy. Eventuálne vykonajte separáciu použitím vhodnej odstredivky (5.7).

Poznámka:

V prípade použitia odstredivky, ktorá nie je poháňaná trojfázovým motorom, môžu vznikáť iskry, a preto treba dávať pozor, aby sa zabránilo explózii alebo požiaru z éterových výparov vychádzajúcich napríklad z prasknutej skúmavky.

- 6.2.8. Odstráňte zátku, opláchnite ju, ako aj vnútro hrdla zariadenia niekoľkými mililitrami zmiešaného roztoku (4.5) a nechajte to oplachujúce množstvo stekať do zariadenia. Opatrne preneste čo najviac vrstvy plávajúcej na povrchu dekantáciou alebo pomocou sifónu (5.6) do pripravenej fľaštičky (6.2.1).

Poznámka:

Ak sa prenášanie nerobí pomocou sifónu, je potrebné pridať trochu vody, aby sa zvýšilo rozhranie medzi tými dvoma vrstvami a tak pomohlo dekantácii.

- 6.2.9. Opláchnite vonkajšok a vnútro hrdla zariadenia alebo hornú a dolnú časť sifónu niekoľkými mililitrami zmiešaného roztoku (4.5). Nechajte množstvo oplachujúce vonkajšok zariadenia stekať do nádoby a množstvo oplachujúce vnútro hrdla a sifón stekať do extrakčného zariadenia.

- 6.2.10. Vykonajte druhú extrakciu opakovaním postupov 6.2.5 až 6.2.9 vrátane, ale použite iba 15 ml dietyléteru a 15 ml petroléteru.
- 6.2.11. Vykonajte tretiu extrakciu opakovaním postupu 6.2.10, ale vynechajte posledné oplachovanie (6.2.9).
- Poznámka:*
Nie je povinné vykonať túto tretiu skúšku, ak sa robia rozborové vzorky odstreďovaného nesladeného kondenzovaného mlieka a odstreďovaného sladeného kondenzovaného mlieka.
- 6.2.12. Opatrne odparte alebo oddestilujte čo najviac roztoku (vrátane etanolu). Ak je nádobka malého objemu, bude potrebné odstrániť roztok, ako je uvedené vyššie, po každej extrakcii.
- 6.2.13. Ak sa nevyskytuje žiadny značný zápach rozpúšťadla, umiestnite fľašku na jej miesto v sušiarne a hodinu zohrievajte.
- 6.2.14. Vyberte nádobku zo sušiarne, nechajte vychladnúť na teplotu váhovne a presne odvážte s presnosťou na 0,1 mg.
- 6.2.15. Opakujte body 6.2.13 a 6.2.14 počas vyhrievania 30 až 60 minút, až kým rozdiel hmotnosti dvoch za sebou nasledujúcich vážení nebude menší než 0,5 mg alebo kým sa hmotnosť nezvýši. Ak nastane zvýšenie hmotnosti, použite najnižšiu získanú hmotnosť vypočítaním (7.1). Posledná zaznamenaná váha nech je M_1 g.
- 6.2.16. Pridajte 15 až 25 ml petroléteru, aby sa potvrdilo, že extrahovaná látka je plne rozpustná. Roztok jemne zohrievajte a zamiešajte, kým sa všetok tuk nerozpustí.
- 6.2.16.1. Ak je extrahovaná látka plne rozpustná v petroléteri, hmotnosť tuku je rozdiel medzi váženiami určenými na stupňoch 6.2.1 a 6.2.15.
- 6.2.16.2. Ak je prítomná nejaká nerozpustná látka alebo v prípade pochybností úplne extrahujte tuk z flášiek opakovaným premývaním teplým petroléterom, nechajúc nerozpustenú látku najprv usadiť pred každou dekantáciou. Vonkajšie hrdlo flášky trikrát opláchnite. Fľašku umiestnenú na jej miesto v sušiarne zohrievajte jednu hodinu, nechajte vychladnúť na teplotu váhovne ako predtým (6.2.1) a odvážte s presnosťou na 0,1 mg. Hmotnosť tuku je rozdiel medzi hmotnosťou získanou v 6.2.15 a touto konečnou hmotnosťou.

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

7.1. Výpočet

hmotnosť extrahovaného tuku v gramoch je:

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

a obsah tuku vo vzorke vyjadrený v percentách je:

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

kde:

M_1 = hmotnosť banky M s tukom (g), získaná postupom podľa 6.2.15;

M_2 = hmotnosť banky M (g), získaná v bode 6.2.1 alebo (ak je prítomná nerozpustená hmota, alebo v prípade pochybností) v postupe 6.2.16.2;

B_1 = hmotnosť banky B v slepom pokuse (g), získaná postupom podľa 6.2.15;

B_2 = hmotnosť banky B (g), získaná postupom podľa 6.2.1. alebo (ak je prítomná nerozpustená hmota, alebo v prípade pochybností) postupom 6.2.16.2;

S = hmotnosť použitej vzorky (g).

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch skúšok uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 0,05 g tuku na 100 g výrobku.

METÓDA 4: URČENIE OBSAHU TUKU V SUŠENOM MLIEKU (METÓDA RÖSE-GOTTLIEB)**1. ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA**

Táto metóda určuje obsah tuku:

- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku,
- v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku,
- v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku,
- v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku.

2. DEFINÍCIA

Obsah tuku sušených druhov mlieka: obsah tuku zistený podľa bližšie určenej metódy.

3. PRINCÍP

Obsah tuku sa určí extrakciou tuku z amoniakálneho alkoholového roztoku vzorky s dietyléterom a petroléterom s následným odparovaním roztokov a vážením zvyšku a vypočítaním percenta hmotnosti vzorky podľa princípu Röse-Gottlieba.

4. REAGENTY

Všetky reagenty musia vyhovovať požiadavkám bližšie určeným v predbežnej skúške (6.1). V prípade potreby môžu byť reagenty redestilované v prítomnosti asi 1 g maslového tuku na 100 ml rozpúšťadla.

- 4.1. Roztok amoniaku, približne 25 % (m/m) NH_3 (hustota pri 20 °C približne 0,91 g/ml) alebo silnejší roztok známej koncentrácie.
- 4.2. Etanol 96 ± 2 % (v/v) alebo ak nie je dostupný, etanol denaturovaný metanolom, etyl metylketónom alebo petroléterom.
- 4.3. Dietyléter bez peroxidu.

Poznámka 1:

Na skúšku peroxidov pridajte asi 10 ml éteru v malej skúmavke so sklenou zabrušenou zátkou, ktorá sa predtým opláchlá éterom, 1 ml čerstvo pripraveného roztoku 10 % jodidu draselného. Zatrepte a nechajte stáť jednu minútu. V žiadnej vrstve nemá byť vidieť žltú farbu.

