

31979L1067

24.12.1979

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 327/29

PRVNÍ SMĚRNICE KOMISE

ze dne 13. listopadu 1979,

kteřou se stanoví analytické metody Společenství pro zkoušení určitých druhů zahuštěného a sušeného mléka určeného k lidské spotřebě

(79/1067/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 76/118/EHS ze dne 18. prosince 1975 o sbližování právních předpisů členských států týkajících se určitých druhů zahuštěného a sušeného mléka určeného k lidské spotřebě⁽¹⁾, a zejména na článek 11 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že článek 11 směrnice 76/118/EHS požaduje, aby složení určitých druhů zahuštěného a sušeného mléka bylo ověřováno analytickými metodami Společenství;

vzhledem k tomu, že je žádoucí přijmout první řadu metod, jejichž ověřování bylo dokončeno;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potraviny,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy přijmou všechna opatření nezbytná k tomu, aby analýzy nezbytné pro ověření kritérií stanovených v příloze I byly prováděny metodami popsányymi v příloze II.

Článek 2

Pokud jsou pro jednotlivá stanovení uvedeny alternativní metody, může být vzorek analyzován kteroukoliv z těchto metod. V protokolu o zkoušce vzorku podle přílohy II musí být použita metoda uvedena.

Článek 3

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí do osmnácti měsíců od oznámení této směrnice. Neprodleně o tom uvědomí Komisi.

Článek 4

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 13. listopadu 1979.

Za Komisi

Étienne DAVIGNON

člen Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. L 24, 30.1.1976, s. 9.

PŘÍLOHA I

ROZSAH POUŽITÍ PRVNÍCH ANALYTICKÝCH METOD SPOLEČENSTVÍ PRO SMĚRNICI O URČITÝCH DRUŽÍCH ZAHUŠTĚNÉHO A SUŠENÉHO MLÉKA

I. **Obecná ustanovení**II. **Stanovení sušiny**

- v zahuštěném neslazeném vysokotučném mléce (metodou 1 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném neslazeném mléce (metodou 1 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném neslazeném částečně odtučněném mléce (metodou 1 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném neslazeném odtučněném mléce (metodou 1 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném mléce (metodou 1 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném částečně odtučněném mléce (metodou 1 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném odtučněném mléce (metodou 1 uvedenou v příloze II).

III. **Stanovení vlhkosti**

- v sušeném vysokotučném mléce (metodou 2 uvedenou v příloze II),
- v sušeném plnotučném mléce (metodou 2 uvedenou v příloze II),
- v sušeném částečně odtučněném mléce (metodou 2 uvedenou v příloze II),
- v sušeném odtučněném mléce (metodou 2 uvedenou v příloze II).

IV. **Stanovení tuku**

- v zahuštěném neslazeném vysokotučném mléce (metodou 3 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném neslazeném mléce (metodou 3 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném neslazeném částečně odtučněném mléce (metodou 3 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném neslazeném odtučněném mléce (metodou 3 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném mléce (metodou 3 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném částečně odtučněném mléce (metodou 3 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném odtučněném mléce (metodou 3 uvedenou v příloze II),
- v sušeném vysokotučném mléce (metodou 4 uvedenou v příloze II),
- v sušeném plnotučném mléce (metodou 4 uvedenou v příloze II),
- v sušeném částečně odtučněném mléce (metodou 4 uvedenou v příloze II),
- v sušeném odtučněném mléce (metodou 4 uvedenou v příloze II).

V. **Stanovení sacharózy**

- v zahuštěném slazeném mléce (metodou 5 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném částečně odtučněném mléce (metodou 5 uvedenou v příloze II),
- v zahuštěném slazeném odtučněném mléce (metodou 5 uvedenou v příloze II).

VI. **Stanovení kyseliny mléčné a mléčnanů**

- v sušeném vysokotučném mléce (metodou 6 uvedenou v příloze II),
- v sušeném plnotučném mléce (metodou 6 uvedenou v příloze II),
- v sušeném částečně odtučněném mléce (metodou 6 uvedenou v příloze II),
- v sušeném odtučněném mléce (metodou 6 uvedenou v příloze II).

VII. **Stanovení aktivity fosfatázy**

- v sušeném vysokotučném mléce (metodou 7 nebo 8 uvedenou v příloze II),
- v sušeném plnotučném mléce (metodou 7 nebo 8 uvedenou v příloze II),
- v sušeném částečně odtučněném mléce (metodou 7 nebo 8 uvedenou v příloze II),
- v sušeném odtučněném mléce (metodou 7 nebo 8 uvedenou v příloze II).

PŘÍLOHA II

ANALYTICKÉ METODY TÝKAJÍCÍ SE SLOŽENÍ URČITÝCH DRUHŮ ZAHUŠTĚNÝCH A SUŠENÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ URČENÝCH K LIDSKÉ SPOTŘEBĚ

OBEČNÁ USTANOVENÍ

1. PŘÍPRAVA VZORKU K CHEMICKÉ ANALÝZE

1.1 Zahuštěné neslazené vysokotučné mléko

Zahuštěné neslazené mléko

Zahuštěné neslazené částečně odtučněné mléko

Zahuštěné neslazené odtučněné mléko

Uzavřená plechovka se protřepe a opakovaně obrátí. Plechovka se otevře a mléko se zvolna přelije do druhé nádoby (vzorkovnice), která je hermeticky uzavíratelná, a promíchá se opakovaným přeléváním. Je třeba zajistit, aby byl do vzorku vmíchán veškerý tuk a veškeré mléko ulpívající na stěnách, víčku a na dně plechovky. Nádoba se uzavře. Pokud obsah není homogenní, nádoba se zahřívá na vodní lázni při 40 °C. Každých 15 minut se nádoba důkladně protřepe. Po dvou hodinách se nádoba z vodní lázně vyjme a nechá se vychladnout na laboratorní teplotu. Víčko se sejme a obsah nádoby se důkladně promíchá lžičkou nebo špachtlí (pokud došlo k oddělení tuku, zkoušku nelze provádět). Nádoba se uloží v chladu.

1.2 Zahuštěné slazené mléko

Zahuštěné slazené částečně odtučněné mléko

Zahuštěné slazené odtučněné mléko

Plechovky: Uzavřená plechovka se zahřívá na vodní lázni při teplotě 30 až 40 °C po dobu 30 minut. Po otevření plechovky se mléko pečlivě promíchá špachtlí nebo lžící krouživými pohyby a pohyby nahoru a dolů, aby se horní a spodní vrstvy dokonale promísily s celým obsahem. Je třeba zajistit, aby bylo do vzorku vmícháno veškeré mléko ulpívající na stěnách, víčku a na dně plechovky. Obsah se kvantitativně převede do druhé nádoby opatřené vzduchotěsným víčkem. Nádoba se uzavře a uloží v chladu.

Tuby: Konec tuby se uřízne a její obsah se převede do nádoby opatřené vzduchotěsným víčkem. Tuba se podélně rozřízne a materiál ulpělý na vnitřních stěnách se seškrábne a s ostatním obsahem opatrně promíchá. Nádoba se uloží v chladu.

1.3 Sušené vysokotučné mléko

Sušené plnotučné mléko

Sušené částečně odtučněné mléko

Sušené odtučněné mléko

Sušené mléko se převede do čisté a suché nádoby (opatřené vzduchotěsným víčkem), která má dvojnásobný objem, než je objem prášku. Nádoba se ihned uzavře a opakovaným třepáním a obracením se vzorek řádně promíchá. Během přípravy vzorku je nutno co možná nejvíce zabránit, aby bylo sušené mléko vystaveno vzduchu, aby se snížila absorpce vlhkosti na minimum.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

2.1 Voda

2.1.1 Pokud je zmiňována voda pro účely rozpouštění, ředění nebo mytí, musí být použita voda destilovaná nebo demineralizovaná alespoň rovnocenné čistoty.

2.1.2 Pokud je v textu odkaz na „rozpouštění“ nebo „ředění“ bez dalšího upřesnění, rozumí se „rozpouštění ve vodě“ a „ředění vodou“.

2.2 Chemikálie

Všechny používané chemikálie musí být alespoň čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 3.1 **Seznamy přístrojů a pomůcek**

Seznamy přístrojů a pomůcek obsahují pouze položky určené ke zvláštnímu použití a položky se zvláštní specifikací.
- 3.2 **Analytické váhy**

Analytické váhy s přesností vážení alespoň na 0,1 mg.
4. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ
- 4.1 **Výpočet procent**

Není-li uvedeno jinak, výsledky se vyjadřují v procentech hmotnosti vzorku dodaného do laboratoře.
- 4.2 **Počet platných číslic**

Výsledek nesmí obsahovat více platných číslic, než ke kolika opravňuje přesnost použité analytické metody.
5. PROTOKOL O ZKOUŠCE
- V protokolu o zkoušce musí být uvedena použitá analytická metoda a získané výsledky. Kromě toho musí být uvedeny všechny podrobnosti postupu, které nejsou v této metodě uvedeny nebo jsou volitelné, a také jakékoliv okolnosti, které mohly ovlivnit získané výsledky.

Protokol o zkoušce musí obsahovat všechny údaje potřebné pro úplnou identifikaci vzorku.