Poznámka 2:

Dietyléter sa má uchovávať bez peroxidov pridaním vlhkej zinkovej fólie, ktorá bola úplne ponorená do zriedeného okysleného roztoku síranu meďnatého na 1 minútu a potom opláchnutá vodou. Na 1 liter použite asi 8 000 mm² zinkovej fólie, narežte na pásy takej dĺžky, aby siahali aspoň do polovice nádoby.

- 4.4. Petroléter s varným pásmom medzi 30 °C a 60 °C.
- 4.5. Zmiešané rozpúšťadlo pripravené krátko pred použitím zmiešaním rovnakého objemu dietyléteru (4.3) a petroléteru (4.4) (v prípade, že je vyznačené použitie zmiešaného roztoku, môže sa nahradiť buď dietyléterom alebo samotným petroléterom).

5. ZARIADENIE

- 5.1. Analytická váha.
- 5.2. Vhodné extrakčné skúmavky alebo nádoby zabezpečené vhodnými sklenými zabrušenými zátkami alebo inými uzávermi, ktoré neúčinkujú s použitými roztokmi.
- 5.3. Nádoby s tenkými stenami a plochým dnom, s kapacitou 150 až 250 ml.
- 5.4. Atmosférická sušiareň, dobre vetraná a termostaticky riadená (nastavená na prevádzku pri 102 °C $\pm$ 1 °C).

- 5.5. Varné granule, bez tuku, neporézne, nedrobivé pri použití, napr. sklené guľôčky alebo kúsky karbidsilikónu (použitie tohto materiálu je voliteľné; pozri bod 6.2.1).
- 5.6. Vodný kúpeľ pri 60 °C až 70 °C.
- 5.7. Sifón na pripojenie extrakčných skúmaviek.
- 5.8. Centrifúga (voliteľné).

6. POSTUP

6.1. Predbežná skúška

Zároveň s určovaním obsahu tuku vzorky vykonávajte aj predbežnú skúšku na 10 ml vody použitím toho istého druhu extrakčného zariadenia, rovnakých reagentov v tom istom množstve a toho istého postupu, ako je ďalej opísaný, okrem bodu 6.2.2. Ak predbežná skúška presahuje 0,5 mg, vtedy treba reagenty kontrolovať a znečistený reagent alebo reagenty treba prečistiť alebo nahradiť.

6.2. Stanovenie

- 6.2.1. Sušte nádobku (5.3) [spolu s niekoľkými varnými granulami (5.5), ak je to potrebné, na podporu jemného varu počas následného odstraňovania rozpúšťadiel] v sušiarňi (5.4) počas pol hodiny až jednej hodiny. Flaštičku nechajte vychladnúť na teplotu váhovne a presne odvážte vychladnutú flaštičku s presnosťou 0,1 mg.
- 6.2.2. Presne odvážte s presnosťou na 1 mg priamo v extrakčnom zariadení alebo pri rozdielnosti do extrakčného zariadenia (5.2) asi 1 g plnotučného práškoveho mlieka alebo 0,5 g čiastočne odstredeného alebo odstredeného práškoveho mlieka. Pridajte 10 ml vody a jemne zatrepajte, až kým sa mliečny prášok úplne rozptýli (pri niektorých vzorkách je možno potrebný ohrev).
- 6.2.3. Pridajte 1,5 ml amoniaku (25 %) (4.1) alebo zodpovedajúci objem silnejšieho roztoku a zohrievajte v tepelnom kúpeli (5.6) počas 15 minút na 60 °C až 70 °C, príležitostne potrepajte. Dajte vychladnúť napríklad do tečúcej vody.
- 6.2.4. Pridajte 10 ml etanolu (4.2) a tekutiny jemne premiešajte v neuzatvorenom zariadení.
- 6.2.5. Pridajte 25 ml dietyléru (4.3). Vychlaďte pod tečúcou vodou. Zariadenie uzatvorte a opakovane silne trepte a obracajte počas jednej minúty.
- 6.2.6. Opatrne odstráňte zátku a pridajte 25 ml petroléru (4.4), použijúc prvých niekoľko mililitrov na opláchnutie zátky vnútra hrdla zariadenia, tak aby oplachujúce množstvo tieklo do zariadenia. Uzavrite nasadením zátky a opakovane trepte a obracajte počas 30 sekúnd. Netrepte príliš silno, ak sa nemá použiť centrifúga v bode 6.2.7.
- 6.2.7. Zariadenie nech je v pokoji, kým horná vrstva tekutiny nebude číra a zreteľne oddelená od dolnej vodnej vrstvy. Eventuálne vykonajte separáciu použitím vhodnej odstredivky (5.8).

Poznámka:

V prípade použitia odstredivky, ktorá nie je poháňaná trojfázovým motorom, môžu vznikáť iskry, a preto treba dávať pozor, aby sa zabránilo explózii alebo požiaru z éterových výparov vychádzajúcich napríklad z prasknutej skúmavky.

- 6.2.8. Odstráňte zátku, opláchnite ju, ako aj vnútro hrdla zariadenia niekoľkými mililitrami zmiešaného roztoku (4.5) a nechajte oplachujúce množstvo stekať do zariadenia. Opatrne preneste čo najviac vrstvy plávajúcej na povrchu dekantáciou alebo pomocou sifónu (5.7) do pripravenej flaštičky (6.2.1).

Poznámka:

Ak sa prenášanie nerobí pomocou sifónu, bude možno potrebné pridať trochu vody, aby sa zvýšilo prenikanie medzi tými dvoma vrstvami a tak pomohlo dekantácii.

- 6.2.9. Opláchnite vonkajšok a vnútro hrdla zariadenia alebo hornú a dolnú časť sifónu niekoľkými mililitrami zmiešaného roztoku. Nechajte množstvo oplachujúce vonkajšok zariadenia stekať do flaštičky a množstvo oplachujúce vnútro hrdla a sifón stekať do extrakčného zariadenia.