METODA 1: STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY

(sušárna 99 °C)

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu sušiny:

 - v zahuštěném neslazeném vysokotučném mléce,
 - v zahuštěném neslazeném mléce,
 - v zahuštěném neslazeném částečně odtučněném mléce,
 - v zahuštěném neslazeném odtučněném mléce,
 - v zahuštěném slazeném mléce,
 - v zahuštěném slazeném částečně odtučněném mléce,
 - v zahuštěném slazeném odtučněném mléce.
2. DEFINICE

Obsah sušiny v zahuštěném mléce: obsah sušiny stanovený uvedenou metodou.
3. PODSTATA METODY

Znamé množství vzorku se zředí vodou, smíchá s pískem a usuší při teplotě 99 °C ± 1 °C. Hmotnost zbytků po vysušení vzorku znamená hmotnost sušiny a vyjadřuje se v procentech hmotnosti vzorku.
4. REAKČNÍ ČINIDLA

Křemenný nebo mořský písek upravený kyselinou chlorovodíkovou (velikost zrn: 0,18 až 0,5 mm, tj. taková zrna, která projdou sítím s velikostí ok 0,5 mm a jsou zadržena sítím s velikostí ok 0,18 mm). Měl by splňovat požadavky níže uvedené kontrolní zkoušky:

Asi 25 g písku se zahřívá v sušárně (5.3) asi 2 hodiny podle postupu uvedeného v bodech 6.1 až 6.3. Po přidání asi 5 ml vody se písek znovu zahřívá 2 hodiny v sušárně, zchladí se a znovu zváží. Rozdíl těchto dvou hmotností nesmí překročit 0,5 mg.

V případě nutnosti se písek ponechá ponořený v dvacetipětiprocentní kyselině chlorovodíkové po dobu tří dnů a občas se promíchá. Poté se promývá vodou, dokud nezmizí kyselá reakce, případně dokud není promývací voda bez chlóru. Písek se vysuší při 160 °C a výše uvedená zkouška se zopakuje.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 5.1 Analytické váhy.
- 5.2 Kovové misky, nejlépe niklové, hliníkové nebo z korozi-vzdorné oceli. Misky musí mít dobře těsnící, ale snadno odnímatelná víčka. Vhodné jsou misky o průměru 60 až 80 mm a výšce asi 25 mm.
- 5.3 Dobře odvětraná sušárna pracující při atmosférickém tlaku, s termostatickou regulací teploty ($99\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$). Teplota by měla být rovnoměrná v celém pracovním prostoru.
- 5.4 Exsikátor s čerstvě aktivovaným silikagelem s indikátorem obsahu vlhkosti nebo s jiným rovnocenným vysoušedlem.
- 5.5 Skleněné tyčinky s jedním plochým koncem a o takové délce, aby je bylo možné snadno umístit do kovové misky (5.2).
- 5.6 Vroucí vodní lázeň.

6. POSTUP

- 6.1 Do misky (5.2) se umístí asi 25 g písku (4) a krátká tyčinka (5.5).
- 6.2 Otevřená miska s obsahem a víčko se po dobu 2 hodin suší v sušárně (5.3).
- 6.3 Miska se uzavře víčkem, přenes se do exsikátoru (5.4), nechá se vychladnout na teplotu váhovny a zváží se s přesností na 0,1 mg (M_0).
- 6.4 Miska se nakloní a písek se přesune na stranu. Na uprázdňené místo se přenes asi 1,5 g vzorku zahuštěného slazeného mléka nebo 3,0 g zahuštěného neslazeného mléka. Miska se uzavře víčkem a zváží se s přesností na 0,1 mg (M_1).
- 6.5 Víčko se odejme, přilije se 5 ml vody a obsah se zamíchá tyčinkou. Nejdříve se zamíchají tekutiny a poté písek s tekutinami. Tyčinka se ve směsi ponechá.
- 6.6 Miska se umístí na vroucí vodní lázeň (5.6) a voda se nechá odpařit. Obvykle to trvá 20 minut. Směs se občas promíchá tyčinkou, aby byla dobře provzdušněná a aby neztuhla v pevnou hmotu. Tyčinka se položí do misky.
- 6.7 Miska i víčko se umístí do sušárny na dobu 1,5 hodiny.
- 6.8 Miska se přikryje víčkem, přesune do exsikátoru (5.4), nechá se vychladnout na teplotu váhovny zváží se s přesností na 0,1 mg.
- 6.9 Zavřená miska se přemístí do sušárny, víčko se odklopí a miska i víčko se ještě hodinu zahřívají v sušárně.
- 6.10 Zopakuje se postup popsaný v bodě 6.8.
- 6.11 Postup popsaný v bodech 6.9 a 6.10 se opakuje tak dlouho, dokud rozdíl hmotností dvou po sobě následujících vážení není menší než 0,5 mg nebo dokud se hmotnost nezačne zvětšovat. Dojde-li ke zvětšení hmotnosti, použije se ve výpočtu (7.1) nejnižší zjištěná hmotnost. Konečná hmotnost se označí jako M_2 (v gramech).

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

7.1 Postup výpočtu

Obsah sušiny vyjádřený v procentech hmotnosti vzorku je dán vzorcem:

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

kde:

M_0 = hmotnost misky, víčka a pisku (g) po provedení postupu 6.3,

M_1 = hmotnost misky, víčka, pisku a vzorku (g) po provedení postupu 6.4,

M_2 = hmotnost misky, víčka, pisku a vysušeného vzorku (g) po provedení postupu 6.11.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 0,2 g sušiny na 100 g výrobku.

8. VÝPOČET OBSAHU CELKOVÉ MLÉČNÉ SUŠINY A TUKUPROSTÉ MLÉČNÉ SUŠINY

8.1 Celkový obsah mléčné sušiny v zahuštěném slazeném mléce se vypočítá takto:

Celkový obsah sušiny (podle metody 1 uvedené v příloze II) minus obsah sacharózy (podle metody 5 uvedené v příloze II).

8.2 Obsah tukuprosté mléčné sušiny v zahuštěném slazeném mléce se vypočítá takto:

Celkový obsah sušiny (podle metody 1 uvedené v příloze II) minus obsah sacharózy (podle metody 5 uvedené v příloze II) a obsah tuku (podle metody 3 uvedené v příloze II).

8.3 Obsah tukuprosté mléčné sušiny zahuštěného neslazeného mléka se vypočítá takto:

Celkový obsah sušiny (podle metody 1 uvedené v příloze II) minus obsah tuku (podle metody 3 uvedené v příloze II).

METODA 2: STANOVENÍ VHLKOSTI

(sušárna 102 °C)

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda slouží ke stanovení úbytku hmotnosti při vysoušení:

- sušeného vysokotučného mléka,
- sušeného plnotučného mléka,
- sušeného částečně odtučněného mléka,
- sušeného odtučněného mléka.

2. DEFINICE

Obsah vlhkosti: úbytek hmotnosti sušením vzorku stanovený touto metodou.

3. PODSTATA METODY

Stanoví se úbytek hmotnosti zkušebního vzorku po vysoušení v sušárně při atmosférické teplotě 102 °C ± 2 °C do konstantní hmotnosti. Úbytek hmotnosti se vypočítá v procentech hmotnosti vzorku.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1. Analytické váhy.

4.2. Misky, nejlépe niklové, hliníkové, z korozivzdorné oceli nebo skleněné. Misky musí mít dobře těsnící, ale snadno odnímatelná víčka. Vhodné jsou misky o průměru 60 až 80 mm a výšce asi 25 mm.

4.3. Dobře odvětraná sušárna pracující při atmosférickém tlaku, s termostatickou regulací teploty ($102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Teplota by měla být rovnoměrná v celém pracovním prostoru.

4.4. Exsikátor s čerstvě aktivovaným silikagelem s indikátorem obsahu vlhkosti nebo jiným rovnocenným vysoušedlem.

5. POSTUP

5.1. Otevřená miska (4.2) s víčkem se umístí do sušárny (4.3) a zahřívá se po dobu asi 1 hodiny.

5.2. Miska se uzavře víčkem a přenese do exsikátoru (4.4), kde se nechá vychladnout na teplotu váhovny a zváží se s přesností na 0,1 mg (M_0).

5.3. Do misky se převedou asi 2 g vzorku sušeného mléka, miska se co nejrychleji uzavře a zváží s přesností na 0,1 mg (M_1).

5.4. Miska se otevře a spolu s víčkem se umístí do sušárny, kde se ponechá po dobu 2 hodin.

5.5. Miska se uzavře víčkem, přenese do exsikátoru, nechá se vychladnout na teplotu váhovny a co nejrychleji se zváží s přesností na 0,1 mg.

5.6. Miska se otevře a spolu s víčkem zahřívá v sušárně po dobu 1 hodiny.

5.7. Zopakuje se postup v bodě 5.5.

5.8. Postup v bodě 5.6 a 5.5 se opakuje tak dlouho, dokud rozdíl hmotností dvou po sobě následujících vážení není menší než 0,5 mg nebo dokud se hmotnost nezačne zvětšovat. Dojde-li ke zvětšení hmotnosti, použije se ve výpočtu (6.1) nejnižší zjištěná hmotnost. Konečná hmotnost se označí jako M_2 (v gramech).