- 6.2.10. Vykonajte druhú extrakciu opakovaním postupov 6.2.5 až 6.2.9 vrátane, ale použite iba 15 ml dietyléteru a 15 ml petroléteru.
- 6.2.11. Vykonajte tretiu extrakciu opakovaním postupu 6.2.10, ale vynechajte posledné preplachovanie (6.2.9).
- Poznámka:*
Nie je povinné vykonať túto tretiu skúšku, ak sa robia rozbery vzoriek odstredeného sušeného mlieka.
- 6.2.12. Opatrne odparujte alebo oddestilujte čo najviac rozpúšťadla (vrátane etanolu). Ak je fľaška malého objemu, bude potrebné odstrániť roztok, ako je uvedené vyššie, po každej extrakcii.
- 6.2.13. Ak sa nevyskytuje žiadny značný zápach rozpúšťadla, umiestnite fľašku na jej miesto v sušiarne a hodinu zohrievajte.
- 6.2.14. Vyberte fľašku zo sušiarne, nechajte vychladnúť na teplotu váhovne ako predtým (6.2.1) a presne odvážte s presnosťou na 0,1 mg.
- 6.2.15. Opakujte body 6.2.13 a 6.2.14 počas vyhrievania 30 až 60 minút, až kým rozdiel hmotnosti dvoch za sebou nasledujúcich vážení nebude menší než 0,5 mg alebo kým sa hmotnosť nezvýši. Ak nastane zvýšenie hmotnosti, použite najnižšiu zistenú hmotnosť pri vypočítaní (7.1). Posledná zaznamenaná hmotnosť nech je M_1 g.
- 6.2.16. Pridajte 15 až 25 ml petroléteru, aby sa potvrdilo, že extrahovaná látka je plne rozpustná. Roztok jemne zohrievajte a miešajte, až kým sa všetok tuk nerozpustí.
- 6.2.16.1. Ak je extrahovaná látka plne rozpustná v petroléteru, tak hmotnosť tuku je rozdiel medzi váhami určenými na stupňoch 6.2.1 a 6.2.15.
- 6.2.16.2. Ak sa vyskytne nejaká nerozpustná látka, alebo v prípade pochybností, úplne extrahujte tuk z fľašiek opakovaným umývaním teplým petroléterom, nechajúc nerozpustenú látku najprv usadiť pred každou dekantáciou. Vonkajšie hrdlo fľašky trikrát opláchnite.

Fľašku umiestnenú na jej mieste v sušiarne zohrievajte jednu hodinu, nechajte vychladnúť na teplotu váhovne ako predtým (6.2.1) a odvážte s presnosťou na 0,1 mg. Hmotnosť tuku je rozdiel medzi hmotnosťou získanou v 6.2.15 a touto konečnou hmotnosťou.

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

7.1. Výpočet

hmotnosť extrahovaného tuku (g) je:

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

a obsah tuku vo vzorke, vyjadrený v percentách, je:

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

kde:

M_1 = hmotnosť banky M s tukom (g), získaná postupom podľa 6.2.15;

M_2 = hmotnosť banky M (g), získaná postupom podľa 6.2.1 alebo (ak je prítomná nerozpustená hmota, alebo v prípade pochybností) postupom podľa 6.2.16.2;

B_1 = hmotnosť banky B v slepom pokuse (g), získaná postupom podľa 6.2.15;

B_2 = hmotnosť banky B (g), získaná postupom podľa 6.2.1 alebo (ak je prítomná nerozpustená hmota, alebo v prípade pochybností) postupom podľa 6.2.16.2;

S = hmotnosť použitej vzorky (g).

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch skúšok uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 0,2 g tuku na 100 g výrobku s výnimkou odstredeného práškoveho mlieka, pri ktorom rozdiel nesmie presahovať 0,1 g tuku na 100 g výrobku.

METÓDA 5: URČENIE OBSAHU SACHARÓZY (POLARIMETRICKÁ METÓDA)**1. ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA**

Táto metóda určuje obsah sacharózy:

- v sladenom kondenzovanom mlieku,
- v sladenom kondenzovanom čiastočne odstredenom mlieku,
- v sladenom kondenzovanom odstredenom mlieku.

Vzorky nesmú obsahovať invertný cukor.

2. DEFINÍCIA

Obsah sacharózy v sladenom kondenzovanom mlieku: obsah sacharózy, ako je zistený podľa bližšie určenej metódy.

3. PRINCÍP

Táto metóda je založená na princípe Clergetovej inverzie, jemnej úprave vzorky kyselinou, ktorá vykonáva úplnú hydrolyzu sacharózy, ale nie laktózy alebo iných cukrov. Obsah sacharózy sa získa zmenou rotačnej sily roztoku.

Čistý filtrát vzorky bez mutarotácie laktózou sa pripraví úpravou roztoku amoniakom a následnou neutralizáciou a vyčerením postupným pridávaním roztokov octanu zinočnatého a hexakynoželezitanu draselného.

Sacharóza sa v časti filtrátu hydrolyzuje zvláštnym spôsobom.

Z rotácie filtrátu pred a po inverzii sa vypočíta obsah sacharózy použitím vhodného vzorca.

4. REAGENTY

- 4.1. Roztok octanu zinočnatého, 1M: rozpustíte 21,9 g kryštalického octanu zinočnatého $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a 3 ml ľadovej kyseliny octovej vo vode a doplňte až do 100 ml vodou.
- 4.2. Roztok hexakynoželezitanu draselného, 0,25 M: rozpustíte 10,6 g kryštalického hexakynoželezitanu draselného $\text{K}_4[(\text{Fe}(\text{CN})_6)] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ vo vode a doplňte do 100 ml vodou.
- 4.3. Roztok kyseliny chlór vodíkovej, $6,35 \pm 0,20 \text{ M}$ (20 % až 22 %) alebo $5,0 \pm 0,2 \text{ M}$ (16 % až 18 %).
- 4.4. Roztok amoniaku, $2,0 \pm 0,2 \text{ M}$ (3,5 %).
- 4.5. Roztok kyseliny octovej, $2,0 \pm 0,2 \text{ M}$ (12 %).
- 4.6. Indikátor bromotymolová modrá, 1 % (m/v) roztok v etanole.

5. ZARIADENIE

- 5.1. Váha, citlivosť 10 mg.
- 5.2. Polarimetrická rúrka, 2 dm, presne kalibrovanej dĺžky.

- 5.3. Polarimeter alebo sacharometer:
- polarimeter so sodíkovým svetlom alebo ortuťovým zeleným svetlom (ortuťová výbojka so špeciálnym osvetľovacím hranolom N 77 A) na čítanie s presnosťou aspoň 0,05 uhlových stupňov;
 - sacharometer s medzinárodnou sacharimetrickou stupnicou, využívajúci biele svetlo prechádzajúce cez filter 15 mm 6 % roztoku dvojchrómanu draselného alebo sodíkové svetlo na odčítanie s presnosťou aspoň 0,1° na medzinárodnej sacharimetrickej stupnici.

- 5.4. Vodný kúpeľ regulovaný na 60 °C ± 1°C.