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

6.1. Postup výpočtu

Úbytek hmotnosti při vysoušení vzorku vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočte podle vzorce:

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

kde:

M_0 = hmotnost misky a víčka (g) po provedení postupu 5.2.,

M_1 = hmotnost misky, víčka a vzorku (g) po provedení postupu 5.3.,

M_2 = hmotnost misky, víčka a konečného vzorku (g) po provedení postupu 5.5.

6.2. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 0,1 g vlhkosti na 100 g výrobku.

METODA 3: STANOVENÍ OBSAHU TUKU V ZAHUŠTĚNÉM MLÉČE (PODLE RÖSE-GOTTLIEBA)**1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ**

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu tuku:

- v zahuštěném neslazeném vysokotučném mléce,
- v zahuštěném neslazeném mléce,
- v zahuštěném neslazeném částečně odtučněném mléce,
- v zahuštěném neslazeném odtučněném mléce,
- v zahuštěném slazeném mléce,
- v zahuštěném slazeném částečně odtučněném mléce,
- v zahuštěném slazeném odtučněném mléce.

2. DEFINICE

Obsah tuku v zahuštěném mléce: obsah tuku stanovený touto metodou.

3. PODSTATA METODY

Obsah tuku se stanoví jeho extrakcí z amoniakálně alkoholového roztoku vzorku diethyletherem a petroletherem, následným odpařením rozpouštědel, zvážením zbytku a výpočtem v procentech hmotnosti vzorku podle pravidla Röse-Gottlieba.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí vyhovovat požadavkům stanoveným v bodě týkajícím se slepého pokusu (6.1). V případě nutnosti se činidla redestilují za přítomnosti 1 g mléčného tuku na 100 ml rozpouštědla.

- 4.1 Roztok amoniaku obsahující asi 25 % hmot. NH_3 (hustota při 20 °C je přibližně 0,91 g/ml) nebo silnější roztok o známé koncentraci.
- 4.2 96 ± 2 % ethanol nebo, není-li k dispozici, ethanol denaturovaný methanolem, ethylmethylketonem nebo petroletherem.
- 4.3 Diethylether neobsahující peroxidy.

Poznámka 1:

Zkouška na obsah peroxidů se provede tak, že se k 10 ml etheru v malém skleněném válci opatřeném zátkou a předem vypláchnutém etherem přidá 1 ml čerstvě připraveného desetiprocentního roztoku jodidu draselného, obsah se protřepá a ponechá 1 minutu stát. Žluté zabarvení kterékoliv vrstvy je nepřipustné.

Poznámka 2:

Z diethyletheru lze odstranit peroxidy vložení vlhké zinkové fólie, která byla předtím na 1 minutu zcela ponořena do zředěného okyseleného roztoku síranu měďnatého a poté opláchnuta vodou. Na litr se použije asi 8 000 mm² zinkové fólie v podobě proužků, jejichž délka dosahuje alespoň do poloviny nádoby.

- 4.4 Petrolether s bodem varu v rozmezí 30 až 60 °C.
- 4.5 Směsné rozpouštědlo, připravené krátce před použitím smícháním stejných objemů diethyletheru (4.3) a petroletheru (4.4). (Pokud je uvedeno použití směsného činidla, může být činidlo nahrazeno samotným diethyletherem nebo petroletherem).
- 5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY**
- 5.1 Analytické váhy.
- 5.2 Vhodné extrakční zkušavky nebo baňky opatřené zabroušenými skleněnými zátkami nebo jinými uzávěry, které jsou odolné proti používaným rozpouštědlům.
- 5.3 Tenkostěnné baňky s plochým dnem o objemu 150 až 250 ml.

- 5.4 Dobře odvětrávaná sušárna pracující při atmosférickém tlaku, s termostatickou regulací teploty (nastavená na teplotu $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 5.5 Varná tělíska zbavená tuku, neporézní a při použití se nedrobící, například skleněné kuličky nebo kousky karbidu křemíku (použití materiálu je volitelné, viz bod 6.2.1).
- 5.6 Sifon s možností připojení na používané extrakční zkumavky.
- 5.7 Odstředivka (volitelná).

6. POSTUP

6.1 Slepý pokus

Současně se stanovením obsahu tuku ve vzorku se provede slepý pokus s 10 ml vody, s použitím stejného typu extrakčního zařízení, stejných reakčních činidel (včetně jejich množství) a podle stejného postupu, který je popsán dále, s výjimkou bodu 6.2.2. Pokud výsledek slepého pokusu přesahuje hodnotu 0,5 mg, měla by být činidla zkontrolována a znečištěná činidla by měla být přečištěna nebo vyměněna.

6.2. Stanovení

- 6.2.1 Baňka (5.3) (je-li to nezbytné, společně s varnými tělíska (5.5) usnadňujícími klidný var v průběhu následného odpařování rozpouštědla) se suší v sušárně (5.4) po dobu 0,5 až 1 hodiny. Baňka se poté nechá vychladnout na teplotu váhovny a zváží se s přesností na 0,1 mg.
- 6.2.2 Připravený vzorek se promíchá a ihned se s přesností na 1 mg naváží 2 až 2,5 g vzorku (jedná-li se o mléko slazené), popřípadě 4 až 5 g vzorku (jedná-li se o mléko neslazené) přímo nebo diferenčně do extrakční zkumavky nebo baňky (5.2). Navážka se doplní vodou do 10,5 ml a opatrně se protřepe při mírném zahřívání ($40\text{ až }50\text{ }^{\circ}\text{C}$), dokud se výrobek zcela nerozpustí. Vzorek musí být zcela dispergován, jinak se musí stanovení zopakovat.
- 6.2.3 Přidá se 1,5 ml dvacetipětiprocentního amoniaku (4.1) nebo příslušné množství koncentrovanějšího roztoku a vše se důkladně promíchá.
- 6.2.4 Přidá se 10 ml ethanolu (4.2) a tekutiny se opatrně, ale důkladně promíchají v otevřené extrakční baňce.
- 6.2.5 Přidá se 25 ml diethyletheru (4.3) a extrakční baňka se ochladí pod tekoucí vodou, uzavře se a důkladně se po dobu 1 minuty protřepává a převrací.
- 6.2.6 Extrakční baňka se opatrně odzátkuje a přidá se 25 ml petroletheru (4.4) tak, aby prvních několik mililitrů opláchlo zátku a vnitřek hrdla baňky a aby tato tekutina stékala do baňky. Extrakční baňka se opět zazátkuje a po dobu 30 sekund se protřepává a převrací. Nepoužívá-li se v postupu 6.2.7 odstředování, neprotřepává se příliš silně.
- 6.2.7 Extrakční baňka se nechá stát tak dlouho, dokud vrchní vrstva etheru není čirá a jasně oddělená od spodní vodní vrstvy. K separaci je možno případně použít vhodnou odstředivku (5.7).

Poznámka:

Při použití odstředivky, která není poháněna třífázovým motorem, může dojít k jiskření, a v tom případě je třeba dávat pozor, aby etherové páry unikající například z prasklé zkumavky neexplodovaly nebo se nevznítily.

- 6.2.8 Extrakční baňka se odzátkuje a vnitřek hrdla baňky se vypláchne několika mililitry směsného rozpouštědla (4.5) tak, aby tato kapalina stékala do baňky. Dekantací nebo pomocí sifonu (5.6) se do připravené baňky (6.2.1) opatrně převede z extrakčního baňky co nejvíce supernatantu.

Poznámka:

Pokud se převedení neprovádí pomocí sifonu, může být potřeba přidat malé množství vody, aby se rozhraní mezi dvěma vrstvami zvýraznilo, a tak se usnadnila dekantace.

- 6.2.9 Zevní i vnitřní stěna hrdla baňky a konec a spodní část sifonu se opláchne několika mililitry směsného rozpouštědla (4.5). Kapalina z vnější strany extrakční baňky se nechá stéci do baňky a kapalina z vnitřní strany hrdla a ze sifonu do extrakčního baňky.

- 6.2.10 Proveďte se druhá extrakce opakováním postupů 6.2.5 až 6.2.9 včetně, avšak pouze s použitím pouze 15 ml diethyletheru a 15 ml petroletheru.
- 6.2.11 Proveďte se třetí extrakce opakováním postupu 6.2.10, ale bez konečného oplachování (6.2.9).
- Poznámka:*
U rozborů vzorků zahuštěného neslazeného odtučněného mléka a zahuštěného slazeného odtučněného mléka není třetí extrakce povinná.
- 6.2.12 Opatrně se odpaří nebo oddestiluje co největší množství rozpouštědla (včetně ethanolu). Jedná-li se o baňku malého objemu, bude nutno určité množství rozpouštědla odstranit výše popsáním postupem po každé extrakci.
- 6.2.13 Není-li již z baňky cítit rozpouštědlo, položte baňku na bok a umístěte ji na 1 hodinu do sušárny.
- 6.2.14 Baňka se vyjme ze sušárny, nechá se vychladnout na teplotu váhovsky a zváží se s přesností na 0,1 mg.
- 6.2.15 Postupy 6.2.13 a 6.2.14 se zopakují (přičemž doba zahřívání se pohybuje mezi 30 a 60 minutami), dokud rozdíl hmotnosti ve dvou po sobě následujících váženích není menší než 0,5 mg nebo dokud se hmotnost nezvětší. Dojde-li ke zvětšení hmotnosti, použije se ve výpočtu (7.1) nejnižší zjištěná hmotnost. Konečná hmotnost se označí M_1 (v gramech).
- 6.2.16 Přidá se 15 až 25 ml petroletheru. Tak je možno se přesvědčit, zda je vyextrahovaná hmota dokonale rozpustná. Rozpouštědlo se lehce zahřívá a promíchává, dokud se všechny tuk nerozpustí.
- 6.2.16.1 Pokud je vyextrahovaná hmota v petroletheru zcela rozpustná, hmotnost tuku je dána rozdílem mezi hmotnostmi stanovenými v bodech 6.2.1 až 6.2.15.
- 6.2.16.2 Jsou-li přítomny nerozpustné látky nebo existují-li pochybnosti, provede se úplné odstranění tuku z baňky jejím opakováním vypláchnutím teplým petroletherem a nerozpuštěná hmota se nechá před každou dekantací usadit. Hrdlo baňky se třikrát opláchne. Po dobu jedné hodiny se baňka položená na bok zahřívá v sušárně, poté se nechá vychladnout na teplotu váhovsky stejně jako v předchozím postupu (6.2.1) a zváží se s přesností na 0,1 mg. Hmotnost tuku je dána rozdílem mezi hmotnostmi stanovenou v bodě 6.2.15 a touto konečnou hmotností.

7. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ

7.1 Výpočet

Hmotnost extrahovaného tuku v gramech je

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

a obsah tuku ve vzorku vyjádřený v procentech je

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

kde:

M_1 = hmotnost baňky M s tukem (g) získaná postupem podle 6.2.15,

M_2 = hmotnost baňky M (g) získaná v bodě 6.2.1 nebo (je-li přítomna nerozpuštěná hmota nebo v případě pochybností) v postupu 6.2.16.2,

B_1 = hmotnost baňky B ve slepém pokusu (g) získaná postupem podle 6.2.15,

B_2 = hmotnost baňky B (g) získaná postupem podle 6.2.1 nebo (je-li přítomna nerozpuštěná hmota nebo v případě pochybností) postupem 6.2.16.2,

S = hmotnost použitého vzorku (g).

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 0,05 g tuku na 100 g výrobku.

**METODA 4: STANOVENÍ OBSAHU TUKU V SUŠENÉM MLÉČE
(PODLE RÖSE-GOTTLIEBA)****1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ**

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu tuku:

- v sušeném vysokotučném mléce,
- v sušeném plnotučném mléce,
- v sušeném částečně odtučněném mléce,
- v sušeném odtučněném mléce.

2. DEFINICE

Obsah tuku v sušeném mléce: obsah tuku stanovený touto metodou.

3. PODSTATA METODY

Obsah tuku se stanoví jeho extrakcí z amoniakálně alkoholového roztoku vzorku diethyletherem a petroletherem a následným odpařením rozpouštědel, zvážením zbytku a výpočtem v procentech hmotnosti vzorku podle pravidla Röse-Gottlieba.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

Všechna reakční činidla musí vyhovovat požadavkům stanoveným v bodě týkajícím se slepého pokusu (6.1). V případě potřeby se činidla redestilují za přítomnosti 1 g mléčného tuku na 100 ml rozpouštědla.

- 4.1 Roztok amoniaku obsahující asi 25 % hmot. NH_3 (hustota při 20 °C je přibližně 0,91 g/ml) nebo silnější roztok známé koncentrace.
- 4.2 96 ± 2 % ethanol nebo, není-li k dispozici, ethanol denaturovaný methanolem, ethylmethylketonem nebo petroletherem.
- 4.3 Diethylether neobsahující peroxidy.

Poznámka 1:

Zkouška na obsah peroxidů se provede tak, že se k 10 ml etheru v malém skleněném válci opatřeném zátkou a předem vypláchnutém etherem přidá 1 ml čerstvě připraveného desetiprocentního roztoku jodidu draselného, obsah se protřepá a ponechá 1 minutu stát. Žluté zabarvení kterékoliv vrstvy je nepřipustné.

Poznámka 2:

Z diethyletheru lze odstranit peroxidy vložením vlhké zinkové fólie, která byla předtím na 1 minutu zcela ponořena do zředěného okyseleného roztoku síranu měďnatého a poté opláchnuta vodou. Na litr se použije asi 8 000 mm² zinkové fólie v podobě proužků, jejichž délka dosahuje alespoň do poloviny nádoby.

- 4.4 Petrolether s bodem varu v rozmezí teplot 30 až 60 °C.
- 4.5 Směsné rozpouštědlo připravené krátce před použitím smícháním stejných objemů diethyletheru (4.3) a petroletheru (4.4). (Pokud je uvedeno použití směsného činidla, může být činidlo nahrazeno samotným diethyletherem nebo petroletherem).
- 5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY**
- 5.1 Analytické váhy.
- 5.2 Vhodné extrakční zkumavky nebo baňky opatřené zabroušenými skleněnými zátkami nebo jinými uzávěry, které jsou odolné proti používaným rozpouštědlům.
- 5.3 Tenkostěnné baňky s plochým dnem o objemu 150 až 250 ml.
- 5.4 Dobře odvětrávaná sušárna pracující při atmosférickém tlaku, s termostatickou regulací teploty (nastavená na teplotu 102 ± 1 °C).

- 5.5 Varná tělíska zbavená tuku, neporézní a při použití se nedrobící, například skleněné kuličky nebo kousky karbidu křemíku (použití materiálu je volitelné, viz bod 6.2.1).
- 5.6 Vodní lázeň umožňující udržovat teplotu v rozmezí 60 až 70 °C.
- 5.7 Sifon vhodný pro použité extrakční zkumavky nebo baňky.
- 5.8 Odstředivka (volitelná).

6. POSTUP

6.1 Slepý pokus

Současně se stanovením obsahu tuku ve vzorku se provede slepý pokus s 10 ml vody, s použitím stejného typu extrakčního zařízení, stejných reakčních činidel (včetně jejich množství) a podle stejného postupu, který je popsán dále, s výjimkou bodu 6.2.2. Pokud výsledek slepého pokusu přesahuje hodnotu 0,5 mg, měla by být činidla zkontrolována a znečištěná činidla by měla být přechištěna nebo vyměněna.

6.2. Stanovení

- 6.2.1 Baňka (5.3), popřípadě s varnými tělíska (5.5) (usnadňujícími klidný var v průběhu následného odpařování rozpouštědla), se suší půl hodiny až jednu hodinu v sušárně (5.4). Baňka se poté nechá vychladnout na teplotu váhovsky a zváží se s přesností na 0,1 mg.
- 6.2.2 S přesností na 1 mg se přímo v extrakční baňce (5.2) nebo diferenčně naváží přibližně 1 g sušeného plnotučného mléka nebo 1,5 g sušeného částečně nebo zcela odtučněného mléka. K navážce se přidá 10 ml vody a opatrně se míchá až do úplného rozpuštění sušeného mléka (některé vzorky může být potřeba zahřát).
- 6.2.3 Přidá se 1,5 ml amoniaku (25 %) (4.1) nebo příslušné množství koncentrovanějšího roztoku a zahřívá se ve vodní lázni (5.6) po dobu 15 minut při 60 až 70 °C za občasných protřepání. Poté se roztok ochladí například pod tekoucí vodou.
- 6.2.4 Přidá se 10 ml ethanolu (4.2) a kapaliny se opatrně, ale důkladně promíchají v otevřené baňce.
- 6.2.5 Přidá se 25 ml diethyletheru (4.3). Poté se baňka ochladí pod tekoucí vodou. Extrakční baňka se poté uzavře a důkladně se protřepává a převrací po dobu jedné minuty.
- 6.2.6 Extrakční baňka se opatrně odzátkuje a přidá se 25 ml petroletheru (4.4) tak, aby první dávky etheru opláchly zátka a hrdlo baňky zevnitř a aby tato tekutina stékala do baňky. Baňka se zazátkuje a protřepává a převrací se asi po dobu 30 sekund. Neprovádí-li se odstřeďování (6.2.7), směs se neprotřepává příliš silně.
- 6.2.7 Extrakční baňka se postaví do stojanu a ponechá se tam tak dlouho, dokud se vrchní vrstva kapaliny nevyčerpá a zřetelně se neoddělí od vodní vrstvy. K oddělení vrstev je možno též použít vhodnou odstředivku (5.8).

Poznámka:

Při použití odstředivky, která není poháněna třífázovým motorem, může dojít k jiskření, a v tom případě je třeba dávat pozor, aby etherové páry unikající například z prasklé zkumavky neexplodovaly nebo se nevznítily.

- 6.2.8 Extrakční baňka se odzátkuje, zátka i vnitřek hrdla se omyje několika mililitry směsného rozpouštědla (4.5) tak, aby tekutina stékala do baňky. Do připravené baňky (6.2.1) se dekantací nebo pomocí sifonu (5.7) převede z extrakční baňky co nejvíce supernatantu.

Poznámka:

Pokud se nepoužije sifon, může být potřeba přidat trochu vody, aby se rozhraní mezi dvěma vrstvami zvýraznilo, a tak se usnadnila dekantace.

- 6.2.9 Zevní i vnitřní stěna hrdla baňky nebo spodní část sifonu se opláchne několika mililitry směsného rozpouštědla. Tekutina z vnější strany baňky se jímá do baňky a tekutina z vnitřní strany hrdla nebo ze sifonu se jímá do extrakční baňky.