6. POSTUP

6.1. Kontrolné stanovenie

Na účely štandardizácie postupu, reagentov a zariadenia vykonajte dvakrát kontrolnú skúšku podľa nižšie uvedeného opisu, použijúc zmes 100 g mlieka a 18 g čistej sacharózy alebo zmes 110 g odstredeného mlieka a 18 g čistej sacharózy, každé zodpovedajúce 40 g kondenzovaného mlieka obsahujúceho 45 % sacharózy. Vypočítajte obsah cukru použitím vzorcov podľa bodu 7, dosadzujúc za M, F a P vo vzorci 1 množstvo použitého mlieka a obsahu tuku a proteínu v tomto mlieku a vo vzorci 2 za M hodnotu 40,00. Priemer zistených hodnôt sa nesmie líšiť o viac než 0,2 % zo 45,0 %.

6.2. Stanovenie

- 6.2.1. Odvážite s odchýlkou 10 mg približne 40 g dobre zmiešanej vzorky do 100 ml sklenej kadičky. Pridajte 50 ml horúcej vody (80 °C až 90 °C) a dobre zamiešajte.
- 6.2.2. Preneste zmes kvantitatívne do 200 ml odmernej nádoby, opláchnite kadičku postupným množstvom 60 °C teplej vody, až kým celkový objem dosiahne 120 až 150 ml. Zmiešajte a nechajte vychladnúť na izbovú teplotu.
- 6.2.3. Pridajte 5 ml zriedeného roztoku amoniaku (4.4). Znovu pomiešajte a potom nechajte stáť 15 minút.
- 6.2.4. Neutralizujte amoniak pridaním zodpovedajúceho množstva zriedeného roztoku kyseliny octovej (4.5). Vopred určite presný počet ml titráciou roztoku amoniaku s použitím bromotymolovej modrej ako indikátora (4.6). Premiešajte.
- 6.2.5. Za jemného miešania točením naklonenej fľašky pridajte 12,5 ml roztoku octanu zinočnatého (4.1).
- 6.2.6. Pridajte 12,5 ml roztoku hexakynoželezitanu draselného (4.2) takým istým spôsobom ako pri roztoku octanu.
- 6.2.7. Obsah fľašky upravte na 20 °C a doplňte do značky 200 ml vodou 20 °C teplou.

Poznámka:

Počas ktoréhokoľvek doteraz opísaného stupňa sa voda alebo iné reagenty majú pridávať takým spôsobom, aby sa zabránilo vzniku bublín, a s tým istým cieľom každé miešanie sa má vykonávať radšej točením nádoby ako trepaním. Ak sa vyskytnú vzduchové bubliny pred dosiahnutím objemu 200 ml, dajú sa odstrániť pomocou napojenia nádoby na výfuku a otáčaním.

- 6.2.8. Fľašku uzatvorte suchou zátkou a dôkladne premiešajte silným trepaním.
- 6.2.9. Nechajte stáť niekoľko minút a potom prefiltrujte cez suchý filtračný papie. Vyhodte prvých 25 ml filtrátu.
- 6.2.10. Priama polarizácia: určite optickú rotáciu filtrátu pri 20 °C ± 1 °C.
- 6.2.11. Inverzia: pipetou dajte 40 ml vyššie získaného filtrátu do 50 ml odmernej banky. Pridajte 6,0 ml 6,35 M kyseliny chlorovodíkovej alebo 7,5 ml 5,0 M kyseliny chlorovodíkovej (4.3).

Banku umiestnite do vodného kúpeľa pri 60 °C na 15 minút tak, aby celá banková časť bola ponorená. Miešajte rotačnými pohybmi počas prvých piatich minút, počas ktorých by obsah fľašky mal dosiahnuť teplotu kúpeľa. Ochlaďte na 20 °C a objem doplňte vodou 20 °C. Miešajte a nechajte stáť jednu hodinu pri tejto teplote.

6.2.12. *Invertná polarizácia*

Určite rotáciu invertovaného roztoku pri $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Ale v prípade, že sa teplota T tekutiny v polarizačnej skúmavke odlišuje o viac než $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ počas merania, musí sa uplatniť tepelná korekcia uvedená v bode 7.2).

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

7.1. **Spôsob výpočtu**

Obsah sacharózy sa vypočíta podľa nižšie uvedených vzorcov:

$$1. v = \frac{M}{100} (1.08 F + 1.55 P)$$

$$2. S = \frac{D - 1.25 I}{Q} \times \frac{V - v}{V} \times \frac{V}{L \times M} \%$$

kde:

S = obsah sacharózy;

M = hmotnosť navážky vzorky v gramoch;

F = obsah tuku vo vzorke v percentách;

P = obsah bielkovín ($N \times 6,38$) vo vzorke v percentách;

V = objem (ml), v ktorom bola vzorka rozpustená pred filtráciou;

v = korekcia na objem zrazeniny vzniknutej behom čírenia (ml);

D = menšiteľ údajov polarimetra, otáčavosti, pred inverziou;

I = menšiteľ polarimetra po inverzii;

L = dĺžka polarizačnej trubice (dm);

Q = inverzný faktor, ktorého hodnoty sú uvedené nižšie.

Poznámky:

- a) Ak je hmotnosť zahusteného mlieka presne 40,00 g, polarimeter pracuje so sodíkovým svetlom, odčíta sa v uhlových stupňoch a dĺžka polarizačnej trubice pri teplote $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ je 2 dm, tak sa obsah sacharózy normálneho zahusteného mlieka ($C = 9$) môže vypočítať podľa tohto vzorca:

$$S = (D - 1.25 I) \times (2.833 - 0.00612 F - 0.00878 P)$$

- b) Ak sa meranie vykonáva pri inej teplote T než $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, je potrebné získané hodnoty vynásobiť hodnotou:

$$(1 + 0.0037 (T - 20)).$$

7.2. **Hodnoty faktora inverzie Q**

Nasledujúce vzorce udávajú presné hodnoty pre Q, pre rôzne zdroje svetla s korekciami na koncentráciu a teplotu:

Sodíkové svetlo a polarimeter s uhlovými stupňami:

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

Ortuťové zelené svetlo a polarimeter s uhlovými stupňami:

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

Biele svetlo s bichromátovým filtrom a sacharimeter s medzinárodnou stupnicou na cukor:

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

Pre vyššie uvedené vzorce platí:

C = percento všetkých cukrov v invertovanom roztoku ako polarizovanom,

T = teplota invertovaného roztoku pri polarimetrickom čítaní.

Poznámka 1:

Percetunálny podiel všetkých cukrov C v invertovanom roztoku sa dá vypočítať z priameho odčítania a zmeny inverziou zvyčajným spôsobom, používajúc zvyčajné hodnoty pre špecifické rotácie sacharózy, laktózy a invertného cukru.