- 6.2.10 Proveďte se druhá extrakce opakováním postupů 6.2.5 až 6.2.9 včetně, avšak pouze s 15 ml diethyletheru a 15 ml petroletheru.
- 6.2.11 Proveďte se třetí extrakce opakováním postupu 6.2.10, avšak bez konečného oplachování (6.2.9).
- Poznámka:*
U rozboru vzorků sušeného odtučněného mléka není provedení třetí extrakce povinné.
- 6.2.12 Opatrně se odpaří nebo oddestiluje co největší množství rozpouštědla (včetně ethanolu). Jedná-li se o baňku malého objemu, bude nutno určité množství rozpouštědla odstranit výše popsáním postupem po každé extrakci.
- 6.2.13 Není-li již z baňky cítit rozpouštědlo, baňka se položí na bok a umístí na 1 hodinu do sušárny.
- 6.2.14 Baňka se vyjme ze sušárny, nechá se vychladnout na teplotu váhovny jako v předchozím postupu (6.2.1) a zváží se s přesností na 0,1 mg.
- 6.2.15 Postupy 6.2.13 a 6.2.14 se zopakují, přičemž doba zahřívání se pohybuje mezi 30 a 60 minutami, dokud rozdíl hmotnosti při po sobě následujících váženích není menší než 0,5 mg nebo dokud se hmotnost nezvětší. Dojde-li ke zvětšení hmotnosti, použije se ve výpočtu (7.1) nejnižší zjištěná hmotnost. Konečná hmotnost se označí M_1 (v gramech).
- 6.2.16 Přidá se 15 až 25 ml petroletheru. Tak je možno se přesvědčit, zda je vyextrahovaná hmota dokonale rozpustná. Rozpouštědlo se lehce zahřívá a promíchává, dokud se všechny tuk nerozpustí.
- 6.2.16.1 Pokud je vyextrahovaná hmota v petroletheru úplně rozpustná, hmotnost tuku je dána rozdílem mezi hmotnostmi stanovenými v bodech 6.2.1 až 6.2.15.
- 6.2.16.2 Je-li přítomna nerozpustná látka nebo existují-li pochybnosti, provede se úplné odstranění tuku z baňky jejím opakováním vypláchnutím teplým petroletherem a nerozpuštěná hmota se nechá před každou dekantací usadit. Hrdlo baňky se třikrát opláchně.

Po dobu jedné hodiny se baňka položená na bok zahřívá v sušárně, poté se nechá vychladnout na teplotu váhovny stejně jako v předchozím postupu (6.2.1) a zváží se s přesností na 0,1 mg. Hmotnost tuku je dána rozdílem mezi hmotnostmi stanovenou v bodě 6.2.15 a touto konečnou hmotností.

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

7.1 Výpočet

Hmotnost extrahovaného tuku (g) je

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

a obsah tuku ve vzorku vyjádřený v procentech je

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

kde:

M_1 = hmotnost baňky M s tukem (g) získaná postupem podle 6.2.15,

M_2 = hmotnost baňky M (g) získaná postupem podle 6.2.1 nebo (je-li přítomna nerozpuštěná hmota nebo v případě pochybností) postupem podle 6.2.16.2,

B_1 = hmotnost baňky B ve slepém pokusu (g) získaná postupem podle 6.2.15,

B_2 = hmotnost baňky B (g) získaná postupem podle 6.2.1 nebo (je-li přítomna nerozpuštěná hmota nebo v případě pochybností) postupem podle 6.2.16.2,

S = hmotnost použitého vzorku (g).

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 0,2 g tuku na 100 g výrobku s výjimkou sušeného odtučněného mléka, u kterého nesmí být rozdíl větší než 0,1 g tuku na 100 g výrobku.

METODA 5: STANOVENÍ OBSAHU SACHARÓZY (POLARIMETRICKÁ METODA)

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu sacharózy

- v zahuštěném slazeném mléce,
- v zahuštěném slazeném částečně odtučněném mléce,
- v zahuštěném slazeném odtučněném mléce.

Vzorky nesmějí obsahovat invertní cukr.

2. DEFINICE

Obsah sacharózy v zahuštěném slazeném mléce: obsah sacharózy stanovený touto metodou.

3. PODSTATA METODY

Metoda spočívá na principu inverze podle Clergeta, kdy zředěná kyselina zcela hydrolyzuje sacharózu, nepůsobí však na laktózu a jiné cukry. Obsah sacharózy se získá ze změny optické otáčivosti roztoku.

Čirý filtrát vzorku, bez mutarotace laktózy, se získá působením amoniaku, následnou neutralizací a vyčištěním postupným přidáváním roztoků octanu zinečnatého a hexakynoželeznatanu draselného.

V části filtrátu se sacharosa speciálním způsobem hydrolyzuje.

Obsah sacharózy se vypočte pomocí příslušných vzorců ze změny optické otáčivosti filtrátu před hydrolyzou a po hydrolyze sacharózy.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

- 4.1 Octan zinečnatý, 1M: roztok: 21,9 g krystalického dihydrátu octanu zinečnatého, $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a 3 ml ledové kyseliny octové se rozpustí ve vodě a doplní se do 100 ml vodou.
- 4.2 Hexakynoželeznatan draselný, 0,25M roztok: 10,6 g krystalického trihydrátu hexakynoželeznatanu draselného, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve vodě a doplní se do 100 ml vodou.
- 4.3 Kyselina chlorovodíková, $6,35 \pm 0,20\text{M}$ roztok (20 až 22 %) nebo $5,0 \pm 0,2\text{M}$ roztok (16 až 18 %).
- 4.4 Amoniak, $2,0 \pm 0,2\text{M}$ roztok (3,5 %).
- 4.5 Kyselina octová, $2,0 \pm 0,2\text{M}$ roztok (12 %).
- 4.6 Indikátor bromthymolová modř, 1 % (hmot./obj.) roztok v ethanolu.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 5.1 Váhy o citlivosti 10 mg.
- 5.2 Polarimetrická trubice dlouhá 2 dm, s přesně kalibrovanou délkou.

- 5.3 Polarimetr nebo sacharimetr:
- Polarimetr se sodíkovou výbojkou nebo rtuťovou zelenou výbojkou (lampa se rtuťovými parami a hranolem nebo speciálním filtrem Wratten Screen No 77 A), s přesností odečtu alespoň 0,05 úhlových stupňů.
 - Sacharimetr s mezinárodní cukernou stupnicí s bílým světlem procházejícím filtrem tloušťky 15 mm naplněným šestiprocentním roztokem dichromanu draselného nebo se sodíkovým světlem. Na sacharimetru musí být možné odečítat s přesností alespoň na 0,1° mezinárodní cukerné stupnice.

5.4 Vodní lázeň nastavená na teplotu $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. POSTUP

6.1 Zkušební stanovení

K ocejchování postupu, reakčních činidel a přístrojů se provede dvojí zkušební stanovení níže uvedeným způsobem, se směsí 100 g mléka a 18 g čisté sacharózy nebo směsí 110 g odtučněného mléka a 18 g čisté sacharózy. Tato směs odpovídá 40 g zahuštěného mléka obsahujícího 45 % sacharózy. Obsah sacharózy se vypočte podle vzorců uvedených v bodě 7. Ve vzorci 1 se za M, F a P dosadí navážené množství mléka, obsah tuku a obsah bílkovin v tomto mléce a ve vzorci 2 se za M dosadí hodnota 40,00. Průměr dvou získaných hodnot se od hodnoty 45 % nesmí lišit o více než 0,2 %.

6.2 Stanovení

- 6.2.1 Do skleněné 100ml kádinky se navází s přesností na 10 mg přibližně 40 g dobře promíchaného vzorku. Přidá se 50 ml horké vody ($80\text{ až }90\text{ }^{\circ}\text{C}$) a dobře se promíchá.
- 6.2.2 Směs se kvantitativně převede do odměrné 200ml baňky a kádinka se postupně vyplachuje teplou ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) vodou, dokud se nedosáhne celkového objemu 120 až 150 ml. Směs se promíchá a ochladí na laboratorní teplotu.
- 6.2.3 Přidá se 5 ml roztoku amoniaku (4.4). Směs se opět promíchá a ponechá 15 minut stát.
- 6.2.4 Amoniak se neutralizuje přidávkem odpovídajícího množství naředěného roztoku kyseliny octové (4.5). Její přesné množství se určí předem titrací amoniaku za přítomnosti indikátoru bromthymolové modři (4.6). Zamíchá se.
- 6.2.5 Za mírného míchání otáčením nakloněné baňky se přidá 12,5 ml roztoku octanu zinečnatého (4.1).
- 6.2.6 Stejným způsobem, jako byl přidán octan zinečnatý, se přidá 12,5 ml roztoku hexakvanoželeznatanu draselného (4.2).
- 6.2.7 Obsah baňky se vytemperuje na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a doplní se po rysku do 200 ml vodou $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ teplou.

Poznámka:

Během dosud popsanych stadií musí být veškerá voda nebo reakční činidla přidávány tak, aby se zabránilo tvorbě vzduchových bublin, a z tohoto důvodu musí být veškeré míchání prováděno spíše otáčením než třepáním. V případě, že se před doplněním objemu na 200 ml zjistí přítomnost vzduchových bublin, mohou být bubliny odstraněny dočasným napojením baňky na vývěvu a otáčením baňky.

- 6.2.8 Baňka se uzavře suchou zátkou a důkladně se promíchá silným protřepáním.
- 6.2.9 Baňka se ponechá několik minut stát a roztok se poté zfiltruje přes suchý filtrační papír. Prvních 25 ml filtrátu se odstraní.
- 6.2.10 Přímá polarizace: stanoví se optická otáčivost filtrátu při $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.2.11 Inverze: do 50ml odměrné baňky se odpipetuje 40 ml získaného filtrátu. Přidá se 6,0 ml 6,35M roztoku kyseliny chlorovodíkové nebo 7,5 ml 5,0M kyseliny chlorovodíkové (4.3).

Baňka se umístí na 15 minut do vodní lázně vytemperované na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ tak, aby byla ponořena až po hrdlo. Baňkou se prvních 5 minut otáčí, aby se obsah promíchal a aby v této době dosáhl teploty vodní lázně. Poté se ochladí na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a doplní po rysku vodou o teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Promíchá se a při této teplotě se ponechá stát jednu hodinu.

6.2.12 Polarizace invertovaného roztoku

Stanoví se optická otáčivost invertovaného roztoku při $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. (V případě, že se teplota T kapaliny v polarizační trubici během měření liší o více než $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, musí se uplatnit korekce na teplotu uvedená níže v bodě 7.2).

7. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ

7.1 Postup výpočtu

Obsah sacharózy se vypočte podle níže uvedených vzorců:

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

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

kde:

S = obsah sacharózy,

M = hmotnost navážky vzorku v gramech.

F = obsah tuku ve vzorku v procentech.

P = obsah bílkovin ($N \times 6,38$) ve vzorku v procentech.

V = objem (ml), ve kterém byl vzorek rozpuštěn před filtrací.

v = korekce na objem sraženiny vzniklé během čiření (ml),

D = odečet údaje polarimetru, otáčivost, před inverzí,

I = odečet polarimetru po inverzi,

L = délka polarizační trubice (dm),

Q = inverzní faktor, jehož hodnoty jsou uvedeny níže.

Poznámky:

- a) Pokud je hmotnost zahuštěného mléka přesně 40,00 g, polarimetr pracuje se sodíkovým světlem, odečítá se v úhlových stupních a délka polarizační trubice při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ je 2 dm, pak obsah sacharózy normálního zahuštěného mléka ($C = 9$) může být vypočítán podle tohoto vzorce:

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

- b) Pokud se měření provádí při jiné teplotě T než $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, je třeba získané hodnoty vynásobit hodnotou:

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

7.2 Hodnoty inverzního faktoru Q

Níže uvedené vzorce udávají přesné hodnoty faktoru Q pro různé zdroje světla s korekcemi na koncentraci a teplotu:

Sodíkové světlo a polarimetr se stupnicí v úhlových stupních:

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

Zelené světlo rtuťové výbojky a polarimetr se stupnicí v úhlových stupních:

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

Bílé světlo s dichromátovým filtrem a sacharimetr se stupnicí v mezinárodních cukerných stupních:

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

Ve výše uvedených vzorcích:

C = procentního obsah veškerých cukrů v invertovaném roztoku podle polarimetrického odečtu.

T = teplota invertovaného roztoku v průběhu polarimetrického měření.

Poznámka 1:

Procentní obsah veškerých cukrů C v invertovaném roztoku lze vypočítat z přímého odečtu a změny po inverzi obvyklým způsobem za použití běžně užívaných hodnot specifických pro otáčivost sacharosy, laktosy a invertního cukru.

Korekce $0,0006 (C - 9)$ atd. je správná pouze v případě, kdy C je přibližně rovno 9. U normálního zahuštěného mléka může být tato korekce zanedbána, protože C je velmi blízké hodnotě 9.

Poznámka 2:

Odchylka 1 °C od teploty 20 °C při odečtu přímé polarizace způsobuje malé rozdíly při přímém odečtu, ale odchylka přes 0,2 °C při odečtu po inverzi vyžaduje korekci. Korekce 0,0033 (T – 20) atd. je správná pouze v rozmezí teplot 18 až 22 °C.

7.3 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 0,3 g sacharózy na 100 g zahuštěného mléka.

METODA 6: STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY MLÉČNÉ A MLÉČNANŮ**1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ**

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu kyseliny mléčné a mléčnanů vyjádřeného jako obsah kyseliny mléčné

- v sušeném vysokotučném mléce,
- v sušeném plnotučném mléce,
- v sušeném částečně odtučněném mléce,
- v sušeném odtučněném mléce.

2. DEFINICE

Obsah kyseliny mléčné a mléčnanů v sušeném mléce: obsah kyseliny mléčné a mléčnanů vyjádřený jako kyselina mléčná stanovený touto metodou.

3. PODSTATA METODY

Tuk, bílkovina a laktosa jsou současně odstraněny z roztoku vzorku přidáním síranu měďnatého a hydroxidu vápenatého s následnou filtrací.

Kyselina mléčná a mléčnany ve filtrátu se přemění na acetaldehyd koncentrovanou kyselinou sírovou za přítomnosti síranu měďnatého.

Obsah kyseliny mléčné se stanoví kolorimetricky na p-hydroxydifenyli.

Obsah kyseliny mléčné a mléčnanů se vyjádří v mg kyseliny mléčné na 100 g tukuprosté sušiny.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

- 4.1 Roztok síranu měďnatého: v odměrné 1000ml baňce se rozpustí 250 g síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ve vodě a doplní se po rysku vodou.
- 4.2 Suspenze hydroxidu vápenatého.
 - 4.2.1 V třecí misce se rozmělní 300 g hydroxidu vápenatého $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ s celkem 900 ml vody. Suspenze by měla být před použitím čerstvě připravena.
 - 4.2.2 Suspenze hydroxidu vápenatého: 300 g hydroxidu vápenatého $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ se rozmělní v třecí misce s celkem 1400 ml vody. Suspenze by měla být před použitím čerstvě připravena.
- 4.3 Roztok síranu měďnatého a kyseliny sírové: 0,5 ml roztoku síranu měďnatého (4.1) se přidá k 300 ml kyseliny sírové o koncentraci 95,9 až 97,0 % hmot.
- 4.4 Roztok p-hydroxydifenyli ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$): 0,75 g p-hydroxydifenyli se rozpustí třepáním a mírným ohříváním v 5 ml vodného roztoku hydroxidu sodného obsahujícího 5 g NaOH ve 100 ml. V odměrné baňce se následně zředí na 50 ml vodou. Roztok se uchovává v láhvi z hnědého skla na tmavém a chladném místě. Roztok se nesmí použít, dojde-li ke změně barvy nebo k zakalení. Maximální doba skladování je 72 hodin.

- 4.5 Standardní roztok kyseliny mléčné: 0,1067 g mléčnanu lithného ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$) se rozpustí krátce před použitím v 1000 ml odměrné baňce a doplní se po rysku vodou. 1 ml tohoto roztoku odpovídá 0,1 mg kyseliny mléčné.
- 4.6 Standardní obnovené mléko: analyzuje se předem několik vzorků vysoce kvalitního sušeného mléka. Pro přípravu kalibrační křivky se vybere vzorek s nejnižším obsahem kyseliny mléčné, který neobsahuje více než 30 mg kyseliny mléčné na 100 g tukuprosté sušiny. Postupuje se postupem popsaným níže v bodech 6.2.1 a 6.2.2.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 5.1 Analytické váhy.
- 5.2 Spektrofotometr s možností měření při vlnové délce 570 nm.
- 5.3 Vodní lázeň o teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 5.4 Třecí miska a tlouček.
- 5.5 Filtrační papír (Schleicher and Schull 595, Whatman 1 nebo ekvivalentní).
- 5.6 Zkumavky ze skla pyrex nebo odpovídající (rozměry 25 x 150 mm).

Poznámka:

Všechny skleněné pomůcky musí být naprosto čisté a určené pouze pro toto stanovení. Zbytky sraženin se před mytím odstraní kyselinou chlorovodíkovou.

6. POSTUP

6.1 Slepý pokus

Slepý pokus se provede tak, že se do 50ml odměrného válce odměří 30 ml vody a postupuje se podle bodů 6.2.4 až 6.2.11 včetně. Pokud výsledek slepého pokusu stanovený proti vodě převyšuje ekvivalent 20 mg kyseliny mléčné na 100 g tukuprosté sušiny, měla by být reakční činidla zkontrolována a znečištěná reakční činidla nebo činidlo by mělo být vyměněno. Slepý pokus se provádí současně s analýzou vzorku.

6.2 Stanovení

Poznámka:

Je třeba zabránit kontaminaci nečistotami, zvláště slinami nebo potem.