Korekcia $0,0006 (C - 9)$ atď. je presná iba vtedy, ak C je približne 9; pri normálne kondenzovanom mlieku sa táto korekcia dá zanedbať, ak sa C približuje k 9.

Poznámka 2:

Variácia teploty z 20 °C o 1 °C spôsobuje malý rozdiel pri priamom odčítaní, ale variácia vyššie 0,2 °C pri invertnom odčítaní vyžaduje korekciu. Korekcia – 0,0033 (T – 20) atď. je presná iba medzi 18 °C a 22 °C.

7.3. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch skúšok uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 0,3 g sacharózy na 100 g kondenzovaného mlieka.

METÓDA 6: URČENIE OBSAHU KYSELINY MLIEČNEJ A OBSAHU MLIEČNANOV**1. ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA**

Táto metóda určuje obsah kyseliny mliečnej a mliečnanov vyjadrených ako kyselina mliečna, a to:

- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku,
- v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku,
- v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku,
- v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku.

2. DEFINÍCIA

Obsah kyseliny mliečnej a mliečnanov v sušenom mlieku: obsah kyseliny mliečnej a mliečnanov vyjadrený ako kyselina mliečna podľa skúšky bližšie určenou metódou.

3. PRINCÍP

Tuk, proteín a laktóza sa odstránia súčasne z roztoku vzorky pridaním síranu meďnatého a hydroxidu vápnika a následnou filtráciou.

Kyselina mliečna a mliečnany vo filtráte sa premenia na acetyldehyd pomocou koncentrovanej kyseliny sírovej v prítomnosti síranu meďnatého.

Obsah kyseliny mliečnej sa určí kolorimetricky použitím p-hydroxydifenyly.

Obsah kyseliny mliečnej a mliečnanov sa vyjadrí ako MG kyseliny mliečnej na 100 g beztukovej sušiny.

4. REAGENTY

- 4.1. Roztok síranu meďnatého: rozpustite 250 g síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) vo vode a zriedte na 1 000 ml vodou.
- 4.2. Suspenzia hydroxidu vápnika
 - 4.2.1. V tretej miske rozdrvte 300 g hydroxidu vápnika [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] s vodou, celkove použite 900 ml. Suspenzia sa má pripraviť čerstvo pred použitím.
 - 4.2.2. Suspenzia hydroxidu vápnika: v tretej miske rozdrvte 300 g hydroxidu vápnika [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] s vodou, celkove použite 1 400 ml. Suspenzia sa má pripraviť čerstvo pred použitím.
- 4.3. Roztok kyseliny sírovej – síranu meďnatého: pridajte do 300 ml kyseliny sírovej, 95,9 % až 97,0 % (m/m) H_2SO_4 , 0,5 ml roztoku síranu meďnatého (4.1).
- 4.4. Roztok p-hydroxydifenyly ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$): za stáleho trepania a slabého nahrievania rozpustite 0,75 g p-hydroxydifenyly v 5 ml vodného roztoku hydroxidu sodného, obsahujúceho 5 g NaOH na 100 ml. Zriedte do 50 ml vodou v odmernej banke. Roztok uschovajte vo fľaške z hnedého skla na tmavom a chladnom mieste. Nepoužite pri zmene farby alebo výskyte zrážok. Skladovať maximálne 72 hodín.

- 4.5. Štandardný roztok kyseliny mliečnej: krátko pred použitím rozpustite 0,1067 g mliečnanu litného ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$) vo vode a zriedte na 1 000 ml v odmernej banke. 1 ml tohto roztoku zodpovedá 0,1 mg kyseliny mliečnej.
- 4.6. Štandardné rekonštituované (obnovené) mlieko: vopred urobte rozbor niekoľkých vzoriek vysokokvalitného sušeného mlieka. Na prípravu kalibračnej krivky vyberte vzorku, ktorá má najnižší obsah kyseliny mliečnej, neobsahujúc viac než 30 mg kyseliny mliečnej na 100 g beztukovej sušiny. Pokračujte postupom opísaným nižšie v bodoch 6.2.1 a 6.2.2.
5. ZARIADENIE
- 5.1. Analytická váha.
- 5.2. Spektrofotometer vhodný na odčítanie pri vlnovej dĺžke 570 nm.
- 5.3. Vodný kúpeľ pri $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.4. Tretia miska a tĺčik.
- 5.5. Filtračný papier (Schleicher a Schull 595, Whatman 1 alebo podobne).
- 5.6. Skúmavky na testy, Pyrex alebo podobne (rozmery 25 x 150 mm).

Poznámka:

Všetky pomôcky zo skla musia byť dokonale čisté a určené iba na použitie na túto skúšku. Pred umytím opláchnite pomôcky zo skla, obsahujúce vyzrážané zvyšky, koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou.

6. POSTUP

6.1. **Predbežná skúška**

Na vykonanie predbežnej skúšky dajte 30 ml vody do 50 ml skúmavky so stupnicou a postupujte podľa opisu v bodoch 6.2.4 až 6.2.11 vrátane. Ak sa pri meraní vody v predbežnej skúške prekročí ekvivalent 20 mg kyseliny mliečnej na 100 g beztukovej sušiny, vtedy treba prekontrolovať reagenty a nečisté reagenty alebo reagent treba nahradiť. Predbežnú skúšku vykonajte súčasne s analýzou vzorky.

6.2. **Stanovenie**

Poznámka:

Zabráňte kontaminácii nečistotami, hlavne slinami a sladkosťami.

- 6.2.1. Určite obsah beztukovej sušiny (a) g vzorky odpočítaním obsahu tuku (získaného metódou 4) a obsahu vlhkosti (získaného metódou 2) od 100.
- 6.2.2. Odvážte $\frac{1000}{(a - 10)}$ g vzorky s presnosťou na 0,1 g. Pridajte toto množstvo vzorky do 100 ml vody a dôkladne premiešajte.
- 6.2.3. Pipetou dajte 5 ml získaného roztoku do 50 ml skúmavky so stupnicou a zriedte vodou asi na 30 ml.
- 6.2.4. Počas trepania pomaly pridávajte 5 ml roztoku síranu meďnatého (4.1) a nechajte odstáť 10 minút.
- 6.2.5. Počas trepania pomaly pridávajte 5 ml suspenzie hydroxidu vápenatého (4.2.1) alebo 10 ml suspenzie hydroxidu vápenatého (4.2.2).
- 6.2.6. Zriedte na 50 ml vodou, silne potrepte, nechajte odstáť na 10 minút, potom prefiltrujte. Odhodte prvú časť filtrátu.
- 6.2.7. Pipetou dajte 1 ml filtrátu do skúmavky (5.6).
- 6.2.8. Pomocou byrety alebo pipety so stupnicou pridajte do skúmavky 6,0 ml roztoku kyseliny sírovej – síranu meďnatého (4.3). Premiešajte.
- 6.2.9. Počas piatich minút zohrievajte vo vriacom kúpeli. Vychladte pod tečúcou vodou na izbovú teplotu.