- 6.2.1 Stanovení obsahu tukuprosté sušiny (a) g ve vzorku se provede odečtením obsahu tuku (získaného metodou 4) a obsahu vlhkosti (získaného metodou 2) od čísla 100.
- 6.2.2 Navází se g vzorku s přesností na 0,1 g. $\frac{1000}{(a - 10)}$ g Toto množství se převede do 100 ml vody a důkladně se promíchá.
- 6.2.3 Z tohoto roztoku se odpipetuje 5 ml do 50ml odměrného válce a zředí se vodou na celkový objem asi 30 ml.
- 6.2.4 Za stálého protřepávání se pomalu přidá 5 ml roztoku síranu měďnatého (4.1) a ponechá se 10 minut stát.
- 6.2.5 Za stálého protřepávání se pomalu přidá 5 ml suspenze hydroxidu vápenatého (4.2.1) nebo 10 ml suspenze hydroxidu vápenatého (4.2.2).
- 6.2.6 Zředí se na 50 ml vodou, intenzivně se protřepe, nechá se 10 minut stát a poté se zfiltruje. První části filtrátu se odstraní.
- 6.2.7 Do zkumavky (5.6) se odpipetuje 1 ml filtrátu.
- 6.2.8 Do zkumavky se dělenou pipetou odpipetuje nebo pomocí byrety přidá 6,0 ml roztoku síranu měďnatého v kyselině sírové (4.3). Zamíchá se.
- 6.2.9 Zahřívá se na vroucí vodní lázni 5 minut. Pod tekoucí vodou se ochladí na laboratorní teplotu.

- 6.2.10 Přidají se dvě kapky roztoku p-hydroxydifenyly (4.4) a intenzivně se protřepe, aby se činidlo rovnoměrně rozptýlilo do celé tekutiny. Zkumavka se 15 minut zahřívá na vodní lázni $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ teplé za občasného protřepání.
- 6.2.11 Zkumavka se nechá asi 90 sekund na vroucí vodní lázni a pod tekoucí vodou se ochladí na laboratorní teplotu.
- 6.2.12 Během tří hodin se změří optická hustota proti slepému pokusu (6.1) při vlnové délce uvedené v bodě 5.2.
- 6.2.13 Pokud je optická hustota vyšší než krajní bod kalibrační křivky, opakuje se pokus s přiměřeně naředěným filtrátem získaným postupem podle 6.2.6.

6.3 Sestrojení kalibrační křivky

- 6.3.1 Do pěti 50ml odměrných válců se odpipetuje po 5 ml obnoveného mléka (4.6). Do těchto válců se přidá 0, 1, 2, 3 a 4 ml standardního roztoku (4.5) tak, aby se získaly standardní roztoky odpovídající 0, 20, 40, 60 a 80 mg přidané kyseliny mléčné na 100 g tukuprosté sušiny sušeného mléka.
- 6.3.2 Roztoky se zředí vodou na asi 30 ml a postupuje se podle postupů 6.2.4 až 6.2.11.
- 6.3.3 Změří se optická hustota standardů (6.3.1) proti slepému pokusu (6.1) při vlnové délce uvedené v bodě 5.2. Optická hustota se vynese do grafu proti množství kyseliny mléčné dané podle bodu 6.3.1, tj. 0 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg a 80 mg na 100 g tukuprosté sušiny. Těmito body se proloží přímka a jejím rovnoběžným posunutím se sestrojí kalibrační křivka tak, aby procházela počátkem.

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

7.1. Postup výpočtu

Optická hustota naměřená v bodech 6.2.12 nebo 6.2.13 se pomocí kalibrační křivky převede na obsah kyseliny mléčné v mg na 100 g tukuprosté sušiny ve vzorku. Pokud byl filtrát ředěn podle bodu 6.2.13 vynásobí se výsledek faktorem zředění.

7.2. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 8 mg kyseliny mléčné na 100 g tukuprosté sušiny pro obsah do 80 mg. Při vyšších hodnotách obsahu tento rozdíl nesmí být vyšší než 10 % nejnižší hodnoty.

METODA 7: STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATÁZY (UPRAVENÁ METODA PODLE SANDERSE A SAGERA)

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda slouží ke stanovení aktivity fosfatázy

- v sušeném vysokotučném mléce,
- v sušeném plnotučném mléce,
- v sušeném částečně odtučněném mléce,
- v sušeném odtučněném mléce.

2. DEFINICE

Aktivita fosfatázy v sušeném mléce je míra přítomné aktivní alkalické fosfatázy. Je vyjádřena jako množství fenolu v μg uvolněného 1 ml obnoveného mléka níže popsaným postupem.

3. PODSTATA METODY

Aktivita fosfatázy v sušeném mléce je dána schopností fosfatázy uvolňovat určité množství fenolu z dvoj-sodné soli fenylfosforečnanu. Množství fenolu uvolněného za předepsaných podmínek je stanoveno spektrometrickým měřením zabarvení vyvolaného pomocí Gibbova činidla.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

4.1 Roztok A

Baryum-borátový tlumivý roztok: pH = 10,6 ± 0,1 při 20 °C.

V 500ml baňce se rozpustí ve vodě 25,0 g hydroxidu barnatého ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) a doplní se po rysku vodou.

V 500ml baňce se rozpustí ve vodě 11,0 g kyseliny borité (H_3BO_3) a doplní se po rysku vodou.

Oba roztoky se zahřejí na 50 °C a smísí se.

Směs se protřepe a ochladí na laboratorní teplotu.

Hodnota pH směsi se upraví na 10,6 ± 0,1 přidávkem roztoku hydroxidu barnatého a směs se zfiltruje.

Roztok se skladuje v těsně uzavřené nádobě.

Před použitím se tlumivý roztok zředí stejným objemem vody.

4.2 Roztok B

Tlumivý roztok pro vyvolání zabarvení.

V 1 000ml odměrné baňce se rozpustí ve vodě 6,0 g metaboritanu sodného (NaBO_2) (nebo 12,6 g $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 20,0 g chloridu sodného (NaCl) a doplní se po rysku vodou.

4.3 Roztok C

Roztok substrátu a tlumivého roztoku.

4.3.1 Rozpustí se 0,5 g dihydrátu dvojsodné soli fenylfosforečnanu ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 4,5 ml tlumivého roztoku B (4.2). Přidají se dvě kapky roztoku E (4.5) a 30 minut se nechá stát. Vytvořené barvivo se extrahuje 2,5 ml butanolu (4.10). V případě nutnosti se extrakce barviva opakuje. Butanol se oddělí a odstraní. Roztok je možné skladovat v chladničce několik dní. Vyvolání zabarvení a extrakce barviva se těsně před použitím opakují.

4.3.2 Do 100ml odměrné baňky se odpipetuje 1 ml tohoto roztoku a doplní se po rysku roztokem A. Roztok substrátu a tlumivého roztoku se připraví těsně před použitím.

4.4 Roztok D

Srážecí činidlo.

V 100ml odměrné baňce se rozpustí ve vodě 3,0 g síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0,6 g síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a doplní se po rysku vodou.

4.5 Roztok E

Gibbovo činidlo.

Rozpustí se 0,040 g 2,6-dibromchinon-1,4-chlorimidu ($\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 \cdot \text{NCl}$) v 10 ml devadesátíšestiprocentního ethanolu. Roztok se skladuje v tmavé lahvi v chladničce. Pokud se odbarví, zlikviduje se.

4.6 Tlumivý roztok pro zředění vzniklého zabarvení

Do 100ml odměrné baňky se převede 10 ml roztoku B (4.2) tlumivého roztoku pro vyvolání zabarvení a doplní se po rysku vodou.

4.7 Roztok síranu měďnatého

Do 100ml odměrné baňky se převede 0,05 g síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), rozpustí se ve vodě a doplní se po rysku vodou.

4.8 Standardní roztok fenolu

Ve 100ml odměrné baňce se rozpustí 0,200 ± 0,001 g čistého fenolu ve vodě a doplní se po rysku vodou. Tento roztok lze uchovávat několik měsíců v chladničce. 10 ml tohoto zásobního roztoku se zředí na 100 ml vodou. Tento zředěný roztok obsahuje 200 µg fenolu v 1 ml a může být použit pro přípravu ještě zředěnějších roztoků.

4.9 Destilovaná, převařená voda.

4.10 n-butanol.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Analytické váhy.

5.2 Vodní lázeň udržovaná termostatem na teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3 Spektrofotometr umožňující měření při vlnové délce 610 nm.

5.4 Filtrační papír (Schleicher and Shull 597, Whatman 42 nebo odpovídající).

5.5 Vroucí vodní lázeň.

5.6 Hliníková fólie.

6. POSTUP

Upozornění:

1. Je třeba zamezit přístupu přímého slunečního světla.
2. Všechny skleněné nádoby, zátky a manipulační pomůcky by měly být dokonale čisté. Doporučuje se opláchnout je a vyvařit ve vodě nebo je očistit parou.
3. Nesmí se používat materiály z plastů (například zátky), protože by mohly obsahovat fenoly.
4. Sliny obsahují fosfatázu. Je třeba zabránit kontaminaci stopovým množstvím slin.

6.1 **Příprava vzorku**

6.1.1 Naváží se 10 g vzorku s přesností na 0,1 g a rozpustí se v 90 ml vody. Při rozpouštění sušeného mléka nesmí teplota v žádném případě překročit $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 **Stanovení**

6.2.1 Do každé ze dvou zkumavek se vnese 1 ml obnoveného mléka, připraveného podle bodu 6.1.1.

6.2.2 Jedna ze zkumavek se zahřívá dvě minuty na vroucí lázni. Zkumavky a vodní lázeň (5.5), nebo například kádinka s vroucí vodou se zakryjí hliníkovou fólií (5.6), aby se zajistilo prohřátí celého obsahu zkumavky. Proveďte se ochlazení pod tekoucí vodou na laboratorní teplotu. Tato zkumavka se použije pro provedení slepého pokusu. Následující zpracování se provede stejně pro obě zkumavky.

6.2.3 Přidá se 10 ml roztoku C (4.3.2). Roztok se zamíchá a zkumavka se umístí do $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ teplé vodní lázně (5.2).

6.2.4 Inkubuje se po dobu 60 minut ve vodní lázni za pravidelného promíchání.

6.2.5 Zkumavky se ihned přenesou na vroucí vodní lázeň (5.5) a dvě minuty se zahřívají; ochladí se studenou vodou na laboratorní teplotu.

6.2.6 Do každé ze zkumavek se přidá 1 ml roztoku D (4.4), promíchá se a filtruje přes suchý filtrační papír; první filráty se odstraňují, dokud není získána čirá kapalina.

6.2.7 Do zkumavek se přenesou 5 ml filtrátu, přidá se 5 ml roztoku B (4.2) a 0,1 ml roztoku E (4.5). Zamíchá se.

6.2.8 Za pokojové teploty mimo přímé sluneční světlo se po dobu 30 minut nechá vyvíjet zabarvení.

6.2.9 Měří se optická hustota roztoku vzorku proti slepému pokusu při vlnové délce uvedené v bodě 5.3.

6.2.10 Stanovení se opakuje, pokud optická hustota roztoku přesáhne optickou hustotu standardu obsahujícího 20 μg fenolu připraveného podle bodu 7.

Pokud je tato hranice překročena, rozředí se přiměřený objem obnoveného mléka podle bodu 6.1.1 přiměřeným objemem mléka důkladně převařeného podle bodu 6.2.2, pro deaktivaci přítomné fosfatázy.

7. SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY
- 7.1 Do čtyř 100ml odměrných baněk se odpipetuje 1, 3, 5 a 10 ml standardního roztoku zředěného podle bodu 4.8 a doplní se vodou po rysku. Tyto roztoky obsahují 2, 6, 10 a 20 µg fenolu v 1 ml.
- 7.2 K vytvoření řady vzorků obsahujících 0 (slepý pokus), 2, 6, 10 a 20 µg fenolu se do zkumavek odpipetuje 1 ml vody nebo 1 ml z každého standardního roztoku (7.1).
- 7.3 Do každé ze zkumavek se postupně odpipetuje 1 ml roztoku síranu měďnatého (4.7), 5 ml tlumivého roztoku pro zředění vzniklého zabarvení (4.6), 3 ml vody a 0,1 ml roztoku E (4.5). Zamíchá se.
- 7.4 Zabarvení se nechá vyvíjet 30 minut při pokojové teplotě bez přístupu přímého slunečního světla.
- 7.5 Měří se hodnota absorbance roztoků ve všech zkumavkách proti slepému pokusu při vlnové délce uvedené v bodě 5.3.
- 7.6 Kalibrační křivka se sestojí vynesením hodnot absorbancí proti množství fenolu v µg, jak je uvedeno v bodě 7.2.
8. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ
- 8.1 **Výpočet**
- 8.1.1 Absorbance stanovená podle bodu 6.2.9 se převede na µg fenolu pomocí kalibrační křivky.
- 8.1.2 Aktivita fosfatázy vyjádřená v µg fenolu na ml obnoveného mléka se vypočte pomocí níže uvedeného vzorce:
- $$\text{aktivita fosfatázy} = 2,4 \times P,$$
- kde P = množství fenolu v µg podle bodu 8.1.1.
- 8.1.3 Pokud se provádělo ředění podle bodu 6.2.10, vynásobí se výsledek získaný podle bodu 8.1.2 ředicím faktorem.
- 8.2 **Opakovatelnost**
- Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 2 µg fenolu uvolněného 1 ml obnoveného mléka.

METODA 8: STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATÁZY (PODLE ASCHAFFENBURGA A MÜLLENA)

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda slouží ke stanovení aktivity fosfatázy

- v sušeném vysokotučném mléce,
- v sušeném plnotučném mléce,
- v sušeném částečně odtučněném mléce,
- v sušeném odtučněném mléce.

2. DEFINICE

Aktivita fosfatázy v sušeném mléce je míra množství aktivní alkalické fosfatázy ve výrobku. Je vyjádřena množstvím p-nitrofenolu v µg uvolněným 1 ml obnoveného mléka za popsaných podmínek.

3. PODSTATA METODY

Obnovený vzorek se zředí roztokem substrátu a tlumivého roztoku o pH = 10,2 nechá se inkubovat po dobu dvou hodin při teplotě 37 °C. Alkalická fosfatáza přítomná ve vzorku za těchto podmínek uvolní p-nitrofenol z přidaného dvojsodné soli p-nitrofenylfosforečnanu. Uvolněný p-nitrofenol se stanoví přímým porovnáním se skleněnou škálou barevných standardů v jednoduchém komparátoru pomocí odraženého světla.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

4.1 Tlumivý roztok uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného.

V 1 000ml odměrné baňce se rozpustí 3,5 g bezvodého uhličitanu sodného a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného ve vodě a doplní se vodou po rysku.

4.2 Roztok substrátu a tlumivého roztoku.

V 1 000ml odměrné baňce se rozpustí 1,5 g dvojsodné soli p-nitrofenylfosforečnanu v tlumivém roztoku uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného (4.1) a doplní se po rysku tlumivým roztokem (4.1).

Tento roztok je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud se uchovává se v chladničce při teplotě nižší než 4 °C. Doporučuje se provést kontrolní zkoušku na barvu takto uchovávaných roztoků – viz bod 6, upozornění 3.

4.3 Čířicí roztoky.

4.3.1 Roztok síranu zinečnatého.

Ve 100ml odměrné baňce se rozpustí 30,0 g síranu zinečnatého (ZnSO_4) ve vodě a doplní se vodou po rysku.

4.3.2 Roztok hexakynoželednatanu draselného.

V odměrné 100ml baňce se rozpustí 17,2 g trihydrátu hexakynoželednatanu draselného ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ve vodě a doplní se vodou po rysku.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

5.1 Analytické váhy.

5.2 Vodní lázeň udržovaná termostatem na teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.5.3 Komparátor se speciálním kotoučem obsahujícím standardní barevná skla kalibrovaná v μg p-nitrofenolu na ml mléka a dvě 25mm kyvety.

6. POSTUP

Upozornění:

1. Zkumavky musí být po použití vyprázdněny, opláchnuty vodou, umyty horkou vodou obsahující alkalické odmašťovače a opláchnuty horkou čistou tekoucí vodou. Před použitím musí být opláchnuty vodou a osušeny.

Pipety musí být okamžitě po použití opláchnuty pod studenou tekoucí vodou. Před použitím musí být opláchnuty vodou a osušeny.

2. Zátky ke zkumavkám musí být po použití pečlivě opláchnuty pod horkou tekoucí vodou a následně dvě minuty povařeny.
3. Roztok substrátu a tlumivého roztoku (4.2) zůstává stabilní nejméně jeden měsíc, pokud je skladován v chladničce při teplotě nejvýše +4 °C. Projevem nestability roztoku je vytvoření žlutého zabarvení. Protože se porovnání provádí se svařeným kontrolním vzorkem obsahujícím stejný tlumivý roztok, doporučuje se, aby roztok nebyl používán, jestliže vykazuje zabarvení přesahující 10 μm při použití 25mm kyvety v komparátoru a s destilovanou vodou v druhé 25mm kyvetě.
4. Pro každý vzorek se použije jiná pipeta a je třeba zabránit kontaminaci vzorku slinami.
5. V průběhu stanovení je třeba zabránit přístupu přímého slunečního světla.

6.1 Příprava vzorku

V 90 ml vody se rozpustí 10 g sušeného mléka. Teplota při rozpouštění nesmí překročit 35 °C.

6.2 Stanovení

- 6.2.1 Do čisté a suché zkumavky se odpipetuje 15 ml tlumivého roztoku (4.2) a přidají se 2 ml obnoveného vzorku (6.1) ke stanovení. Zkumavka se uzavře zátkou, obracením se promíchá a umístí se do vodní lázně (5.2) o teplotě 37 °C.
- 6.2.2 Současně se do vodní lázně umístí kontrolní zkumavka s 15 ml tlumivého roztoku a 2 ml svařeného obnoveného vzorku, podobně jako je tomu u zkušební vzorku.
- 6.2.3 Po dvou hodinách se obě zkumavky z vodní lázně vyjmou, přidá se 0,5 ml síranu zinečnatého jako srážecího činidla (4.3.1), zkumavky se uzavřou zátkami, intenzivně se protřepou a ponechají se 3 minuty stát. Přidá se 0,5 ml roztoku hexakynoželednatanu draselného jako čířícího činidla (4.3.2), důkladně se zamíchá a zfiltruje se přes filtrační skládaný papír (5.4). Jímá se čirý filtrát do čisté zkumavky.
- 6.2.4 Filtrát se převede do 25mm kyvety a porovná se s filtrátem svařeného kontrolního vzorku v komparátoru při použití speciálního disku (5.3).

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ**7.1 Výpočet**

Přímý odečet podle bodu 6.2.4 se zaznamená jako µg p-nitrofenolu na ml vzorku nebo na ml obnoveného vzorku.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených zároveň nebo rychle za sebou z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 2 µg p-nitrofenolu uvolněného 1 ml obnoveného mléka.