- 6.2.10. Pridajte dve kvapky reagentu p-hydroxydifenyly (4.4) a silne potrepte, aby sa reagent rovnako rozdelil do celej tekutiny. Umiestnite skúmavku do vodného kúpeľa pri $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; nechajte tam počas 15 minút a z času na čas potrepte.
- 6.2.11. Skúmavku dajte do vriaceho vodného kúpeľa na 90 sekúnd. Vychladte pod tečúcou vodou na izbovú teplotu.
- 6.2.12. Zmerajte optickú hustotu proti predbežnej skúške (6.1) do troch hodín pri vlnovej dĺžke špecifikovanej v bode 5.2.
- 6.2.13. V prípade, že optická hustota je vyššia, než je najvyšší bod štandardnej krivky, vtedy zopakujte skúšku použitím adekvátneho zriedenia filtrátu získaného podľa 6.2.6.

6.3. **Príprava štandardu**

- 6.3.1. Pipetou dajte 5 ml rekonštituovaného mlieka (4.6) do piatich 50 ml skúmaviek so stupnicou. Pipetou dajte do týchto skúmaviek jednotlivo 0, 1, 2, 3 a 4 ml štandardného roztoku (4.5), aby sa získal rozsah štandardov zodpovedajúcich 0, 20, 40, 60 a 80 mg pridanej kyseliny mliečnej na 100 g beztukovej sušiny sušeného mlieka.
- 6.3.2. Zriedte vodou asi na 30 ml a postupujte podľa opisu v bodoch 6.2.4 až 6.2.11.
- 6.3.3. Zmerajte optické hustoty štandardov (6.3.1) oproti predbežnému testu (6.1) pri vlnovej dĺžke bližšie určenej v bode 5.2. Zaznačte do diagramu optické hustoty proti množstvám kyseliny mliečnej daným v bode 6.3.1, t. j. 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg a 80 mg na 100 g beztukovej sušiny. Nakreslite najlepšiu vhodnú priamku cez tieto body a vyznačte štandardnú krivku posúvaním tejto čiary paralelne k sebe takým spôsobom, aby prechádzala cez počiatok.

7. **VYJADRENIE VÝPOČTU**

7.1. **Spôsob výpočtu**

Premeňte optickú hustotu nameranú podľa 6.2.12 alebo 6.2.13 na mg kyseliny mliečnej na 100 g beztukovej sušiny vo vzorke vo vzťahu ku štandardnej krivke. Vynásobte tento výsledok faktorom zriedenia v prípade, keď sa filtrát zriedil podľa bodu 6.2.13.

7.2. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch skúšok uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 8 mg kyseliny mliečnej na 100 g beztukovej sušiny pri obsahoch až do 80 mg. Pri vyšších hodnotách nesmie rozdiel presahovať 10 % najnižšej hodnoty.

METÓDA 7: STANOVENIE FOSFATÁZOVEJ AKTIVITY (UPRAVENÝ POSTUP PODĽA SANDERSA A SAGERA)

1. **ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA**

Táto metóda opisuje skúšku fosfatázovej aktivity:

- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku,
- v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku,
- v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku,
- v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku.

2. **DEFINÍCIA**

Aktivita fosfatázy v sušených druhoch mlieka je meradlom množstva prítomnej aktívnej alkalické fosfatázy. Je vyjadrená ako množstvo fenolu v μg uvoľnené 1 ml rekonštituovaného mlieka, ako to určuje nižšie uvedený postup.

3. PRINCÍP

Aktivita fosfatázy v sušených druhoch mlieka je určená schopnosťou fosfatázy uvoľňovať fenol z fenylfosfátu sodného. Množstvo fenolu uvoľnené podľa predpísaných podmienok sa určí spektrofotometrickým meraním farby vyvolanej Gibbovým reagentom.

4. REAGENTY

4.1. **Roztok A**

Tlmivý roztok boritanu barnatého: pH $10,6 \pm 0,1$ pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Rozpustite: 25,0 g hydroxidu barnatého $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ vo vode a zriedte na 500 ml.

Rozpustite: 11,0 g kyseliny boritej (H_3BO_3) vo vode a zriedte na 500 ml.

Zohrejte obidva roztoky na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zmiešajte.

Potrepte a nechajte vychlaďiť na izbovú teplotu.

Nastavte pH na $10,6 \pm 0,1$ pomocou roztoku hydroxidu barnatého a prefiltrujte.

Roztok skladujte v nádobe s tesniacou zátkou.

Pred použitím zriedte tlmivý roztok rovnakým množstvom vody.

4.2. **Roztok B:**

Tlmivý roztok vývoja farby.

Rozpustite: 6,0 g boritanu sodného (NaBO_2) (alebo 12,6 g $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 20,0 g chloridu sodného (NaCl) vo vode a zriedte na 1 000 ml vodou.

4.3. **Roztok C**

Tlmivý substrátový roztok.

4.3.1. Rozpustite 0,5 g fenylfosfátu sodného ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) v 4,5 ml roztoku B (4.2). Pridajte 2 kvapky roztoku E (4.5) a nechajte odstáť na 30 minút. Farbu extrahujte pomocou 2,5 ml butanolu (4.10). V prípade potreby opakujte extrakciu farby. Po separácii oddelte butanol. Tento roztok sa dá uchovať po niekoľko dní v chladničke. Vyviňte a extrahujte farbu ešte raz pred použitím.

4.3.2. Pipetou dajte 1 ml tohto roztoku do 100 ml odmernej banky a doplňte do objemu roztoku A. Tlmivý roztok pripravte bezprostredne pred použitím.

4.4. **Roztok D**

Zrážadlo.

Rozpustite 3,0 g síranu zinočnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0,6 g síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) vo vode a doplňte do 100 ml vodou.

4.5. **Roztok E**

Gibbov reagent.

Rozpustite 0,040 g 2,6-dibromchinónu 1,4 – chlórimidu ($\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2\text{BR}_2\cdot\text{NCl}$) v 10 ml 96 % etanolu. Roztok skladujte vo fľaške z tmavého skla v chladničke. Tento reagent vyradíte, ak sa odfarbil.

4.6. Tlmivý roztok farby

Zriedte 10 ml roztoku B (4.2), tlmivého roztoku vývoja farby, na 100 ml vodou.

4.7. Roztok síranu meďnatého

Rozpustite 0,05 g síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) vo vode a doplňte do 100 ml vodou.

4.8. Štandardný roztok fenolu

Rozpustite $0,200 \pm 0,001$ g čistého fenolu vo vode a doplňte do 100 ml vodou do odmernej banky. Tento roztok sa dá niekoľko mesiacov skladovať v chladničke. Zriedte 10 ml tohto roztoku na 100 ml vodou. Tento zriedený roztok obsahuje 200 µg fenolu v 1 ml a dá sa použiť na prípravu viacerých zriedených roztokov.

4.9. Vriaca destilovaná voda.

4.10. N-butanol.

5. ZARIADENIE

5.1. Analytická váha.

5.2. Vodný kúpeľ, termostaticky riadený pri $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3. Spektrofotometer vhodný na odčítanie pri vlnovej dĺžke 610 nm.

5.4. Filtračný papier (Schleicher a Schull 597, Whatman 42 alebo ekvivalentný filtračný papier).

5.5. Vodný kúpeľ, varný.

5.6. Hliníková fólia.

6. POSTUP

Upozornenie:

1. Zabráňte priamemu vystaveniu slnečnému svetlu.
2. Všetky predmety zo skla, zátky a prenosný materiál majú byť dokonale čisté. Odporúča sa, aby sa opláchli a vyvarili vo vode alebo aby sa ošetrili parou.
3. Zabráňte používaniu predmetov z plastických látok (napríklad zátok), pretože môžu obsahovať fenoly.
4. Sliny obsahujú fosfatázu; preto treba dôsledne zabrániť znečisteniu slinami.

6.1. **Príprava vzorky**

6.1.1. Odvážte s presnosťou na 0,1 g 10 g vzorky a rozpustite ju vo vode. Teplota pri rozpúšťaní za žiadnych okolností nesmie prekročiť $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2. **Stanovenie**

6.2.1. Do každej z dvoch testovacích skúmaviek dajte 1 ml obnoveného mlieka pripraveného podľa postupu uvedeného v bode 6.1.1.

6.2.2. Zohrejte počas dvoch minút jednu zo skúmaviek vo vriacej vode. Skúmavku a vodný kúpeľ (5.5) alebo napríklad pohár s hliníkovou fóliou (5.6) prikryte, aby ste sa uistili, že sa zohreje celá skúmavka. Dajte vychladnúť do studenej vody na izbovú teplotu. Použite túto skúmavku na predbežnú skúšku. Pri všetkých ďalších operáciách zaobchádzajte s obidvoma skúmavkami rovnako.

6.2.3. Pridajte 10 ml roztoku C (4.3.2). Pomiešajte a skúmavku položte do vodného kúpeľa pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5.2).

6.2.4. Udržujte v termostate vodného kúpeľa počas 60 minút a periodicky potrepte.

6.2.5. Skúmavky ihneď preneste do vriaceho vodného kúpeľa (5.5) a zohrievajte počas dvoch minút; nechajte vychladnúť v studenej vode na izbovú teplotu.

6.2.6. Pridajte 1 ml roztoku D (4.4), zamiešajte a prefiltrujte cez suchý filtračný papier; prvé filtráty odhódte, až kým sa nezíska čistá tekutina.

6.2.7. Dajte 5 ml z každého filtrátu do testovacích skúmaviek, pridajte 5 ml roztoku B (4.2) a 0,1 ml roztoku E (4.5). Premiešajte.

6.2.8. Nechajte vyvinúť zafarbenie pri izbovej teplote počas 30 minút, mimo priameho dosahu slnečného svetla.

6.2.9. odmerajte optickú hustotu roztoku vzorky v porovnaní s predbežnou skúškou pri vlnovej dĺžke uvedenej v bode 5.3.

6.2.10. Skúšku zopakujte, ak optická hustota roztoku je vyššia než pri štandardnej vzorke s $20\text{ }\mu\text{g}$ fenolu pripraveného podľa bodu 7.

Ak sa tento limit prekročí, zriedte vhodné množstvo obnoveného mlieka podľa bodu 6.1.1 vhodným množstvom tohto mlieka opatrne prevareného, ako je uvedené v bode 6.2.2, aby sa prítomná fosfatáza inaktivovala.

7. PRÍPRAVA ŠTANDARDNEJ KRIVKY
- 7.1. Do štyroch 100 ml odmerných baniek dajte pipetou 1, 3, 5 a 10 ml štandardného roztoku zriedeného podľa bodu 4.8 a objem doplňte vodou; tieto roztoky obsahujú jednotlivo 2, 6, 10 a 20 µg fenolu na ml.
- 7.2. Pipetou dajte 1 ml vody alebo 1 ml z každého štandardného roztoku (7.1) do testovacích skúmaviek, aby sa získala séria vzoriek obsahujúcich 0 (hodnota prípravnej skúšky získaná použitím 1 ml vody) – 2 – 6 – 10 a 20 µg fenolu.
- 7.3. Postupne dajte pipetou do každej testovacej skúmavky 1 ml roztoku síranu meďnatého (4.7), 5 ml tlmivého roztoku riedenia farby (4.6), 3 ml vody a 0,1 ml roztoku E (4.5). Zmiešajte.
- 7.4. Nechajte skúmavky stáť počas 30 minút pri izbovej teplote, mimo priameho dosahu slnečného svetla.
- 7.5. Odmerajte absorbanciu roztokov v každej skúmavke, porovnanú s hodnotami predbežnej skúšky pri vlnovej dĺžke označenej v bode 5.3.
- 7.6. Vypracujte štandardnú krivku zaznačením hodnôt absorbancie v porovnaní s množstvami fenolu v µg, ako je uvedené v bode 7.2.
8. VYJADRENIE VÝSLEDKOV
- 8.1. **Výpočet**
- 8.1.1. Premeňte hodnoty určené podľa 6.2.9 na µg fenolu, odvolávajúc sa na štandardnú krivku.
- 8.1.2. Vypočítajte aktivitu fosfatázy vyjadrenej ako µg fenolu na ml obnoveného mlieka podľa nasledujúceho vzorca:
- $$\text{aktivita fosfatázy} = 2,4 \text{ násobené } P$$
- kde P = množstvo fenolu v µg podľa bodu 8.1.1.
- 8.1.3. Ak treba zriediť, ako je uvedené v bode 6.2.10, vynásobte výsledky získané v bode 8.1.2 faktorom riedenia.
- 8.2. **Opakovateľnosť**
- Rozdiel medzi výsledkami dvoch skúšok uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 2 µg fenolu uvoľneného 1ml obnoveného mlieka.

METÓDA 8: URČENIE AKTIVITY FOSFATÁZY (POSTUP PODĽA ASCHAFFENBURGA A MÜLLENA)

1. ROZSAH A OBLASŤ UPLATNENIA
- Táto metóda opisuje určenie aktivity fosfatázy:
- v sušenom vysokotučnom mlieku alebo vysokotučnom práškovom mlieku,
 - v sušenom plnotučnom mlieku alebo plnotučnom práškovom mlieku,
 - v sušenom čiastočne odstredenom mlieku alebo čiastočne odstredenom práškovom mlieku,
 - v sušenom odstredenom mlieku alebo odstredenom práškovom mlieku.
2. DEFINÍCIA
- Aktivita fosfatázy sušených druhov mlieka je meradlom množstva aktívnej alkalické fosfatázy prítomnej vo výrobku. Je vyjadrená ako množstvo p-nitrofenolu v mikrogramoch uvoľnené 1 ml obnovené vzorky podľa opísaných podmienok.
3. PRINCÍP
- Vzorka obnoveného mlieka sa zriedi tlmivým substrátom pri pH 10,2 a dá do inkubátora pri teplote 37 °C na dve hodiny. Každá alkalická fosfatáza prítomná vo vzorke uvoľní za týchto podmienok p-nitrofenol z pridaného p-nitrofenylfosfátu sodného. Uvoľnený p-nitrofenol sa určí priamym porovnaním so štandardnými farebnými sklami v jednoduchom komparátore využívajúcom odrazené svetlo.

4. REAGENTY

4.1. Tlmivý roztok uhličitanu sodného.

Rozpustite 3,5 g bezvodého uhličitanu sodného a 1,5 g kyslého uhličitanu sodného vo vode a zriedte do 1 000 ml vodou v odmernej banke.

4.2. Tlmivý roztok.

Rozpustite 1,5 g p-nitrofenylfosfátu sodného v tlmivom roztoku uhličitanu sodného – kyslého uhličitanu sodného (4.1) a zriedte na 1 000 ml tlmivým roztokom (4.1) v odmernej banke.

Tento roztok je stály, ak sa skladuje v chladničke ($\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) počas 1 mesiaca, pri takto skladovaných roztokoch však treba vykonávať test na kontrolu farby – pozri bod 6, výstražné upozornenie č. 3.

4.3. Číracie roztoky.

4.3.1. Roztok síranu zinočnatého.

Rozpustite 30,0 g síranu zinočnatého (ZnSO_4) vo vode a zriedte do 100 ml vodou v odmernej banke.

4.3.2. Roztok kyanoželezitanu draselného (II).

Rozpustite 17,2 g kyanoželezitanu draselného (II) $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ a zriedte do 100 ml vodou v odmernej banke.

5. PRÍSTROJE

5.1. Analytická váha.

5.2. Vodný kúpeľ, termostaticky riadený pri $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.5.3. Komparátor so špeciálnym diskom obsahujúcim štandardné farebné sklá kalibrované na μg p-nitrofenol na ml mlieka a 2 x 25 mm kyvety.

6. POSTUP

Výstraha:

1. Použité skúmavky sa po použití musia vyprázdniť, opláchnuť vodou, umyť v horúcej vode obsahujúcej alkalický čistiaci prostriedok a následne sa musia dôkladne opláchnuť v čistej horúcej vode z vodovodu. A nakoniec, pred použitím sa musia opláchnuť vo vode a vysušiť.

Pipety sa musia dôkladne opláchnuť v čistej studenej vode z vodovodu ihneď po použití, pred použitím sa musia opláchnuť a vysušiť.

2. Zátky na skúmavky sa musia dôkladne opláchnuť v horúcej vode z vodovodu bezprostredne po použití, potom sa musia dať na dve minúty do vriacej vody.

3. Tlmivý roztok (4.2) má zostať stabilný aspoň počas jedného mesiaca, ak sa skladuje v chladničke pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ alebo pri nižšej teplote. Každá nestabilita sa vyznačuje vytvorením žltého zafarbenia. Ak sa výsledky testu odčítavajú na základe kontroly prevareného výrobku s obsahom toho istého tlmivého roztoku, tak sa odporúča, aby sa roztok nepoužil, ak sa vyskytuje zafarbenie presahujúce $10\text{ }\mu\text{g}$, ak sa odčítava v prvej 25 mm kyvete v komparátore používajúcom destilovanú vodu v druhej 25 mm kyvete.

4. Použite samostatnú pipetu na každú vzorku a zabráňte znečisteniu pipety slinami.

5. Pokus nesmie byť nikdy vystavený priamemu slnečnému svetlu.

6.1. **Príprava vzorky**

Rozpustite 10 g prášku v 90 ml vody. Teplota pri rozpúšťaní prášku nesmie presahovať $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2. Stanovenie

- 6.2.1. Pipetou dajte 15 ml tlmivého roztoku (4.2) do čistej, suchej skúmavky, potom pridajte 2 ml vzorky obnoveného mlieka (6.1), ktoré sa má testovať. Zazátkujte skúmavku, premiešajte obracaním a vložte do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C (5.2).
- 6.2.2. Súčasne vložte do vodného kúpeľa kontrolnú skúmavku obsahujúcu 15 ml tlmivého substrátu a 2 ml prevarenej obnovenej vzorky, podobnej, ako sa testuje.
- 6.2.3. Po dvoch hodinách vyberte obidve skúmavky z vodného kúpeľa, pridajte 0,5 ml zrážadla síranu zinočnatého (4.3.1), zatvorte zátkou, silne potrepte a nechajte odstáť na tri minúty. Pridajte 0,5 ml zrážadla hexakynoželzitanu draselného (4.3.2), dôkladne premiešajte a prefiltrujte cez skladaný filtračný papier (5.4) a čistý filtrát zachyťte do čistej skúmavky.
- 6.2.4. Filtrát preneste do 25 mm kyvety a porovnajte s filtrátom prevarenej testovanej vzorky v komparátore použitím špeciálneho disku (5.3).

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV**7.1. Výpočet**

Priame odčítanie získané podľa bodu 6.2.4 sa zaznamená ako µg p-nitrofenolu na ml vzorky alebo na ml obnovenej vzorky.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch skúšok uskutočnených súčasne alebo rýchlo za sebou na tej istej vzorke tým istým analytikom za takých istých podmienok nesmie prekročiť 2 µg p-nitrofenolu uvoľneného 1 ml obnoveného mlieka.
